



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**PLASTICIDAD DEL CIRCUITO BULBAR INDUCIDA POR EL ENRIQUECIMIENTO OLFATORIO
Y SU EFECTO PROTECTOR SOBRE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR EL PÉPTIDO
BETA AMILOIDE.**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. EN C. 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. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR

DEPARTAMENTO DE NEUROPATOLOGÍA MOLECULAR
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. VICTOR HUGO DE LAFUENTE FLORES

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

JURQUILLA QUERÉTARO, JUNIO 2022



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 el desarrollo de esta tesis se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de becario 612139.

La tesis fue financiada con proyectos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México (PAPIIT: IN202018 e IG200521) y del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (A1-S-7540).



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas, por permitirme incrementar mi desarrollo profesional.

A mi director de tesis el Dr. José Fernando Peña Ortega, de quien he aprendido mucho estos años y a quien le agradezco infinitamente por haberme permitido desarrollar mis ideas en total libertad, siempre con pensamiento crítico.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar, miembro de mi comité tutor, por sus valiosas críticas durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Víctor Hugo De Lafuente Flores, miembro de mi comité tutor, por su apoyo en el desarrollo e implementación de herramientas analíticas en Matlab para los registros electrofisiológicos, así como por sus sugerencias y críticas objetivas en el desarrollo del proyecto.

A los integrantes del jurado de examen de grado, el Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. Elvira Galarraga Palacio y el Dr. Luis Téllez Lima, por sus valiosos comentarios para la culminación de esta tesis.

Al Dr. Pavel Rueda Orozco por su apoyo en el desarrollo y uso de herramientas de análisis de señales en Matlab.

A la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez y a la Dra. Elva Adán Castro por su invaluable apoyo en el desarrollo de la técnica de *Western Blot*.

Al Bioterio del Instituto de Neurobiología a cargo del MVZ. José Martín García Servín, la Dra. Alejandra Castilla León, el MVZ. Fernando López Barrera y la Dra. María Carbajo Mata, de quienes recibí invaluable ayuda para el manejo y cuidado de los animales empleados en este y en otros proyectos.

A la Unidad de Análisis Conductual a cargo de la Dra. Deisy Gasca Martínez, y a la Dra. Karen Pimentel Farfán, por su apoyo en el desarrollo de algunas de las conductas realizadas en esta tesis.

A la Unidad de Microscopía a cargo de la Dra. Elsa Nydia Hernández Ríos.

A la Unidad de Proteogenómica a cargo de la Dra. Anaid Antaramian Salas y de la M. en C. Adriana González Gallardo.

A la I.B.T. Guadalupe Contreras Real por su enorme y valioso apoyo en el análisis de los resultados obtenidos con la técnica de imagenología óptica intrínseca.

Al Dr. Benito Ordaz Sánchez, por su apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres y hermanas que siempre han estado aún en la distancia, ¡de verdad infinitas gracias por todo!:

A mi padre, Jorge Hernández quién siempre me ha apoyado en cada decisión importante en mi vida y a quien le dedico cada esfuerzo.

A mi madre, Gloria Soto a quién agradezco infinitamente su ternura para darme cada valioso consejo y alentarme a seguir con la mente positiva.

A mi hermana Angélica, quién con su complicidad y consejos lo ha hecho todo más llevadero, te agradezco por ser siempre un ejemplo de perseverancia, rectitud y sensibilidad.

A mi hermana Gloria Vanesa, quién con su cariño y apoyo me ha motivado día con día, y quien con sus palabras me ha demostrado que siempre vale la pena insistir.

A mi compañero de vida:

A Benjamín Villasana, de quién he aprendido tanto en tan corto tiempo y a quién le agradezco enormemente por su apoyo incondicional. Gracias por las discusiones científicas y no tan científicas, que siempre motivaron el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos que aquí o en la distancia siempre están, particularmente a Elva Adán, Carlos Fernando Montes, Elizabeth Moncada, Keila Dara Rojas García, David Alcántara, Anahí Salas, gracias.

A los integrantes y ex integrantes del laboratorio de Circuitos Neuronales C-01 en el Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla, de quienes aprendí mucho en diferentes aspectos, tanto académicos como personales. Particularmente a, Keila Rojas, Germán García, Benjamín Villasana, David Alcántara, Stéphanie Thebault, Ignacio Martínez, Anahí Salas Karla Salgado, Guadalupe Contreras, Josué Juárez, Jesús Pérez, Eduardo Morado, José María Cornejo, Ana Karen Pimentel, Ernesto Flores, Arturo Isla, Lorena Xolalpa, Armando Ortega, Ángel

Robles, Laura Pinedo, Estefanía Guerrero, Polet Camacho, Jonathan Lorea, César Zaa, Keiry García, Sheini Sánchez, Siddhartha Mondragón, Guadalupe Manrique, Kenia Pardo, Perla González, Martín Macias, Víctor Vargas, Ramsés Noguez, Naga Bhavya, Ana Julia Rivera, Andrés Nieto, Carlos Montalvo, Eduardo Blanco, Mayra Torres, Felipe Méndez, Benito Ordaz.

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS | 25
AÑOS

“Women who have changed the world have never needed to show anything other than their intelligence”

Rita Levi Montalcini

“Be less curious about people and more curious about ideas”

Maria Salomea Skłodowska-Curie

Any knowledge that doesn't lead to new questions quickly dies out: it fails to maintain the temperature required for sustaining life”

Wisława Szymborska

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	3
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	5
ÍNDICE	8
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN.....	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN.....	16
El sistema olfatorio	23
Anatomía y organización del sistema olfatorio periférico	24
Sistema olfatorio accesorio.....	27
El bulbo olfatorio principal.....	29
El bulbo olfatorio principal en humanos	31
Compuestos odorantes	33
Procesamiento sensorial de los compuestos odorantes en el sistema olfatorio	35
Procesamiento cortical de las funciones olfatorias	38
Enriquecimiento olfatorio	39
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la experiencia sensorial.....	41
La Enfermedad de Alzheimer (EA)	42
El péptido beta amiloide (P β A)	43
La pérdida olfatoria en la EA	46
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	49
HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS.....	51
Objetivo general	51
Objetivos particulares	51
MATERIALES Y MÉTODOS	52
Animales	52
Enriquecimiento olfatorio	53
Sistema para la estimulación olfatoria	53
Aromas empleados durante el registro electrofisiológico, la imagenología óptica intrínseca y la prueba de discriminación olfatoria fina.....	54
Prueba de alimento enterrado	54
Prueba de habituación-deshabituación olfatoria	54

Prueba de preferencia y aversión olfatoria innata	56
Prueba de campo abierto	56
Inyección intracerebroventricular del P β A ₁₋₄₂ o su secuencia inversa como control	57
Cirugía estereotáxica para la imagenología óptica intrínseca crónica y la prueba de condicionamiento operante olfatorio	58
Registro del potencial de campo local en animales anestesiados.....	60
Registro con multielectrodos en animales anestesiados.....	61
Prueba de discriminación olfatoria fina operante tipo <i>Go/No-Go</i>	62
Imagenología óptica intrínseca en animales despiertos y anestesiados	65
Oligomerización del péptido β -amiloide	67
<i>Western blot</i>	68
Inmunofluorescencia	69
Análisis estadístico	69
Registros electrofisiológicos	69
Registro de la respiración.....	70
Imagenología óptica intrínseca.....	70
Evaluaciones conductuales.....	72
<i>Western Blot</i>	72
Inmunofluorescencia	72
RESULTADOS.....	73
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la expresión de BDNF en el bulbo olfatorio principal	73
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la actividad glomerular evocada con aroma	73
Efecto del enriquecimiento olfatorio en la actividad del circuito bulbar durante la actividad espontánea e inducida con aromas	80
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la detección y discriminación de aromas	85
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la conducta olfatoria innata	89
Verificación histológica de la administración intracerebroventricular y el registro con electrodos múltiples.....	92
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la actividad oscilatoria bulbar.....	93
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre las alteraciones producidas por el P β A ₁₋₄₂ en la actividad oscilatoria bulbar.....	94
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la disminución en la capacidad para discriminar aromas inducida por el P β A ₁₋₄₂	97

Evaluación de la locomoción tras la administración del P β A ₁₋₄₂ en un campo abierto	102
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la disminución de la discriminación fina de aromas inducida por la administración del P β A ₁₋₄₂	102
Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la expresión de P β A ₁₋₄₂ en el bulbo olfatorio principal	107
Efecto del enriquecimiento olfatorio y del P β A ₁₋₄₂ sobre la expresión de BDNF en el bulbo olfatorio principal.....	108
Efecto de la administración del P β A ₁₋₄₂ sobre la activación glomerular	109
DISCUSIÓN.....	115
El enriquecimiento olfatorio disminuye el número de glomérulos evocados con aromas e incrementa su área, intensidad y selectividad.....	115
El enriquecimiento olfatorio acelera la actividad poblacional del BOP en ausencia y presencia de aromas	116
El enriquecimiento olfatorio incrementa los niveles de BDNF en el BOP	117
El enriquecimiento olfatorio potencia la detección y la discriminación durante retos olfatorios.....	118
El enriquecimiento olfatorio evita la inhibición de la respuesta del LFP evocada con aromas en animales administrados con el P β A ₁₋₄₂	120
La disminución de la actividad neuronal poblacional del BOP producida por el P β A ₁₋₄₂ puede ser prevenida por el incremento en los niveles de BDNF inducido por el enriquecimiento olfatorio.....	122
Las alteraciones en la discriminación y la detección de aromas inducidas por el P β A ₁₋₄₂ son prevenidas por el enriquecimiento olfatorio	125
Las alteraciones en la discriminación fina de aromas inducidas por el P β A ₁₋₄₂ son prevenidas por el enriquecimiento olfatorio	127
Las alteraciones en la activación glomerular evocada con aromas inducidas por el P β A ₁₋₄₂ son prevenidas por el enriquecimiento olfatorio	131
CONCLUSIONES.....	135
PERSPECTIVAS.....	136
REFERENCIAS.....	137
ANEXO.....	168
Efecto de la administración del P β A ₁₋₄₂ sobre la activación glomerular inducida por la exposición a butirato de etilo	168
Efecto de la administración del P β A ₁₋₄₂ sobre la activación glomerular inducida por la exposición a limoneno (+).....	172
Efecto de la administración del P β A ₁₋₄₂ sobre la activación glomerular inducida por la exposición a limoneno (-).....	176
PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL DOCTORADO.....	181

LISTA DE ABREVIATURAS

α7nAChR	Receptor de acetilcolina de tipo nicotínico α 7
AC3	Adenilato ciclasa III
AChE	Acetilcolinesterasa
Ach	Acetilcolina
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ATP	Trifosfato de adenosina
AP	Anteroposterior
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BOA	Bulbo olfatorio accesorio
BOAa	Bulbo olfatorio accesorio anterior
BOAp	Bulbo olfatorio accesorio posterior
BOP	Bulbo olfatorio principal
CG	Células granulares
CM	Células mitrales
CMV	Células microvellosas
CNG	Canales activados por nucleótidos cíclicos
CP	Corteza piriforme
CPa	Corteza piriforme anterior
CPp	Corteza piriforme posterior
CREB	Unión de elementos de respuesta a AMPc
CV	Coeficiente de variación
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DE	Distancia Euclidiana
DV	Dorso ventral
DMSO	Dimetilsulfóxido

EA	Enfermedad de Alzheimer
EE	Enriquecimiento ambiental
EEM	Error estándar de la media
EO	Enriquecimiento olfatorio
EPL	Capa plexiforme externa
ET	Células empenachadas externas
GC-D	Guanilato ciclasa D
GCL	Capa de células granulares
GL	Capa glomerular
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GND	Tierra
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSK3	Cinasa de la glucógeno sintetasa 3
GTP	Guanosín trifosfato
HFIP	1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol
ICV	Administración intracerebroventricular
IL-1	Interleucina 1
IPL	Capa plexiforme externa
IP3	Inositol 1,4,5-trisfosfato
LA	Línea alba
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
LFP	Potencial de campo local
MCL	Capa de células mitrales
McCS	Células microvellosas
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
ML	Medio-lateral
MPM	Marcado de peso molecular

NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Sintasa de óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
NSO	Neuronas sensoriales olfatorias
ONL	Capa de nervio olfatorio
OEC	Células envolventes olfatorias
OR	Receptor olfatorio
OT	Proteína transportadora de olores
PA	Potencial de acción
PKA	Proteína cinasa A
PDMS	Polydimetilsiloxano
PLC	Fosfolipasa C
PβA	Péptido β amiloide
PG	Células periglomerulares
REF	Referencia
RMS	Corriente migratoria rostral
RO	Receptor olfatorio
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SNC	Sistema nervioso central
SSA	Células de axón corto superficiales
SOA	Sistema olfatorio accesorio
TOL	Tracto olfatorio lateral
TMT	2, 5-Dihidro-2, 4, 5-Trimetiltiazolina
TrkB	Receptor de tropomiosina relacionado a la quinasa B

RESUMEN

El bulbo olfatorio principal (BOP), es una estructura altamente plástica, que modifica su configuración y su función dependiendo de la experiencia sensorial. El enriquecimiento olfatorio (EO), que supone la exposición pasiva y prolongada a diferentes aromas, induce una disminución de la muerte neuronal y un incremento de la neurogénesis en el BOP; lo que correlaciona positivamente con una mejora en la capacidad para discriminar aromas. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si el EO es capaz de modificar la actividad de la red neuronal bulbar y si estos cambios impactan en la percepción olfatoria innata. Además, el EO disminuye la hiperfosforilación de la proteína Tau, un marcador molecular de la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA cursa además con un incremento en los niveles del péptido β amiloide ($P\beta A$) en el BOP lo que se asocia a una disfunción olfativa temprana. Con base en lo anterior, nos propusimos evaluar el posible efecto protector del EO frente a las alteraciones producidas por el $P\beta A$ en el circuito bulbar. Nuestros resultados indican que el EO induce modificaciones plásticas en el BOP que se reflejan como un incremento en el área y una disminución en el número de glomérulos activados con aromas, lo que se asocia a un menor traslape de los mapas glomerulares. Así mismo el EO disminuyó la potencia de oscilaciones de baja frecuencia ($<12\text{Hz}$) e incrementó las de alta frecuencia ($>12\text{Hz}$) en la actividad espontánea e inducida con aromas en el BOP. Estos hallazgos correlacionaron positivamente con un incremento en los niveles del factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF) bulbar y una mejora en la discriminación e identificación olfatoria innata de aromas a bajas concentraciones. En este trabajo demostramos que el EO previene la disminución de la actividad poblacional bulbar tras la administración del $P\beta A$ y que también previene las alteraciones inducidas por el $P\beta A$ sobre la discriminación fina, evaluada mediante una prueba de discriminación olfatoria de tipo *Go/No-Go*. Finalmente, demostramos que el EO reduce significativamente los niveles del $P\beta A$ bulbar e induce un incremento en los niveles de BDNF bulbar aún en presencia del $P\beta A$. Estos resultados sugieren que las modificaciones plásticas en el circuito bulbar inducidas por el EO podrían ser útiles contra el deterioro inducido por el $P\beta A$ durante el desarrollo de la EA.

ABSTRACT

The main olfactory bulb (MOB) is a highly plastic structure that modifies its configuration and function depending on sensory experience. Olfactory enrichment (OE), which involves prolonged passive exposure to different odors, induces a decrease in neuronal death and increases neurogenesis in the MOB. Those effects positively correlate with an improvement in the ability to discriminate odors. However, until now, it is not known whether OE can modify the bulbar neural network activity and if such changes impact innate olfactory perception. Besides, OE decreases the hyperphosphorylation of Tau protein, a molecular marker in Alzheimer's disease (AD). AD is also associated with an increase in amyloid-beta peptide (A β) levels in the MOB, which is associated with early olfactory dysfunction. For this reason, we set out to assess the potential protective effect of OE against the alterations produced by A β in the MOB. Our results indicate that OE induces plastic modifications in the MOB, reflected as an increase in the area and a decrease in the number of odor-activated glomeruli. These plastic changes are associated with less overlapped glomerular maps. OE also decreased the power of low-frequency oscillations (<12Hz) and increased high-frequency oscillations (>12Hz) during spontaneous and odor-induced activity in the MOB. These findings positively correlated with increased BDNF levels in the MOB and improved innate olfactory discrimination and identification of odors at low concentrations. Finally, here we show that OE prevents the decrease in neuronal network activity induced by A β . Likewise, OE prevents alterations induced by A β peptide on fine discrimination, evaluated in the olfactory Go/No-Go discrimination task. Finally, we show that, even in presence of A β , EO significantly reduces bulbar A β levels and increases bulbar BDNF levels. These results suggest that the plasticity changes induced by OE in the MOB could protect it against the alterations induced by A β during AD.

INTRODUCCIÓN

El bulbo olfatorio principal (BOP) es el primer sitio de procesamiento de la información olfatoria en el sistema nervioso central (Nagayama *et al.*, 2014; Kay, 2015). En los mamíferos, presenta una estructura laminar compuesta por múltiples capas (Nagayama *et al.*, 2014; Kay, 2015). Cada una de estas capas presenta diferentes tipos de neuronas que reciben su nombre, en muchos casos, dependiendo de la capa en la cual se encuentran sus somas (Nagayama *et al.*, 2014). Los tipos celulares que componen al BOP son las células yuxtaglomerulares (Kosaka *et al.*, 1998; Kosaka *et al.*, 2005), las células mitrales (CM-Bourne & Schoppa, 2017; Bagnoli & FitzGerald, 2018), las células empenachadas (Bourne & Schoppa, 2017) y las células granulares (CG- Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Dentro de la clasificación de células yuxtaglomerulares, se encuentran las células periglomerulares (PG), las empenachadas externas (ET) y las células superficiales de axón corto (SSA; Fletcher *et al.*, 2009; Nagayama *et al.*, 2014). Todas las células yuxtaglomerulares están localizadas en pequeños módulos de información llamados “glomérulos” (Shepherd & Greer, 1998). Los glomérulos son neuropilos esféricos de aproximadamente 100-200 μm de diámetro (Pinching & Powell, 1971), donde arriban las terminales axónicas de las neuronas sensoriales (NSO) del epitelio olfatorio (Mori *et al.*, 1999; Figura 1). En los glomérulos, las NSO ejercen contactos sinápticos excitatorios glutamatérgicos con las dendritas apicales de las CM y las ET (Mori *et al.*, 1999). Paralelamente, se produce la activación de las células PG GABAérgicas quienes, a través de un mecanismo *feedforward*, inhiben a las CM del mismo glomérulo en una ventana temporal que permite la transducción de la señal olfatoria hacia el siguiente relevo neuronal cortical (Arruda *et al.*, 2013). Por otra parte, las ET se caracterizan por presentar ráfagas intrínsecas (Griff *et al.*, 2008; Dong & Ennis, 2014) y son más excitables que las CM (Griff *et al.*, 2008), por lo que responden a bajas concentraciones de aromas (Griff *et al.*, 2008). En cambio, las CM son menos sensibles al estímulo olfatorio, aumentando sus tasas de disparo y disminuyendo su latencia de disparo en función de la concentración de los aromas (Igarashi *et al.*, 2012). Cada glomérulo incluye las dendritas de aproximadamente 20 neuronas mitrales (Royet *et al.*, 1998). Aquellas CM que inervan a un glomérulo

son consideradas neuronas hermanas y presentan uniones comunicantes (Migliore *et al.*, 2005), que les permiten la amplificación de la información olfatoria (Migliore *et al.*, 2015). Recientemente, Dhawale y colaboradores (2011) describieron con técnicas de optogenética, que la estimulación de las NSO que expresan a la canalrodopsina-2 (ChR2) genera una activación de las CM hermanas altamente correlacionada entre sí (Dhawale *et al.*, 2011), reflejando fielmente la activación presináptica que arriba a su glómulo primario (Dhawale *et al.*, 2011). Lo anterior, genera, junto a la inhibición lateral, módulos de información específicos que responden a aromas particulares (Mori *et al.*, 1999) y contribuye a la producción de mapas de activación olfatoria en la superficie del BOP (Rubin & Katz, 1999), que pueden ser visualizados por diversas técnicas como la imagenología óptica de señales intrínsecas (Rubin & Katz, 1999), la imagenología de calcio (Economio *et al.*, 2016) o la resonancia magnética (Yang *et al.*, 1998). Por otro lado, si diferentes grupos de neuronas excitadoras e inhibitorias están interconectadas de manera ordenada y secuencial, se producen oscilaciones neuronales (Herrerias, 2016). Estas oscilaciones pueden ser monitoreadas por registros electrofisiológicos como el potencial de campo local (LFP; Buzsaki *et al.*, 2012). El LFP, como medida de la actividad cerebral, refleja el flujo de información a través de diferentes redes neuronales (Herrerias, 2016; Kay, 2014), donde las corrientes transmembranales, ya sea de una espina, una dendrita, un soma, un axón o una terminal axónica contribuyen, sobre todo cuando ocurre en sincronía, a las deflexiones de voltaje extracelular observadas en el LFP (Buzsaki *et al.*, 2012; Kay, 2014). En el BOP se han descrito diferentes ritmos oscilatorios poblacionales (Adrian, 1950; Kay *et al.*, 2015) que varían entre diferentes especies (Kay *et al.*, 2015). Algunos de estos ritmos han sido asociados con la presencia de estímulos olfatorios (Laurent & Davidowitz, 1994; Kay *et al.*, 2015), como las oscilaciones gamma y gamma rápido, que se encuentran dentro del rango de frecuencias de 40-100 Hz (Kay *et al.*, 2015). Actualmente, se sabe que la generación de las oscilaciones gamma puede ser regulada por la experiencia (Beshel *et al.*, 2007). Sin embargo, la interacción neuronal que las produce es inherente a la circuitería del BOP (Kay *et al.*, 2015). Por ejemplo, el origen de las oscilaciones gamma se encuentra de la sinapsis

dendrodendrítica que se establece entre las CM y las ET empenachadas glutamatérgicas con las CG GABAérgicas (Rojas-Libano & Kay, 2008). Estas sinapsis conducen a la inhibición *feedback* de las CM y empenachadas, generando una ventana temporal de inactivación para la generación del siguiente potencial de acción (Chen *et al.*, 2000). Diversos trabajos han demostrado que un incremento en la inhibición bulbar de estas sinapsis (Nusser *et al.*, 2000), así como tareas de condicionamiento operante para la discriminación de aromas, genera un incremento en la amplitud de las oscilaciones gamma en el BOP y la corteza olfatoria primaria (corteza piriforme; Nusser *et al.*, 2001; Beshel *et al.*, 2007; Ravel & Martín, 2003; Martin & Ravel, 2014), de manera simultánea al reforzamiento de las interacciones neuronales preexistentes (Nusser *et al.*, 2001; Beshel *et al.*, 2007; Ravel & Martín, 2003; Martin & Ravel, 2014). La modulación de las oscilaciones gamma en el BOP se acopla a la fase de otro ritmo de oscilaciones lentas en el BOP, conocidas como ritmo theta (Buonviso *et al.*, 2003). En roedores, el surgimiento de estos patrones oscilatorios lentos es dependiente de la frecuencia respiratoria, cuyo rango de frecuencia es de 4-12 Hz (Adrian, 1942; Buonviso *et al.*, 2003; Kepecs *et al.*, 2005; Kay, 2014).

La enfermedad de Alzheimer (EA) constituye una de las patologías neurodegenerativas del sistema nervioso central (Villegas, 2015) y es el tipo más común de demencia (Wang *et al.*, 2017). Actualmente, la EA es incurable (Wang *et al.*, 2017) y afecta mayoritariamente a pacientes de edad avanzada (Bekris *et al.*, 2010). En México, la tasa de envejecimiento crece desmesuradamente y se estima que para el año 2050 un cuarto de la población pertenezca al grupo de edad más vulnerable a la EA (50-60 años; Roa-Rojas *et al.*, 2017). Con lo que se prevé un total de 3.5 millones de personas con EA en ese mismo año (Roa-Rojas *et al.*, 2017). La mayoría de los casos reportados con EA son de etiología desconocida y sólo un 6% de ellos pueden ser explicados por alteraciones genéticas en los genes que codifican para las proteínas APOE, APP, PSEN1 y PSEN2 (Bekris *et al.*, 2010). La etiología de la EA presenta diferentes estadios (Braak & Braak, 1991). En las etapas preclínicas, previo al deterioro cognitivo, existe una pérdida de la capacidad olfatoria (Masurkar & Devanad, 2014). Este hallazgo es relevante, ya que resulta en una

posibilidad de detección temprana de la EA y en un blanco terapéutico importante para el tratamiento temprano de la patología (Doty *et al.*, 1987; Wesson *et al.*, 2010). Este deterioro temprano en la olfacción se ha relacionado con un incremento en los niveles del péptido β -amiloide (P β A) soluble (Armstrong, 2009; Wesson *et al.*, 2010) y, de forma más tardía, con la aparición de placas seniles y ovillos neurofibrilares en el BOP (Attems & Jellinger, 2006; Armstrong, 2009; Wu *et al.*, 2013). Además, en el epitelio olfatorio de pacientes con EA leve, se ha reportado un incremento de agregados del P β A y de la proteína Tau hiperfosforilada (Crino *et al.*, 1995; Arnold *et al.*, 2010). Lo anterior, correlaciona con una disminución de NSO inmunoreactivas a calbindina-D28k (Yamagishi *et al.*, 1996), una proteína que protege a las células de la degeneración producida por una elevación del calcio intracelular (German *et al.*, 1997), que es característico del desarrollo de la EA (Lampinen *et al.*, 2022). La conectividad de las NSO (en la periferia) con el BOP (en el SNC) ha permitido proponer la administración de fármacos intranasales para el tratamiento de la EA, como las vacunas (Lemere *et al.*, 2010; Sipos *et al.*, 2010), el factor de crecimiento nervioso (Capsoni *et al.*, 2002) y la insulina (Reger *et al.*, 2008). Los cuales han mostrado tener efectos positivos en diferentes regiones cerebrales como las cortezas frontal, precuneal, cuneal y parietotemporal (Craft *et al.*, 2012), mejorando funciones cognitivas como la memoria (Roger *et al.*, 2008). Con estas aproximaciones, se espera en un futuro detener el avance progresivo de la enfermedad hacía otras regiones corticales aprovechando la conexión privilegiada del epitelio olfatorio periférico con el BOP (Figura 1).

El BOP presenta conexiones con diferentes regiones cerebrales que son afectadas tempranamente en la EA (Christen-Zaech *et al.*, 2003), como la corteza piriforme, el complejo nuclear amigdalino, el giro parahipocampal, y la corteza entorrinal (Nagayama *et al.*, 2010). Por ello, el deterioro en la función del BOP se relaciona con una disminución en la memoria y la detección de aromas en los pacientes con la EA (Kotecha, 2018). Lo anterior, posiblemente como resultado de un incremento en los niveles del P β A, en su estado soluble (Wesson *et al.*, 2010), particularmente en su secuencia de 42 aminoácidos (El-Agnaf *et al.*, 2000; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). La secuencia de 42 aminoácidos del P β A (P β A₁₋₄₂) es considerada como una

de las más tóxicas para el cerebro durante el desarrollo de la EA (El-Agnaf *et al.*, 2000). El P β A₁₋₄₂ induce una disrupción en la actividad neuronal, en términos de alteraciones en la transmisión sináptica y en la dinámica de la red neuronal de diversos circuitos, incluyendo al BOP (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Alcantara-Gonzalez *et al.*, 2019; Peña-Ortega, 2019). Tratar de entender cómo todas estas alteraciones inducen modificaciones genéticas, moleculares, celulares y conductuales que conllevan a la pérdida olfatoria en los pacientes con EA ha sido motivo de diversos estudios (Cavanaugh *et al.*, 2014; Salgado-Puga & Peña-Ortega, 2015). Con ello, surge la necesidad de emplear modelos experimentales que simulen el fenotipo y el genotipo que conlleva a la disfunción olfatoria de los pacientes con EA (Cavanaugh *et al.*, 2014; Salgado-Puga & Peña-Ortega, 2015). Actualmente, una de las aproximaciones más empleadas, es el uso de animales transgénicos que expresan diferentes mutaciones, principalmente en el gen que codifica para la APP y que se han identificado en pacientes que padecen la EA familiar (Goate & Hardy, 2012; Cavanaugh *et al.*, 2014). El descubrimiento de las mutaciones en el gen que codifica para la APP humana asociadas al surgimiento de la EA familiar (Lamb *et al.*, 1997, 1999), han permitido la creación de diversos modelos transgénicos cuyas mutaciones fueron detectadas en familias de Holanda (E693Q; Levy *et al.*, 1990), Suecia (APP_{swe}/K670N/M671L; Mullan *et al.*, 1992), Londres (V717I; Goate *et al.*, 1991), Indiana (V717F; Murrel *et al.*, 1991), Iowa (D694N Grabowski *et al.*, 2001), el Ártico (E693G; Nilsberth *et al.*, 2001) y Florida (I716V; Eckman *et al.*, 1997), entre muchas otras. La expresión de transgenes con estas mutaciones en roedores, así como su coexpresión con otros transgenes, como mutaciones al gen que codifica para la presenilina 1 (APP_{swe}/PS1), ha mostrado alterar la función olfatoria en roedores (Liu *et al.*, 2013). El equipo de trabajo de Liu y colaboradores (2013) reportó que los animales transgénicos APP_{swe}/PS1 presentan una disminución en la coherencia del LFP del BOP, en las bandas de frecuencia, theta (2-12 Hz), beta (15-35 Hz) y gamma (35-65 Hz; Liu *et al.*, 2013). Lo anterior, se relacionó con una reducción en la capacidad para detectar y discriminar estímulos olfatorios, como consecuencia de las mutaciones que conllevan a la sobreproducción del P β A (Liu *et al.*, 2013). Otra de

las aproximaciones para estudiar este fenómeno ha sido la administración de oligómeros del P β A₁₋₄₂ directamente en el bulbo olfatorio (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Hernández-Soto, 2015; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2019). En nuestro laboratorio, hemos observado que el BOP de roedores es especialmente sensible a los efectos deletéreos del P β A₁₋₄₂ tanto en preparaciones *in vitro* como *in vivo* (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Hernández-Soto, 2015; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2019). Por ejemplo, la administración crónica del P β A₁₋₄₂ en el BOP altera las interacciones neuronales y genera disfunción olfatoria, modificando la detección y discriminación de los estímulos olfatorios (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Hernández-Soto, 2015; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2019). Así mismo, la administración aguda del P β A₁₋₄₂ disminuye la conectividad funcional entre ambos bulbos olfatorios, lo que correlaciona fuertemente con las alteraciones en la potencia de la actividad oscilatoria del bulbo olfatorio y la olfacción *per se* (Hernández-Soto *et al.*, 2019). Estos hallazgos proveen una relación directa entre la administración del P β A₁₋₄₂ y las alteraciones sobre la red neuronal del bulbo olfatorio, lo que conlleva a una disfunción olfatoria en roedores que podría ser extrapolada a pacientes que cursan con la EA (Hernández-Soto *et al.*, 2019).

Se han realizado diversos esfuerzos con la finalidad de aminorar los efectos deletéreos del P β A₁₋₄₂, entre los que se encuentra la estimulación sensorial o el enriquecimiento ambiental (Lazarov *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2007) y el ejercicio (Isla *et al.*, 2016). Estas aproximaciones terapéuticas no-farmacológicas generan modificaciones neuronales importantes en regiones involucradas con procesos de memoria y aprendizaje, como el hipocampo y la corteza prefrontal (Melani *et al.*, 2017). Particularmente, el enriquecimiento ambiental (EE), una condición de alojamiento donde son añadidos diferentes estímulos sensoriales, motores y sociales (Frick *et al.*, 2003), disminuye el deterioro cognitivo en roedores, asociado a procesos patológicos como lesiones cerebrales, traumatismos, la enfermedad de Huntington (Spires *et al.*, 2004), el síndrome de Down, la enfermedad de Parkinson y la EA (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el EE induce estos beneficios son poco claros (Nithianantharajah & Hannan,

2006). Entre las posibles causas de los efectos terapéuticos del EE se encuentra un incremento en el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Ickes *et al.*, 2000) y de la neurogénesis en el hipocampo (Kempermann *et al.*, 1997; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005) y en la corteza cerebral (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Adicionalmente, el EE altera la expresión de los receptores tipo N-metilo-D-aspartato (NMDA) y tipo α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-izoxazolpropiónico (AMPA), lo que favorece la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP, Tang *et al.*, 2001). Lo anterior también regula procesos involucrados en la memoria y el aprendizaje (Tang *et al.*, 2001). Dada la complejidad de las modificaciones moleculares, celulares y conductuales que se presentan tras el EE (Nithianantharajah & Hannan, 2006), se ha propuesto el uso de diferentes ambientes enriquecidos que buscan la estimulación de sistemas sensoriales muy particulares (Rose *et al.*, 1972; Martončíková *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2018). Entre ellos, destaca el enriquecimiento acústico (Yamashita *et al.*, 2018), el visual (Rose *et al.*, 1972) y el enriquecimiento olfatorio (EO; Martončíková *et al.*, 2011). Este último tipo de estimulación sensorial presenta diferentes variantes como el entrenamiento olfatorio (Haehner *et al.*, 2013) y el aprendizaje olfatorio (Escanilla *et al.*, 2008). El EO consiste en la exposición crónica a una gran variedad de aromas naturales y/o sintéticos, con o sin la participación activa de los sujetos expuestos (Haehner *et al.*, 2013; Martončíková *et al.*, 2011). Se sabe que el EO es capaz de disminuir la hiperfosforilación de la proteína Tau en serinas y treoninas particulares, como la T231, la S396 y la S404 (Liao *et al.*, 2012). Lo anterior, resulta relevante para patologías como la EA donde existe un incremento en la hiperfosforilación de la proteína Tau, lo que resulta en la formación de ovillos neurofibrilares en el cerebro de los pacientes (Bakota & Brandt, 2016). En otras patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, el EO ha demostrado mejorar la capacidad olfatoria de los pacientes, específicamente la identificación, la discriminación y la detección de estímulos olfatorios a bajas concentraciones (Haehner *et al.*, 2013). Asimismo, el EO induce una disminución de la muerte neuronal (Martončíková *et al.*, 2011) y un incremento de la neurogénesis en el hipocampo y el BOP (Rusznak *et al.*, 2018; Martončíková *et al.*, 2011). Además, el EO incrementa el número de

neuronas TH+ en la capa glomerular (Bonzano *et al.*, 2014) y el de neuronas GABAérgicas granulares del BOP (Rochefort *et al.*, 2002). Este incremento en la densidad celular del BOP se ha asociado con una mejora en la capacidad para discriminar aromas en roedores (Livneh *et al.*, 2014; Sakamoto *et al.*, 2014). Lo anterior, indica que el EO no sólo induce modificaciones plásticas en las interacciones neuronales de la red bulbar, sino que además podría ejercer un efecto terapéutico importante en patologías neurodegenerativas como la EA. Por ello, en este trabajo evaluamos el efecto del EO en la fisiología bulbar y su posible efecto protector sobre las alteraciones producidas por el P β A₁₋₄₂ que, como ya se ha mencionado, incrementa considerablemente en la EA.

El sistema olfatorio

Nuestros sistemas sensoriales se han desarrollado para identificar, evaluar y predecir los estímulos ambientales (Kringelbach & Stein, 2010). En particular, el sistema olfatorio permite la ejecución de conductas que son cruciales para la supervivencia y la reproducción (Kay, 2015; Choi *et al.*, 2018). Estudios en diferentes organismos indican que el olfato es el más antiguo de los sistemas sensoriales (Hoover, 2010), ya que no presenta relevos importantes a nivel del tálamo para el procesamiento de la información olfatoria en el sistema nervioso central (Hawkes & Doty, 2009). Algunos investigadores han argumentado que, en comparación con otros organismos, los humanos no dependen del sentido del olfato más que de otros sentidos como el oído y la vista (Jacobs, 2009). Sin embargo, esto no es del todo cierto, ya que, al igual que en otros organismos, el olfato permite localizar e identificar las fuentes de alimento de forma similar a otras especies (McGann, 2009). Tal como fue reportado recientemente por McGann (2009), quien mostró que los humanos son capaces de detectar fielmente concentraciones muy bajas de determinadas moléculas olfatorias, de manera comparable con otros organismos como los perros y los roedores (McGann, 2017). Este tipo de investigaciones pretenden desmitificar la supuesta pobre capacidad olfatoria en los humanos (McGann, 2017). En general, la detección de los estímulos químicos volátiles y las feromonas depende de dos subsistemas, el sistema olfatorio principal

(SOP) y el sistema olfatorio accesorio (SOA) respectivamente y cada uno de ellos recibe información proveniente del epitelio olfatorio, que forma parte del sistema olfatorio periférico (Vargas-Barroso *et al.*, 2017). A continuación, se detallarán dichos sistemas.

Anatomía y organización del sistema olfatorio periférico

Los humanos somos capaces de discriminar más de un trillón de estímulos olfatorios (Bushdid *et al.*, 2014), gracias a la gran cantidad de receptores que se expresan en las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio (Bushdid *et al.*, 2014). El epitelio olfatorio es un órgano periférico localizado a lo largo de la *lamella* vertical medial superior (Choi *et al.*, 2018) en la parte superior de la cavidad nasal, por debajo de la placa cribiforme en el *septum* nasal y en las turbinas superiores (Van Riel *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2018). En humanos, el epitelio olfatorio ocupa una superficie de 10 cm² en cada una de las cavidades nasales (Boron & Boulpaep, 2012). Aquí se ubican las neuronas sensoriales olfatorias (Bushdid *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2018). En la profundidad de este epitelio, se encuentran las células basales y las células de soporte (Moran *et al.*, 1982), en la región medial se ubican los somas de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO; Moran *et al.*, 1982). Las NSO son neuronas bipolares que extienden una dendrita al espacio aéreo de la superficie epitelial y extienden un axón muy delgado (0.2-0.3 µm) a través de la base del epitelio que se une con otros axones de otras NSO y dan lugar al primer par craneal (Van Riel *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2018). El nervio olfatorio o par craneal I, está conformado principalmente por axones de las NSO que conectan a la cavidad nasal con el sistema nervioso central (Van Riel *et al.*, 2015). Las NSO que expresan un receptor olfatorio específico convergen en un único glomérulo en la superficie del BOP, donde hacen sinapsis con las células mitrales y empenachadas (Muroyama *et al.*, 2016), así como con diferentes tipos de interneuronas (Crespo *et al.*, 1997). La activación de los glomérulos olfatorios específicos (mapas glomerulares), constituye el primer paso para el procesamiento de la información sensorial olfatoria (Choi *et al.*, 2018). El conteo de los receptores olfatorios en humanos indica que su densidad es de aproximadamente 30 000 por mm² o de 6 millones en la nariz (Moran *et al.*,

1982). Estudios realizados en humanos (Katada *et al.*, 2005; Holbrook *et al.*, 2011) y otros mamíferos, señalan que las NSO poseen inmunoreactividad selectiva para diferentes receptores olfatorios de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs; Katada *et al.*, 2005), de la familia G_{olf} (Katada *et al.*, 2005) (Choi *et al.*, 2018; Ihara *et al.*, 2018). Cada NSO expresa un único receptor olfatorio, siguiendo la regla “un receptor, una neurona” (Mombaerts, 2004), por lo que esos GPCRs se utilizan como marcadores proteicos. Las NSO presentan, además, al glutamato como principal neurotransmisor (Berkowicz *et al.*, 1994).

Debido a su posición en la nariz y a su contacto permanente con el aire inspirado, las NSO son consideradas altamente vulnerables, lo que conduce a su daño o pérdida (Deckner *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2018) y a su reemplazo constante (Watson *et al.*, 2012). Las glándulas de Bowman, ubicadas en la profundidad del epitelio olfatorio, proveen a las NSO microambiente que contribuye a su homeostasis (Solbu & Holen, 2012). Estas glándulas son de naturaleza tubuloalveolar (Solbu & Holen, 2012; Choi *et al.*, 2018). Las glándulas de Bowman presentan ductos que se extienden a la superficie del epitelio olfatorio (Ross & Pawlina, 2007), donde secretan un fluido seroso que contribuye a la formación del moco que recubre al epitelio olfatorio y que contribuye al mantenimiento de las NSO (Solbu & Holen, 2012). Estudios señalan que las NSO pueden sobrevivir meses (Choi *et al.*, 2018). Hallazgos recientes indican que las NSO ubicadas dorsomedialmente sobreviven más tiempo que las que se encuentran ventrolateralmente, quizá debido a diferencias en su expresión de ciertas enzimas detoxificantes (Choi *et al.*, 2018). El reemplazo de las NSO es posible por la presencia de células troncales basales y células progenitoras en el BOP (Ross & Pawlina, 2007). La zona germinal basal del epitelio olfatorio es un nicho neurogénico activo, capaz de producir nuevas NSO (Choi *et al.*, 2018). En los vertebrados el reemplazo de las NSO y su respuesta frente a estímulos está regulado por las células inmunes, como las células envolventes olfatorias (OEC), que recubren a los axones de las NSO y presentan actividad fagocítica (Mackay-Sim, 2012; Bryche *et al.*, 2019; Ualiyeva *et al.*, 2020). Así mismo, las células microvellosas (CMV), un subtipo de células de soporte del epitelio olfatorio, inducen respuestas inmunes

contra alérgenos (Bryche *et al.*, 2021). Por ejemplo, las CMV que expresan altos niveles de interleucina-25 y que generan cisteinil-leucotrienos en respuesta al ATP o a alérgenos, participan en la vigilancia de respuestas inmunitarias locales (Ualiyeva *et al.*, 2020). En el caso de los peces, la interacción de las NSO con ciertos virus, como el rhabdovirus, induce el reclutamiento de células T CD8+ provenientes del bulbo olfatorio (Sepahi *et al.*, 2019). Lo anterior, ocurre posiblemente a través del acople de las glicoproteínas virales con los TrkA de las NSO (Sepahi *et al.*, 2019). Lo que sugiere que las NSO en estos vertebrados podrían ejercer funciones relacionadas con la detección de patógenos y la activación de la respuesta inmune (Sepahi *et al.*, 2019). La propagación transneuronal de los virus del epitelio olfatorio al BOP, conduce a la expresión de óxido nítrico y a la regulación del complejo principal de histocompatibilidad I y II por parte de los astrocitos, la microglía y las células endoteliales, contribuyendo con la supervivencia neuronal (Durrant *et al.*, 2016). En general, la inducción de la respuesta inmune en el epitelio y las mucosas olfatorias, que puede inducirse por la administración intranasal de fármacos y vacunas, representa una alternativa para aminorar los efectos de distintas enfermedades incluyendo la EA (Takeuchi *et al.*, 2020).

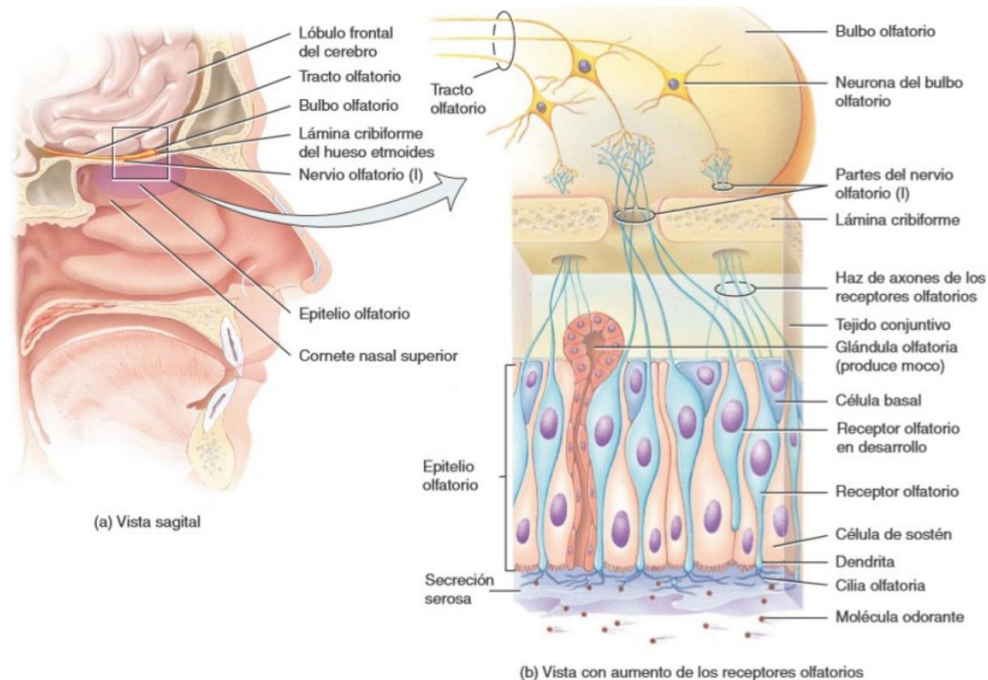


Figura 1. Sistema olfatorio periférico. El sistema olfatorio periférico está constituido por dos regiones, la mucosa nasal y el epitelio olfatorio (a). En esta última, se localizan las neuronas sensoriales olfatorias (NSO; b), que son células bipolares que proyectan sus cilios a la mucosa nasal donde se ubican las moléculas odorantes. Las NSO envían sus axones a través del tracto olfatorio al bulbo olfatorio principal, transmitiendo la señal eléctrica producto de la transducción de la información olfatoria hacia el SNC. El reemplazo de las NSO depende de las células basales que se localizan en la profundidad del epitelio olfatorio. En el epitelio olfatorio también se encuentran dos tipos de células de soporte de las NSO: las células sustentaculares y las células microvellosas (CMV). Las CMV además inducen respuestas inmunes contra alérgenos presentes en la mucosa nasal. Modificado de Tortora & Derrickson, 2017.

Sistema olfatorio accesorio

El sistema olfatorio accesorio (SOA) participa activamente en la reproducción, modificando conductas y respuestas fisiológicas, que permiten la selección de pareja, la reproducción y el cuidado parental y la dominancia territorial (Luo *et al.*, 2003). Este sistema está conformado por las neuronas sensoriales vomeronasales localizadas en el órgano vomeronasal (Mohrhard *et al.*, 2018). El SOA está conformado por el bulbo olfatorio accesorio (BOA), que presenta una región anterior y otra posterior, que se conectan recíprocamente (Vargas-Barroso *et al.*, 2016). El SOA tiene la capacidad de detectar compuestos químicos no volátiles como las feromonas (Doty, 2010), emitidas mayormente por conoespecíficos, que generan

respuestas conductuales específicas (innatas) en los individuos que las perciben (Vandenbergh, 1969).

El SOA produce interacciones complejas con el sistema olfatorio principal (Martel & Baum, 2007). Por ejemplo, la actividad del SOA aumenta tras la estimulación con compuestos volátiles, un efecto que está relacionado con la activación de las NSO en el epitelio olfatorio y no del órgano vomeronasal (Martel & Baum, 2007). Lo anterior sugiere que ambos sistemas interactúan funcionalmente. De hecho, los registros electrofisiológicos realizados por Vargas-Barroso y colaboradores (2016) han determinado la existencia de proyecciones axónicas del bulbo olfatorio accesorio (BOA) al bulbo olfatorio principal (BOP; Figura 2; Vargas-Barroso *et al.*, 2016). Estas conexiones pueden reclutar interneuronas localizadas en el limbo olfatorio, que divide al BOA y al BOP (Vargas-Barroso *et al.*, 2017), pero que también funciona como interfase entre los mismos (Vargas-Barroso *et al.*, 2017).

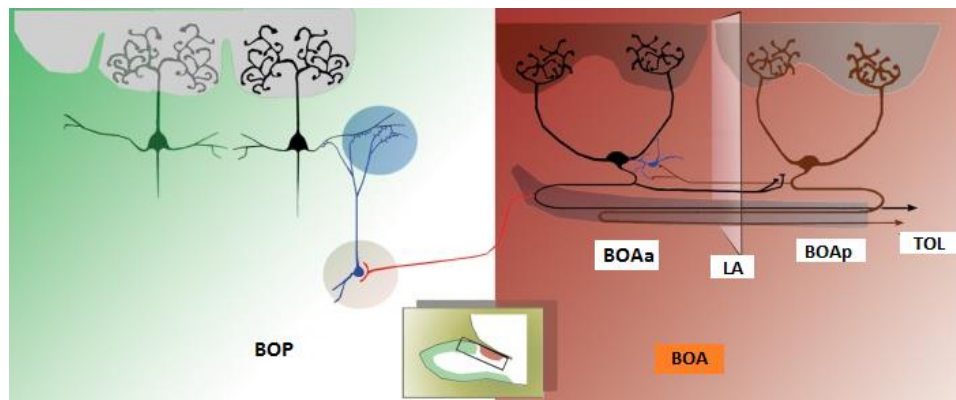


Figura 2. Conexión entre el BOA y el BOP. El BOA envía fibras colaterales a las interneuronas localizadas en la región dorsal del MOB. BOP: Bulbo olfatorio principal. BOA: Bulbo olfatorio accesorio. LA: línea alba. BOAa: Bulbo olfatorio accesorio anterior. BOAp: Bulbo olfatorio accesorio posterior. TOL: Tracto olfatorio lateral. Tomado de Vargas-Barroso *et al.*, 2016.

Diversos trabajos han demostrado que las señales químicas que activan al SOA influyen en la fisiología y la conducta de diversas especies. Por ejemplo, la exposición a feromonas masculinas acelera el inicio de la pubertad femenina en diferentes especies, incluidos ratones (Vandenbergh, 1969), hámsteres (Reasner & Johnston, 1988) y ovejas (Knight *et al.*, 1975). Este fenómeno fue descrito por primera vez por Vandenbergh (1969) y, actualmente, recibe su nombre, “*Efecto Vandenbergh*”. Así mismo, si una hembra que ha sido inseminada por un macho es expuesta a la orina o a la presencia de otro macho, se induce un aborto espontáneo, en un fenómeno conocido como “*Efecto Bruce*” (Bruce, 1959). Existe evidencia de que los estrógenos no conjugados secretados en la orina de los roedores masculinos y que son percibidos por el órgano vomeronasal inducen la interrupción del embarazo (deCatanzaro, 2011).

El bulbo olfatorio principal

El bulbo olfatorio principal (BOP) es el primer sitio de procesamiento de la información olfatoria en el sistema nervioso central (Kay, 2015). El BOP se divide en múltiples capas (Figura 3; Nagayama *et al.*, 2014). Las neuronas en el BOP se categorizan dependiendo de la capa en la cual se encuentran sus somas (Nagayama *et al.*, 2014). Los tipos celulares más comunes del BOP son las células yuxtaglometrulares (Kosaka *et al.*, 1998; Kosaka *et al.*, 2005), las células mitrales (CM-Bourne & Schoppa, 2017; Bagnoli & FitzGerald, 2018), las células empenachadas (Bourne & Schoppa, 2017) y células granulares (CG- Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Dentro de la clasificación de células yuxtaglomerulares, se encuentran las células periglomerulares (PG), las empenachadas externas (ET, por sus siglas en inglés) y las células superficiales de axón corto (SSA- por sus siglas en inglés; Fletcher *et al.*, 2009; Nagayama *et al.*, 2014). El bulbo olfatorio presenta pequeños módulos de información llamados “glomérulos” (Shepherd & Greer, 1998). Los glomérulos son neuropilos esféricos de aproximadamente 100-200 μm de diámetro (Pinching & Powell, 1971), conformados por las dendritas de las células CM, PG, ET y SSA (Pinching & Powell, 1971). Los axones de las NSO inervan los glomérulos generando contactos sinápticos excitatorios glutamatérgicos con las

dendritas apicales de las CM y ET (Mori *et al.*, 1999). Paralelamente, se produce la activación de las células PG GABAérgicas quienes, a través de un mecanismo *feedforward*, inhiben a las CM del mismo glomérulo en una ventana temporal que permite la transducción de la señal olfatoria hacia el siguiente relevo neuronal cortical (Arruda *et al.*, 2013). Las ET son consideradas intrínsecamente rafagueadoras (Griff *et al.*, 2008; Dong & Ennis, 2014) y son más excitables que las CM (Griff *et al.*, 2008), por lo que responden a bajas concentraciones de aromas (Griff *et al.*, 2008). En cambio, las CM son menos sensibles, aumentando sus tasas de disparo y disminuyendo su latencia de disparo en función de la concentración de los aromas (Igarashi *et al.*, 2012).

Cada glomérulo incluye las dendritas de aproximadamente 20 neuronas mitrales (Royet *et al.*, 1998). Aquellas CM que inervan a un glomérulo son consideradas neuronas hermanas y presentan uniones comunicantes (Migliore *et al.*, 2005), que les permiten la amplificación de la información olfatoria (Migliore *et al.*, 2015). Recientemente, Dhawale y colaboradores (2011) describieron con técnicas de optogenética, que la estimulación de las NSO que expresan a la canalrodopsina-2 (ChR2, por sus siglas en inglés) genera una activación de las CM hermanas altamente correlacionada entre sí (Dhawale *et al.*, 2011), reflejando fielmente la activación presináptica que arriba a su glomérulo primario (Dhawale *et al.*, 2011). Lo anterior genera, junto a la inhibición lateral, módulos de información específicos que responden a aromas particulares (Mori *et al.*, 1999). Esto también contribuye a la producción de mapas de activación olfatoria en la superficie del BOP (Rubin & Katz, 1999), que pueden ser visualizados por diversas técnicas como la imagenología óptica de señales intrínsecas (Rubin & Katz, 1999), la imagenología de calcio (Economio *et al.*, 2016) o la resonancia magnética (Yang *et al.*, 1998).

Si diferentes grupos de neuronas excitadoras e inhibitoras están interconectadas, se producen oscilaciones neuronales (Herreras, 2016). Tal es el caso de las conexiones que ocurren entre las células mitrales y empenachadas que son las células glutamatérgicas de proyección y las células granulares GABAérgicas bulbares (Rojas-Libano & Kay, 2008). Estas oscilaciones pueden ser monitoreadas

por registros electrofisiológicos como el potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés- Buzsaki *et al.*, 2012). El LFP como medida de la actividad cerebral refleja el flujo de información a través de diferentes redes neuronales (Herrerías, 2016), donde las corrientes transmembranales de cualquier membrana excitable, ya sea de una espina, una dendrita, un soma, axón o terminal axónica contribuyen a las deflexiones de voltaje observadas en el LFP (Buzsaki *et al.*, 2012). En el BOP se han sido descritos diferentes ritmos oscilatorios poblacionales (Adrian, 1950; Kay *et al.*, 2015). Algunos de estos ritmos han sido asociados con la presencia de estímulos olfatorios (Laurent & Davidowitz, 1994; Kay *et al.*, 2015). Entre estos ritmos, se incluyen las oscilaciones gamma y gamma rápido, que se encuentran dentro del rango de frecuencias de 40-100 Hz (Kay *et al.*, 2015). Estas frecuencias varían en diferentes especies (Kay *et al.*, 2015). La generación de las oscilaciones gamma puede ser regulada por la experiencia (Beshel *et al.*, 2007). Sin embargo, la interacción neuronal que las produce se mantiene (Kay *et al.*, 2015). Por ejemplo, el origen de las oscilaciones gamma proviene de la sinapsis dendrodendrítica de las CM y las ET empenachadas glutamatérgicas con las CG GABAérgicas (Rojas-Libano & Kay, 2008). Estas sinapsis conducen a la inhibición *feedback* de las CM y empenachadas, generando una ventana temporal de inactivación para la generación del siguiente potencial de acción. Diversos trabajos han demostrado que tareas condicionamiento operante para la discriminación de aromas genera un incremento en la amplitud de las oscilaciones gamma en el BOP y la corteza olfatoria primaria, reforzando las interacciones neuronales preexistentes (Martin & Ravel, 2014). En el BOP la modulación de las oscilaciones gamma depende de la fase de otro ritmo de oscilaciones lentas en el bulbo olfatorio, conocidas como ritmo theta (Buonviso *et al.*, 2003). En roedores, el surgimiento de estos patrones oscilatorios lentos es dependiente de la frecuencia respiratoria, cuyo rango de frecuencia es de 4-12 Hz (Adrian, 1942; Buonviso *et al.*, 2003; Kepecs *et al.*, 2005).

El bulbo olfatorio principal en humanos

El BOP de los humanos presenta la misma organización laminar vista en modelos animales estudiados comúnmente (Maresh *et al.*, 2008; Figura 3). Sin embargo, el

bulbo olfatorio de los humanos parece diferir, en algunos aspectos, del de los roedores (Meisami *et al.*, 1997). El BOP de los humanos tiene cerca de 5000 glomérulos (Maresh *et al.*, 2008), por lo que se asume que hay una alta proporción de convergencia en los glomérulos de las proyecciones de las neuronas sensoriales olfatorias (Maresh *et al.*, 2008). En los ratones, las NSO que expresan el mismo OR inervan dos glomérulos y mientras que en el caso de los humanos las NSO que expresan el mismo OR inervan dieciséis glomérulos (Maresh *et al.*, 2008), este número puede variar con la edad (Doty *et al.*, 1984; Meisami *et al.*, 1997).

La organización laminar del BOP en humanos parece comparable a la descrita en roedores (Figura 3; Maresh *et al.*, 2008). Esto sugiere una preservación general de las propiedades funcionales del BO, previamente descritas en otros modelos animales (Maresh *et al.*, 2008). El número de células principales del BO, que inervan otras regiones corticales, parece no diferir entre humanos y roedores (Meisami *et al.*, 1988; Richard *et al.*, 2010). En humanos el número de CM es de 40000 (Meisami *et al.*, 1997), mientras que en roedores el número de CM es de 33000 por bulbo (Richard *et al.*, 2010). Esta organización permite el procesamiento de información sensorial olfatoria proveniente del medio ambiente (Kay *et al.*, 2015) y de la relacionada con el consumo de alimentos (Gautam & Verhagen, 2012; Ni *et al.*, 2015; Goldberg *et al.*, 2018).

Existen dos vías que permiten la percepción sensorial de los distintos estímulos olfatorios, la vía orthonasal y la vía retronasal. En la vía orthonasal durante la inhalación el aire entra por la cavidad nasal y transporta las moléculas olfatorias al epitelio olfatorio, donde se lleva a cabo el primer procesamiento de la vía olfatoria (Gautam & Verhagen, 2012). La vía retronasal, se efectúa mediante la estimulación de los receptores olfatorios por parte de los compuestos odorantes de los alimentos a través del aire exhalado (Ni *et al.*, 2015). En humanos, la olfacción retronasal permite la identificación de comida en descomposición, así como el consumo nutricional normal (Gautam & Verhagen, 2012; Choi *et al.*, 2018; Goldberg *et al.*, 2018). Sin embargo, el olfato puede sufrir diferentes alteraciones en su capacidad de percibir los estímulos odoríferos (Hummel *et al.*, 2011), disminuyendo la calidad

de vida de los pacientes (Hummel *et al.*, 2011). Estas alteraciones pueden incluir la pérdida total (anosmia- Jakef *et al.*, 2000) o parcial (hiposmia- Ishman *et al.*, 2003) del olfato. Ambas son parte de la etiología de muchas patologías, como la rinosinusitis, la concusión, los desórdenes olfatorios postvirales, la presbiosmia (declive olfatorio relacionado con la vejez; Choi *et al.*, 2018), los desórdenes genéticos, tales como el síndrome de Kallman (Gillespie *et al.*, 2013) y diferentes enfermedades del sistema nervioso central como la EA (Hüttenbrink *et al.*, 2013).

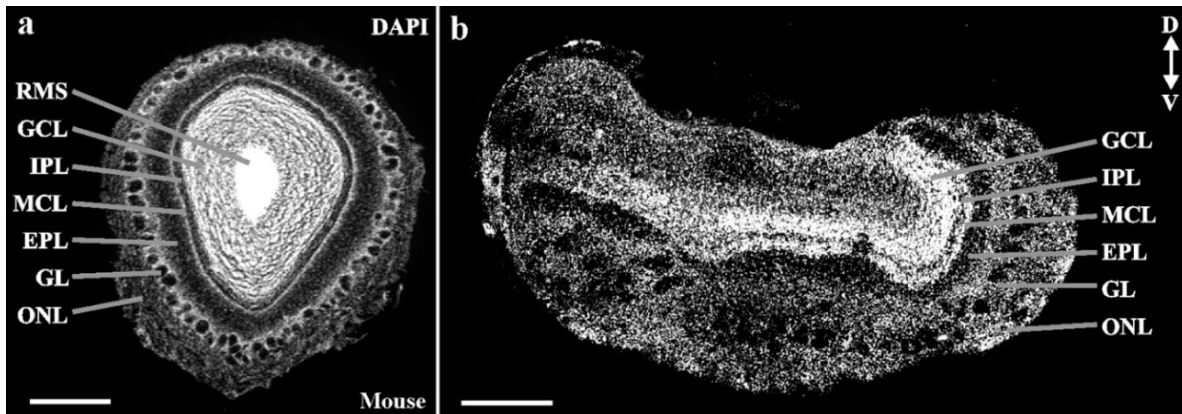


Figura 3. Organización laminar del BOP en roedores y humanos. a) Se muestra un corte coronal del BOP de un roedor y de un humano b) con una tinción que permite observar los núcleos celulares (DAPI). Se muestran las capas del BOP de humano equivalentes a las mostradas en el roedor. Barra de escala =500 μ m. RMS: corriente migratoria rostral. GCL: capa células granulares. IPL: Capa plexiforme interna. MCL: Capa células mitrales. EPL: Capa plexiforme externa. GL: capa glomerular. ONL: Capa de nervio olfatorio. Tomado de Maresh *et al.*, 2008.

Compuestos odorantes

Un amplio rango de compuestos orgánicos que, regularmente, presentan una región hidrofóbica y un peso molecular por debajo de 300, pueden ser percibidos como olores por los humanos (Choi *et al.*, 2018). La intensidad y la calidad de los aromas son dos propiedades que presentan los químicos odorantes que presentan una influencia en la percepción olfatoria (Rossiter, 1996). Las propiedades moleculares que presentan la mayoría de estas moléculas son un peso molecular moderado, una baja polaridad, cierta solubilidad en agua a alta presión de vapor y lipofilia (Meierhenrich *et al.*, 2004). Previamente a la unión con los receptores olfatorios transmembranales localizados en las NSO (Pelosi & Maida, 1990; Felten *et al.*, 2015), se ha hipotetizado que los odorantes están asociados a una proteína

transportadora de aromas (OT) presente en la mucosa del epitelio olfatorio (Figura 4; Pelosi & Maida, 1990; Felten *et al.*, 2015). Las OTs son proteínas solubles de bajo peso molecular (Pelosi, 1994) y forman parte de una gran familia de lipocalinas que comparten una estructura de barril tipo beta de ocho cadenas (Archunan, 2018). Son abundantes en la mucosa nasal de vertebrados, lo que permite su asociación con aromas y feromonas (Pelosi, 1994).

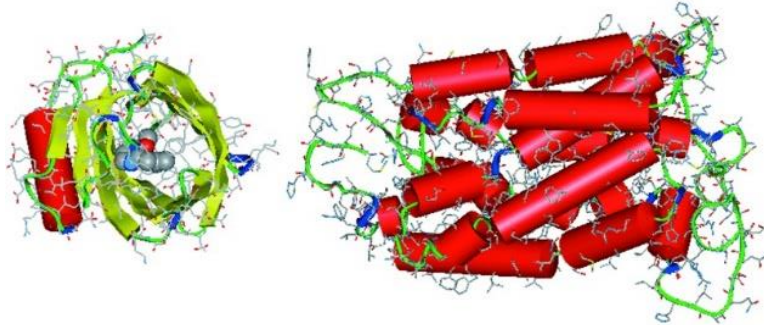


Figura 4. Estructura tridimensional de un complejo molecular entre el aroma 2-isobutil-3-metoxipirazina (en esferas) y una proteína transportadora de aromas (OT; izquierda) soluble en agua ubicada en la mucosa del epitelio olfatorio. La molécula olfatoria 2-isobutil-3-metoxipirazina (esferas de color gris, rojo y azul), de aroma floral, se une a la proteína OT en un sitio de unión específico (izquierda). Este complejo se une a los receptores acoplados a proteína G_{olf} (derecha) presentes en la membrana de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) del epitelio olfatorio. Tomado de Meierhenrich *et al.*, 2004.

Un solo aroma es capaz de activar diferentes receptores a odorantes y un solo receptor puede ser activado por diferentes aromas (Rubin & Katz, 1999; Antunes & Simoes de Souza, 2016). Esto implica una gran complejidad para la reconstrucción de los estímulos olfatorios a nivel del sistema nervioso central (SNC). Los trabajos de Buck y Axel en 1991 aportaron evidencia de una gran diversidad de genes que codifican para receptores olfatorios (RO; Buck & Axel, 1991). En el genoma humano existen cerca de 339 genes de ROs y 297 pseudogenes de ROs (Buck & Axel, 1991). Esta diversidad permite a los humanos distinguir más de un trillón de compuestos odorantes (Bushdid *et al.*, 2014).

Diversos trabajos han empleado a los compuestos odorantes como tratamiento sinérgico con medicamentos en diversas patologías. Los compuestos odorantes presentan propiedades anticancerígenas (Wattenberg, 1991; Yu *et al.*, 1995), analgésicas (Peana *et al.*, 2006), antiinflamatorias (Ramos *et al.*, 2006),

antibacterianas y antivirales (Primo *et al.*, 2001). Recientemente, su uso se ha extendido al tratamiento de la hiposmia en enfermedades neurodegenerativas, como es el caso del Parkinson (Haehner *et al.*, 2013).

Procesamiento sensorial de los compuestos odorantes en el sistema olfatorio

En el primer paso de la olfacción, cuando las moléculas odorantes son inspiradas, estas interactúan con muchas neuronas sensoriales olfatorias en la cavidad nasal (Choi *et al.*, 2018). El procesamiento de la información olfatoria, o transducción olfatoria, convierte la información química en impulsos eléctricos dentro de las NSO para la transmisión de señales en el sistema olfatorio (Figura 5; Purves *et al.*, 2001). Cuando una molécula odorante se une a los RO de las NSO, los activa y lleva a la activación de la proteína G_{olf} intracelular (Purves *et al.*, 2001), que media la estimulación de la adenilato ciclasa III, con lo que se produce un incremento del AMPc intracelular (Sklar *et al.*, 1986). El incremento de AMPc y la generación de óxido nítrico, que se produce por la asociación de la molécula odorante con los ROs, activa a la guanilato ciclasa soluble (sGC) lo que favorece el incremento de GMPc intracelular (Redolfi & Ludovichi, 2015). Este incremento del GMPc se presenta también, en un subgrupo de NSO en el epitelio olfatorio que expresan a la guanilato ciclasa D (GC-D; Juilfs *et al.*, 1997) y que son responsivas al CO_2 (Sun *et al.*, 2009). El incremento de GMPc en las NSO permite la apertura de canales iónicos dependientes de GMPc, permitiendo el ingreso de Ca^{2+} y Na^+ y la despolarización en estas neuronas (Sun *et al.*, 2009). Por otra parte, el incremento de GMPc intracelular induce la fosforilación de CREB en el núcleo (posiblemente mediante la actividad de la proteína cinasa A; PKA), favoreciendo la transcripción de genes involucrados en la guía axonal de las NSO al BOP (Pietrobon *et al.*, 2011; Redolfi & Ludovichi, 2015).

Por otro lado, en la vía canónica de la transducción de señales olfatorias (Figura 5), el AMPc en las NSO provoca la apertura de canales catiónicos no selectivos permeables al Ca^{2+} , K^+ y Na^+ , conocidos como canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG; Reisert & Bradley, 2005). Los CNG están distribuidos en mayor abundancia en la membrana ciliar de las NSO (Nakamura & Gold, 1987;

Firestein & Zufall, 1994). Nakamura y Gold (1987) demostraron la existencia de los CNG mediante la aplicación intracelular de AMPc y GMPc que producen un aumento en la conductancia de membrana de los cilios de las NSO (Nakamura & Gold, 1987). La activación de los CNG produce una corriente despolarizante (Firestein & Zufall, 1994) que produce potenciales de acción que se transmiten al BOP por el nervio olfatorio (Zou *et al.*, 2009). De forma indirecta se estimula a la fosfolipasa C (PLC) que genera inositol-1, 4,5-trifosfato (IP3) que activa a los canales de cationes dependientes de IP3, permitiendo la salida del Ca^{2+} de pozas internas hacia el medio intracelular; lo que contribuye a la despolarización de la NSO (FitzGerald *et al.*, 1994). El ingreso de Ca^{2+} induce una corriente de Cl^- dependiente de Ca^{2+} en los cilios olfatorios, permitiendo la salida de Cl^- intracelular, lo que contribuye con la despolarización de la membrana (Li *et al.*, 2016). Es importante destacar que la despolarización en las NSO también depende de la composición heterotrimérica de la proteína G_{olf} intracelular presente en los receptores olfatorios (Li *et al.*, 2013; Boto & Alcorta, 2013). Estudios previos realizados en ratones Gng13-KO, que no expresan las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ de la proteína G_{olf} , muestran una reducción en la amplitud del electroolfactograma obtenido durante la estimulación con aromas (Li *et al.*, 2013). Lo anterior, indica que las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$, participan activamente en la transducción de señales olfatorias (Li *et al.*, 2013; Boto & Alcorta, 2013).

La excitación de las NSO concluye a través de varios mecanismos (Lazard *et al.*, 1991; Kurahashi & Menini, 1997). Uno de ellos es la separación del odorante de los ORs y de la superficie quimiorreceptiva de los cilios de las NSO, probablemente por la acción de las OT (Lazard *et al.*, 1991). Sin embargo, la naturaleza lipofílica de algunos aromas hace difícil su eliminación del epitelio olfatorio (Lazard *et al.*, 1991). Para ello, algunos trabajos indican que las enzimas biotransformantes de amplio espectro (Lazard *et al.*, 1991), localizadas en la mucosa del epitelio olfatorio realizan modificaciones enzimáticas en los aromas que disminuyen su función agonista y favorecen su eliminación (Lazard *et al.*, 1991). Otro de los mecanismos que elimina la transducción olfatoria es la adaptación sensorial de los ORs de las NSO (Boccaccio *et al.*, 2006). El ingreso de Ca^{2+} a

través de los CNG ejerce una retroalimentación tipo *feedback* negativa que produce la desensibilización de corto plazo de los CNG (Kurahashi & Menini, 1997). Asimismo, el ingreso de Ca^{2+} inhibe a la adenilato ciclasa III reduciendo la generación de AMPc.

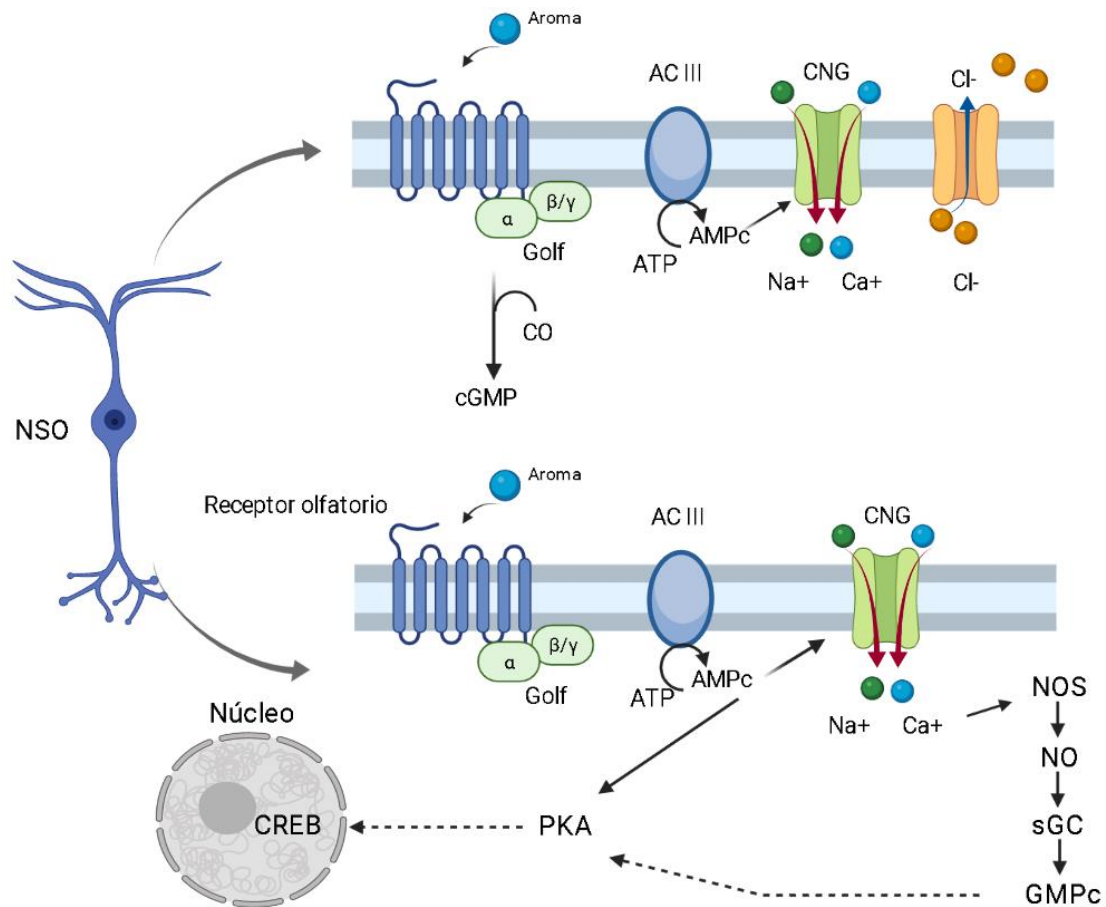


Figura 5. Vía canónica y no canónica de la transducción de señales de los receptores para odorantes. En la vía canónica (arriba), la unión de la molécula odorante con el receptor olfatorio acoplado a la proteína G_{olf}, presente en la membrana de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO), permite la activación de la adenilato ciclasa III (AC III). Lo anterior, conduce al incremento del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que permite la apertura del canal activado por nucleótidos cíclicos (CNG) y, en consecuencia, el ingreso de cationes, como Na^+ y Ca^{2+} , que despolarizan a la membrana celular. El Ca^{2+} , a su vez, activa un canal de Cl^- dependiente de Ca^{2+} , permitiendo la salida de Cl^- al medio extracelular y contribuyendo con la despolarización de las NSO. En la vía no canónica (abajo), el incremento del AMPc induce la activación de la proteína cinasa A (PKA) y del CNG. El incremento de Ca^{2+} intracelular, producido por la apertura del CNG, induce la activación de la sintasa de óxido nítrico (NOS) y, en consecuencia, el incremento de los niveles de óxido nítrico (NO). Esto permite la activación de la guanilil ciclasa soluble (sGC) que induce un incremento en los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) intracelular. El GMPc junto con el AMPc, modulan a la PKA, contribuyendo con la fosforilación de CREB en el núcleo. Lo que permite, la activación de programas génicos que llevan a la reorganización de las proyecciones axonales de las NSO al bulbo olfatorio. Modificado de Zou *et al.*, 2009 y Redolfi & Ludovichi, 2015.

Procesamiento cortical de las funciones olfatorias

El bulbo olfatorio envía la información a la corteza piriforme (CP; Figura 6; Choi *et al.*, 2018), una paleocorteza que presenta tres capas (Neville & Haberly, 2004). En roedores, la CP se encuentra en la región ventrolateral del encéfalo (Bekkers & Suzuki, 2013), mientras que en humanos se ubica en la unión de los lóbulos temporal y frontal, medial al tallo temporal (Mai *et al.*, 2008). Se ha estimado que la CP presenta en promedio 532 000 neuronas en cada hemisferio en los roedores (Srinivasan & Stevens, 2017), distribuidas en la región anterior (CPa) y posterior (CPp) de la CP. La CPa se distingue por la presencia del tracto olfatorio lateral y, funcionalmente, está relacionada con la identificación de los estímulos olfatorios (Neville & Haberly, 2004). Por su parte, la CPp se involucra en la calidad (concentración e identidad) de los estímulos (Gottfried, 2010).

La capa I de la CP recibe proyecciones del BOP a través del TOL (Shipley & Ennis, 1996). Está compuesta primordialmente de interneuronas GABAérgicas, las cuales realizan una inhibición tipo *feedforward* sobre las neuronas de la capa II, donde se localizan los somas de las neuronas piramidales quienes se encargan de la transmisión de la información hacia otras estructuras cerebrales, tales como la amígdala, la corteza entorrinal y el hipocampo (Bekkers & Suzuki, 2013). Finalmente, se encuentra la capa III que está compuesta en gran medida por interneuronas que realizan una inhibición tipo *feedback* a las neuronas de proyección de la capa III (Bolding & Franks, 2018). A pesar de que la representación de los aromas en esta corteza aún no está del todo clara, ya que la organización odotópica que se presenta en el epitelio y el bulbo olfatorio se pierde por completo en esta estructura (Stettler & Axel, 2009), actualmente sabemos que la corteza piriforme codifica parte importante de la identidad (Bolding & Franks, 2017), presencia y concentración (Bolding & Franks, 2018) de los aromas que son percibidos por los primeros centros de relevo del procesamiento de la información olfatoria, como el bulbo olfatorio y el núcleo olfatorio anterior (Bolding & Franks, 2018).

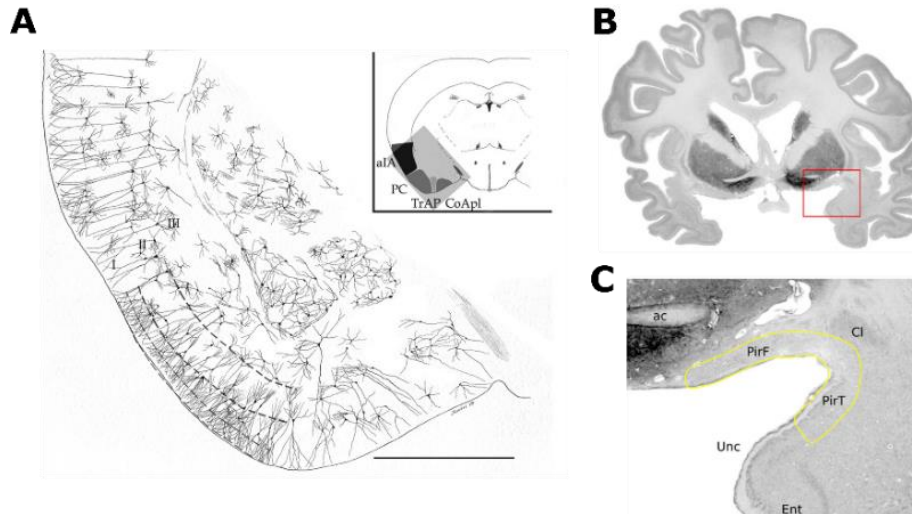


Figura 6. Corteza piriforme en ratones y humanos. A) Representación esquemática de la corteza piriforme en ratón, donde se muestra una sección coronal. Se muestran las tres capas (I, II y III) que conforman a la corteza piriforme en el ratón en la región ventrolateral de la corteza en ratón. B) Localización anatómica de la corteza piriforme en humano. Se muestra una rebanada coronal teñida con Nissl y una ampliación de la región delimitada en rojo. aIA: Área insular agranular. CoApl, Parte posterolateral núcleo cortical anterior de la amígdala. PC: Corteza piriforme. TrAP: Corteza piriforme amigdalina de transición. ac: comisura anterior. PirF: Corteza piriforme frontal. PirT: Corteza piriforme temporal. Cl: Claustrum. Unc: uncus. Ent: Corteza entorrinal. Adaptado de Vaughan & Jackson, 2014 y Larriva-Sahd, 2010.

Enriquecimiento olfatorio

Los ambientes enriquecidos suponen modificaciones neuronales importantes en regiones involucradas con procesos de memoria y aprendizaje, como el hipocampo y la corteza prefrontal (Melani *et al.*, 2017). Uno de estos ambientes es el EE, una condición de alojamiento donde son añadidos diferentes estímulos sensoriales, motores y sociales (Frick *et al.*, 2003). Lo que induce una mejora de los deterioros cognitivos en roedores, que se asocian con procesos patológicos como las lesiones cerebrales o los traumatismos, la enfermedad de Huntington (Spires *et al.*, 2004), la de Parkinson y el síndrome de Down, la EA, entre otros (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el EE induce estos beneficios son poco claros. Entre las posibles causas se encuentra un incremento en el BDNF (Ickes *et al.*, 2000), en la neurogénesis en el hipocampo (Kempermann *et al.*, 1997; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005) y en otras cortezas (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Adicionalmente, el EE altera la expresión de los receptores tipo NMDA (N-metilo-D-aspartato) y tipo AMPA (α -amino3-hidroxi-5-metilo-4-

izoxazolpropiónico), lo que favorece la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) (Tang *et al.*, 2001). Dada la complejidad de las modificaciones moleculares, celulares y conductuales que se presentan tras el EE (Nithianantharajah & Hannan, 2006), se ha propuesto el uso de diferentes ambientes enriquecidos que buscan la estimulación de sistemas sensoriales particulares (Rose *et al.*, 1972; Martončíková *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2018). Entre ellos, destaca el enriquecimiento acústico (Yamashita *et al.*, 2018), el visual (Rose *et al.*, 1972) y el enriquecimiento olfatorio (EO- Martončíková *et al.*, 2011). Este último tipo de estimulación sensorial ha sido referido en la literatura con otros nombres como entrenamiento olfatorio (Haehner *et al.*, 2013) o aprendizaje olfatorio. El EO consiste en la exposición crónica a una gran variedad de estímulos olfatorios, con o sin la participación activa de los sujetos expuestos (Haehner *et al.*, 2013; Martončíková *et al.*, 2011). Este tipo de estimulación incluye aromas naturales y/o sintéticos (Haehner *et al.*, 2013; Martončíková *et al.*, 2011). Se sabe que el EO es capaz de disminuir la hiperfosforilación de la proteína Tau en la serina pT231, pS396, pS404 (Liao *et al.*, 2012). Lo que resulta relevante para patologías como la EA donde existe un incremento en la hiperfosforilación de la proteína, que resulta en la formación de ovillos neurofibrilares en el cerebro de los pacientes (Bakota & Brandt, 2016). En otras patologías como la enfermedad de Parkinson, el EO ha demostrado mejorar la capacidad olfatoria de los pacientes que sufren esta enfermedad (Haehner *et al.*, 2013). Así mismo, el EO induce una disminución de la muerte neuronal (Martončíková *et al.*, 2011) y un incremento de la neurogénesis en el BOP (Kay *et al.*, 2009), incrementando el número de neuronas TH+ en la capa glomerular (Bonzano *et al.*, 2014) y de neuronas GABAérgicas granulares del BOP (Rocheffort *et al.*, 2002). Este incremento se ha asociado con una mejora en la capacidad para discriminar aromas en roedores (Livneh *et al.*, 2014; Sakamoto *et al.*, 2014). El equipo de trabajo de Rusznak y colaboradores (2018) demostraron que el EO incrementa el número de neuronas y mantiene intacto el número de células gliales tanto en el bulbo olfatorio como en el hipocampo (Rusznak *et al.*, 2018). Este incremento en la neurogénesis en el BOP conlleva al incremento en los niveles de BDNF (Yuan, 2008) lo cual contribuye a favorecer la función olfatoria fina

que se produce con el EO (Livneh *et al.*, 2014; Sakamoto *et al.*, 2014) y adicionalmente ha mostrado efectos benéficos en el desarrollo de la EA (Giuffrida *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si hay una relación directa del EO y los niveles de BDNF en el BOP. Lo anterior indica que el EO no sólo genera modificaciones plásticas sobre las interacciones neuronales de la red bulbar, sino que además podría ejercer un rol importante en patologías neurodegenerativas como la EA.

Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la experiencia sensorial

El BDNF es una neurotrofina que contribuye a la división, la migración y la diferenciación de nuevas neuronas (Miranda *et al.*, 2019). Así mismo, regula funcional (Mast & Fadool, 2012) y estructuralmente las sinapsis (Lu, 2003; Lu *et al.*, 2014) en diferentes circuitos neuronales involucrados en el aprendizaje y la memoria (Ismail *et al.*, 2020). La experiencia sensorial modifica la expresión endógena de BDNF en regiones cerebrales, como la corteza de los barriles (Jiao *et al.*, 2011), la corteza auditiva primaria (Anomal *et al.*, 2013), el hipocampo (Sleiman *et al.*, 2016; Liu & Nusslock, 2018) y el BOP (Zimmerberg *et al.*, 2009). Concretamente la experiencia sensorial olfatoria, como la deprivación (McLean *et al.*, 2001; Zimmerberg *et al.*, 2009) o la estimulación con aromas, modula de manera opuesta la expresión de BDNF en el BOP (Zimmerberg *et al.*, 2009). Lo anterior influencia a la neurogénesis producida en la región subventricular (SVZ; por sus siglas en inglés), que constituye el nicho neurogénico por excelencia del BOP (Yuan, 2008). Particularmente, una elevación en los niveles de BDNF provoca un incremento en el número de células granulares en el BOP (Zigova *et al.*, 1998) e incrementa la densidad de espinas dendríticas en las células mitrales y granulares del BOP (Imamura & Greer, 2009; McDole *et al.*, 2015). Además de su rol en la fisiología del BOP, el BDNF ha ganado un significativo interés terapéutico en enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Zuccato & Cattaneo, 2009; Nagahara & Tuszynski, 2011; Autry & Monteggia, 2012). Una desregulación en la señalización del BDNF constituye un factor determinante en el desarrollo de trastornos neurológicos como la enfermedad de Parkinson (Palasz *et al.*, 2020), la enfermedad de Huntington

(Zuccato & Cattaneo, 2014) y la EA (Amidfar *et al.*, 2020). En el desarrollo de la EA se presenta una disminución en los niveles de BDNF en el suero con respecto a pacientes sanos (Laske *et al.*, 2007). Por lo anterior, se ha propuesto el desarrollo de estrategias terapéuticas no farmacológicas que contribuyen al incremento de los niveles de BDNF cerebral, como las dietas con alto contenido de antioxidantes (Amidfar *et al.*, 2020), el ejercicio (Neeper *et al.*, 1996; Farmer *et al.*, 2004; Vaynman *et al.*, 2004), la estimulación auditiva (Tiunova *et al.*, 2018; Kathpalia *et al.*, 2019), la estimulación visual (Mui *et al.*, 2018; Tiunova *et al.*, 2018) y el enriquecimiento ambiental (Ickes *et al.*, 2000; Kazlauckas *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2019).

La Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es una patología crónica-neurodegenerativa, irreversible y progresiva (Mukhin *et al.*, 2017). La EA presenta una estrecha relación con el incremento en la edad de los pacientes (Guerreiro *et al.*, 2015), la contaminación (Croze & Zimmer, 2018), la alimentación (Otaegui-Arrazola *et al.*, 2014) y el sedentarismo (Wheeler *et al.*, 2017). Esta enfermedad fue descrita por primera vez por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer en 1907 (Small & Cappai, 2006). El primer caso reportado fue de una mujer relativamente joven que tenía problemas en la memoria y en la orientación temporal y espacial (Small & Cappai, 2006). Así mismo en evaluaciones *postmortem* del tejido cerebral Alois reportó depósitos intra y extracelulares, que más adelante se conocerían como ovillos neurofibrilares y placas seniles respectivamente (Vicker *et al.*, 200).

La patogénesis de la EA es compleja (Mukhin *et al.*, 2017). En etapas preclínicas se presenta un metabolismo anormal del P β A y la hiperfosforilación de la proteína Tau (Wang *et al.*, 2017), una proteína importante en el citoesqueleto celular (Buée *et al.*, 2000), y en estadios más tardíos una pérdida neuronal severa (Raji *et al.*, 2009; Mukhin *et al.*, 2017). Dichas alteraciones conducen a un deterioro cognitivo severo (Sperling *et al.*, 2011).

En estudios *post-mortem* realizados en el tejido cerebral de los pacientes con esta enfermedad, se han identificado distintos marcadores histopatológicos (Selkoe, 1991), tales como las placas seniles, compuestas primordialmente por el péptido

beta amiloide (Hardy & Higgins, 1992) y los ovillos neurofibrilares, conformados por la proteína Tau en su estado hiperfosforilado (Wang *et al.*, 2017).

El péptido beta amiloide (P β A)

El péptido beta amiloide (P β A) contiene de 40 a 42 aminoácidos y se produce a partir de la proteína precursora amiloide (APP por sus siglas en inglés; Van Der Kant & Goldstein, 2015). La APP es una glicoproteína que forma parte de una de las familias más grandes en humanos, su estructura se compone de un dominio transmembrana, un dominio largo extracelular N-glicosilado y un dominio corto C-terminal (Van Der Kant & Goldstein, 2015). La APP presenta dos vías de procesamiento, una no amiloidogénica y una amiloidogénica (Figura 7; Villegas, 2015). En la primera vía, la APP es escindida a través de la acción de la alfa secretasa, lo que libera el segmento soluble APP α , dejando un fragmento carboxilo de 83 aminoácidos (CTF α) en la membrana (Hermey, 2015). Posteriormente, la gamma secretasa realiza un corte intramembranal produciendo un péptido de 3 kDa, el P3 (Hermey, 2015). Por otra parte, en la vía amiloidogénica la APP es escindida por la acción de las betas secretasas produciendo un segmento APP β extracelular y un segmento carboxilo de 99 aminoácidos intramembranal. La acción de las gamma secretasas sobre este segmento en diferentes sitios puede producir diferentes fragmentos del P β A, entre ellas la secuencia 1-42 que es una de las más tóxicas en el cerebro (Hermey, 2015, Sun *et al.*, 2015; Norstrom, 2017).

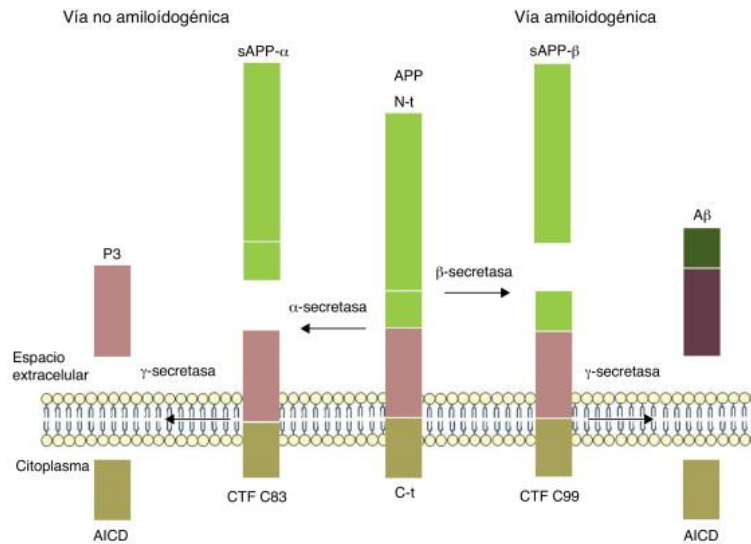


Figura 7. La proteína APP puede seguir 2 vías de procesamiento proteolítico: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) se escinde por la α -secretasa que genera un fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos (C83), finalmente la γ -secretasa genera un péptido P3 en el espacio extracelular. Por otro lado, la vía amiloidogénica requiere de un primer procesamiento de la APP que se da por la acción de las β -secretasas lo que produce un fragmento carboxilo terminal de 99 aminoácidos (C99). Posteriormente, la acción de la γ -secretasa produce diversos fragmentos del P β A que pueden permanecer asociados a la membrana o formar agregados y placas en el espacio extracelular. Tomado de Villegas, 2015.

El P β A₁₋₄₂ es altamente hidrofóbico y, en soluciones fisiológicas, tiende a agregarse en oligómeros y fibrillas (Chen *et al.*, 2017). Lo anterior, es debido a que el P β A₁₋₄₂ es capaz de conformar una estructura de tipo lámina beta plegada que, en soluciones fisiológicas, lleva a la formación de placas amiloides, que son parte de las placas seniles, uno los marcadores histopatológicos característicos de la EA (Haass & Selkoe, 2007; Chen *et al.*, 2017). Investigaciones recientes indican que la forma soluble del P β A y no las placas seniles, desencadenan alteraciones en el sistema nervioso central de los pacientes con EA (Haass & Selkoe, 2007). Estas contribuciones forman parte de uno de los modelos de la EA más influyentes hasta el momento, la *hipótesis de la cascada amiloide*, que intenta explicar el origen y la evolución de esta enfermedad (Simón-Mata *et al.*, 2010). Una de las bases de esta hipótesis ha sido la descripción de casos de Alzheimer familiar (Green *et al.*, 2009) asociados con mutaciones en la APP (Chang, 2011) y en las subunidades catalíticas del complejo gamma-secretasa como las presenilina 1 y 2 (Chang, 2011). Esto conlleva a la sobreproducción del P β A, lo que altera diversas cascadas de señalización intracelular involucradas en la supervivencia neuronal (Sun *et al.*,

2015). Cuando el P β A es liberado puede permanecer en el espacio extracelular o mantenerse asociado a la membrana plasmática o a las balsas lipídicas de la membrana a través de la asociación con el gangliósido GM1 (Chen *et al.*, 2017). En su estado soluble, el P β A es capaz de unirse a múltiples receptores de superficie generando disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en las neuronas, lo que resulta en una entrada masiva de calcio y, por consecuencia, una toxicidad neuronal (Figura 8; Chen *et al.*, 2017). Por ejemplo, el P β A se une al receptor de neurotrofina p75 (Hashimoto *et al.*, 2004) lo que conlleva a la muerte neuronal en el hipocampo (Armato *et al.*, 2013), posiblemente mediada por la activación de una vía de señalización intracelular que recluta a las caspasas 8 y 3, mismas que median procesos de apoptosis celular (Troy *et al.*, 2000). Además, el P β A puede asociarse al receptor de glutamato tipo NMDA (Texidó *et al.*, 2011) y al receptor metabotrópico de glutamato tipo 5 (mGluR5), lo que resulta en el incremento del Ca²⁺ intracelular proveniente del medio extracelular, así como de la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares, lo que promueve la translocación de la PKC y la fosforilación de ERK1/2 (Chen *et al.*, 2017). En adición, se ha propuesto que la asociación del P β A a la subunidad α del receptor nicotínico de acetilcolina regula la fosforilación de tau a través de vías que involucran la activación de las cinasas ERK y JNK (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2017). En conjunto, estas vías de señalización producen alteraciones que culminan en la inestabilidad de la fisiología neuronal y su muerte.

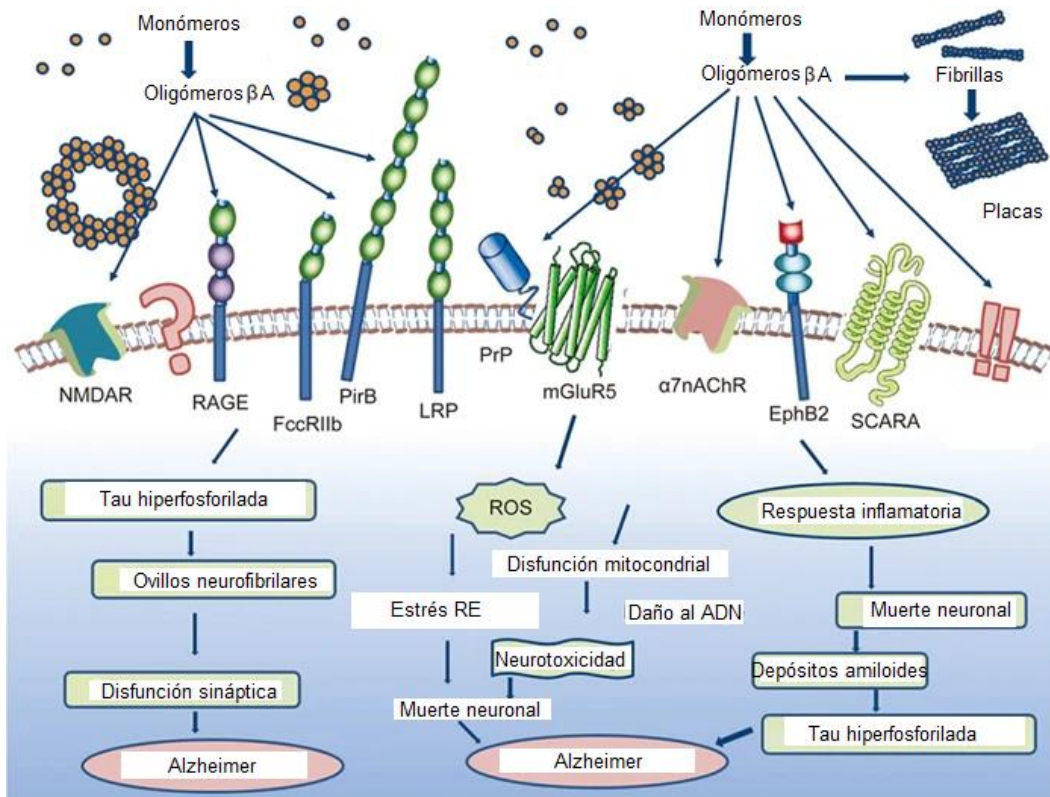


Figura 8. Receptores y vías transduccionales por el PβA. El PβA es capaz de unirse a múltiples receptores de superficie generando disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. Por ejemplo, los oligómeros del PβA se asocian a los receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5 (mGluR5), a la subunidad α de los receptores nicotínicos de acetilcolina, a los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). La activación de estos receptores y de las cascadas transduccionales que desencadenan genera estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, hiperfosforilación de Tau y respuestas inflamatorias, que pueden provocar la muerte neuronal. Tomado de Chen *et al.*, 2017.

La pérdida olfatoria en la EA

La etiología de la EA presenta diferentes estadios (Braak & Braak, 1991). En las etapas preclínicas, previo al deterioro cognitivo existe una pérdida de la capacidad olfatoria (Masurkar & Devanad, 2014). Procesos como la memoria olfatoria, la discriminación y la identificación de aromas se encuentran afectados en la EA (Zou *et al.*, 2016; Murphy, 2019; Son *et al.*, 2021c). Lo cual, se ha relacionado con un incremento en los niveles del PβA soluble (Wesson *et al.*, 2010) y, de forma más tardía, con la aparición de placas seniles y ovillos neurofibrilares en el bulbo olfatorio principal (Attems & Jellinger, 2006; Wu *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2016; Murphy, 2019), la corteza entorrinal, el núcleo olfatorio anterior y la corteza piriforme (Zhou *et al.*, 2019; Murphy, 2019; Son *et al.*, 2021c). Estos hallazgos son relevantes, ya que

resultan en una posibilidad de detección temprana de la EA y en un blanco terapéutico importante para el tratamiento temprano de la patología (Doty *et al.*, 1987; Wesson *et al.*, 2010). En pacientes con EA se ha mostrado una reducción en la capacidad para identificar estímulos olfatorios (Morgan & Murphy, 2002), así como una reducción de los potenciales relacionados con eventos olfatorios (Morgan & Murphy, 2002). Tratar de entender cómo todas estas alteraciones inducen modificaciones genéticas, moleculares, celulares y conductuales que conllevan a la pérdida olfatoria en los pacientes con EA ha sido motivo de estudios diversos (Cavanaugh *et al.*, 2014; Salgado-Puga & Peña-Ortega, 2015). Con ello, surge la necesidad de emplear modelos experimentales que simulen el fenotipo y el genotipo que conlleva a la disfunción olfatoria de los pacientes con EA (Cavanaugh *et al.*, 2014; Salgado-Puga & Peña-Ortega, 2015). Actualmente, una de las aproximaciones más empleadas, es el uso de animales transgénicos que presentan diferentes mutaciones, principalmente en el gen que codifica para la APP (Goate & Hardy, 2012; Cavanaugh *et al.*, 2014). El descubrimiento de las mutaciones en el gen que codifica para la APP humana (Lamb *et al.*, 1997, 1999), asociadas al surgimiento de la EA familiar, han permitido la creación de diversos modelos transgénicos que expresan mutaciones que fueron detectadas en familias de Holanda (E693Q; Levy *et al.*, 1990), de Suecia (APP^{swe}/K670N/M671L; Mullan *et al.*, 1992), de Londres (V717I; Goate *et al.*, 1991), de Indiana (V717F; Murrell *et al.*, 1991), de Iowa (D694N Grabowski *et al.*, 2001), el Ártico (E693G; Nilsberth *et al.*, 2001) y Florida (I716V; Eckman *et al.*, 1997). La expresión de transgenes con estas mutaciones en roedores, así como su coexpresión con otros transgenes, como en que contiene la mutación al gen que codifica para la presenilina 1 (APP^{swe}/PS1), ha mostrado alterar la función olfatoria en roedores (Liu *et al.*, 2013). El equipo de trabajo de Liu y colaboradores (2013) reportó que los animales transgénicos APP^{swe}/PS1 presentan una disminución en la coherencia del potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés) del bulbo olfatorio principal (BOP), en las bandas de frecuencia, theta (2-12 Hz), beta (15-35 Hz) y gamma (35-65 Hz; Liu *et al.*, 2013). Lo que induce reducción en la capacidad para detectar y discriminar estímulos olfatorios, como consecuencia de las mutaciones que conllevan a la

sobreproducción del péptido beta amiloide (Liu *et al.*, 2013). Otra de las aproximaciones para entender como el P β A altera la capacidad olfatoria ha sido la administración de oligómeros del P β A directamente en el bulbo olfatorio (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Hernández-Soto, 2015; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2019). En nuestro laboratorio, hemos observado que el BOP es especialmente sensible a los efectos deletéreos del P β A en roedores tanto en preparaciones *in vitro* como *in vivo* (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Hernández-Soto, 2015; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018). La administración crónica del P β A en el BOP altera las interacciones neuronales y genera disfunción olfatoria, alterando la detección y discriminación de los estímulos olfatorios (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Hernández-Soto, 2015; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2019). Así mismo, la administración aguda del P β A disminuye la conectividad funcional entre ambos bulbos olfatorios lo que correlaciona fuertemente con las alteraciones en la potencia de la actividad oscilatoria del bulbo olfatorio (Hernández-Soto *et al.*, 2019). Estos hallazgos proveen una relación directa entre la administración del P β A y las alteraciones sobre la red neuronal del bulbo olfatorio, lo que conlleva a una disfunción y una pérdida olfatorias en roedores que podría ser extrapolada a pacientes que cursan con la EA (Hernández-Soto *et al.*, 2019). Por lo que en este trabajo evaluamos el efecto del EO sobre las alteraciones producidas por el P β A que, como ya se ha mencionado, incrementa considerablemente en la EA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El bulbo olfatorio principal (BOP) es la primera región cerebral involucrada en el procesamiento de la información olfatoria (Kay, 2015) y es una estructura altamente plástica, que se modifica en respuesta a la experiencia sensorial (Bovetti *et al.*, 2009). El enriquecimiento olfatorio (EO), que supone la exposición pasiva y prolongada a una amplia gama de aromas sintéticos y/o naturales, modifica la neurogénesis en el BOP, mejora la memoria y la discriminación olfatoria en roedores. Sin embargo, hasta el momento se desconoce su influencia sobre la actividad del circuito bulbar y la aversión/preferencia olfatoria innata. Por otra parte, la estimulación sinérgica de diferentes sistemas sensoriales, por periodos prolongados, induce modificaciones morfológicas y funcionales en el cerebro, que contribuyen a aminorar algunos síntomas de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA). Tal es el caso del enriquecimiento ambiental; un tipo de estimulación crónica, que provee de una combinación de interacciones sociales, cognitivas, sensoriales y de estimulación motora, que mejora distintos procesos cognitivos en pacientes con la EA y en modelos animales que presentan un fenotipo tipo Alzheimer. Esta complejidad de estímulos produce numerosos cambios que modifican la anatomía y la funcionalidad de numerosas estructuras cerebrales. Sin embargo, esta mezcla de activaciones sensoriales no permite reconocer de forma precisa el origen de las modificaciones más importantes que generan los posibles efectos protectores en la EA. Por lo que en este trabajo se plantea el uso del EO como una alternativa para aminorar el deterioro olfatorio temprano característico de la EA.

La EA es una patología que cursa con diferentes síntomas, siendo la pérdida olfatoria uno de ellos que, además, representa un criterio diagnóstico relevante en etapas preclínicas de la EA, antes del deterioro cognitivo (Wesson *et al.*, 2010; Marigliano *et al.*, 2014; Woodward *et al.*, 2017; Kotecha *et al.*, 2018). La hiposmia no es exclusiva de la EA, pues pacientes con enfermedad de Parkinson también presentan desórdenes olfatorios tempranos que han sido aminorados con manipulaciones experimentales que pretenden activar de forma específica al sistema olfatorio (Haehner *et al.*, 2013). El entrenamiento olfatorio, un protocolo

similar al EO, y que supone la exposición activa a una variedad de aromas, recupera la detección y la discriminación olfatoria en estos mismos pacientes (Haehner *et al.*, 2013). Así mismo, la estimulación olfatoria mejora funciones cognitivas como la atención, la memoria y el lenguaje en pacientes con demencia (Vance *et al.*, 1999; Cha *et al.*, 2021; Oleszkiewicz *et al.*, 2021). Del mismo modo, en pacientes con EA leve, la estimulación olfatoria ha mostrado disminuir la amnesia anterógrada y retrógrada (El Haj *et al.*, 2017; Glachet *et al.*, 2018; 2019; Glachet & El Haj, 2019; 2020). Además, en modelos animales, el EO reduce tanto la fosforilación de la proteína Tau (Liao *et al.*, 2012) como la deposición del péptido beta amiloide (P β A) en el hipocampo (Wang *et al.*, 2020) que, como ya se mencionó, son marcadores diagnósticos de la EA (Liao *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta el momento no se conocen los efectos del EO sobre las alteraciones producidas por el P β A, cuya sobreproducción induce una disrupción en la función neuronal característica de la EA en el BOP (Wesson *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2012). Con base en lo anterior, nos propusimos evaluar los efectos del EO sobre la actividad de la red neuronal bulbar y sus implicaciones en la conducta olfatoria innata. También, evaluamos los efectos del EO sobre estos mismos parámetros tras la administración del P β A, para así definir los posibles efectos protectores del EO sobre la detección y la discriminación olfatoria, así como sobre la actividad bulbar.

HIPÓTESIS

El enriquecimiento olfatorio produce modificaciones plásticas en el bulbo olfatorio y lo protege contra los efectos inhibidores producidos por el péptido beta amiloide *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del enriquecimiento olfatorio sobre el circuito bulbar y su posible efecto protector contra las alteraciones producidas por el péptido beta amiloide.

Objetivos particulares

1. Evaluar los cambios inducidos por el enriquecimiento olfatorio sobre los niveles de BDNF bulbar.
2. Evaluar los cambios plásticos inducidos por el enriquecimiento olfatorio en el circuito glomerular y la actividad de la red neuronal bulbar en condiciones basales y en presencia de aromas.
3. Determinar los cambios inducidos por el EO en la detección y discriminación olfatoria.
4. Determinar los efectos deletéreos del P β A₁₋₄₂ sobre la activación de la capa glomerular y la actividad de la red neuronal bulbar en condiciones basales y en presencia de aromas.
5. Determinar los posibles efectos protectores del EO contra las alteraciones que produce el P β A₁₋₄₂ sobre la activación de la capa glomerular y la actividad de la red neuronal bulbar en condiciones basales y en presencia de aromas.
6. Determinar los posibles efectos protectores del EO contra las alteraciones que produce el P β A₁₋₄₂ sobre la discriminación olfatoria.
7. Determinar los efectos del EO sobre la expresión del P β A₁₋₄₂ en el circuito bulbar.
8. Determinar los efectos del BDNF en el posible efecto protector del EO contra las alteraciones que produce el P β A₁₋₄₂ en el circuito bulbar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 (022, Charles River Laboratories Company) de 7-8 semanas de edad de 30-35 g. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de Bioética en Investigación del Instituto de Neurobiología con el número de protocolo 50 y están basados en la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) con clave NOM-062-ZOO-1999. Así mismo, se tomaron en cuenta los criterios de ética para el uso de animales de investigación de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH). Los animales fueron mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad normal de 12 horas, a una temperatura constante de 22 ± 1 °C, con agua y alimentación *ad libitum*. Para todas las evaluaciones experimentales se contaron con 8 grupos de animales:

- 1- Grupo sometido a enriquecimiento olfatorio.
- 2- Grupo sin enriquecimiento olfatorio.
- 3- Grupo sometido a enriquecimiento olfatorio implantado con una placa de acero inoxidable para evaluaciones del animal despierto con la cabeza fija.
- 4- Grupo sin enriquecimiento olfatorio implantado con una placa de acero inoxidable para evaluaciones del animal despierto con la cabeza fija.
- 5- Grupo sometido a enriquecimiento olfatorio administrado intracerebroventricularmente (ICV) con el P β A₁₋₄₂.
- 6- Grupo sometido a enriquecimiento olfatorio administrado ICV con la secuencia inversa del P β A como control.
- 7- Grupo sin enriquecimiento olfatorio administrado ICV con el P β A₁₋₄₂.
- 8- Grupo sin enriquecimiento olfatorio administrado ICV con la secuencia inversa del P β A como control.

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 (Pimentel-Farfán, 2016). 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, octanaldehído, pino, romero español, salvia española, tomillo, toronja blanca y gaulteria -Droguería Cosmopolita S.A. DE C.V.-), uno por día, durante 21 días. Cada uno de los odorantes fue presentado dos veces, una hora por la mañana y otra hora por la tarde, con una diferencia mínima entre cada exposición de 3 horas (Martončíková *et al.*, 2011). Para ello, se aplicaron 5 μ 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. Cada caja, cubierta con una tapa provista de un filtro, fue situada 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 μ l de agua destilada en el hisopo dentro del frasco de plástico y la exposición fue exactamente la misma que para los sujetos experimentales.

Sistema para la estimulación olfatoria

El aparato para la emisión de los aromas durante los registros electrofisiológicos con animales anestesiados, las pruebas de condicionamiento operante y la imagenología óptica intrínseca bulbar (descritos más adelante), consiste en un sistema de solenoides idéntico al reportado por Slotnick & Restrepo, 2005. Este generador de estímulos permite la presentación de 4 aromas diferentes a través de un tubo de suministro. Así mismo, cuenta con un tubo de vacío para eliminar cualquier rastro de los aromas emitidos. Cada una de las válvulas es controlada con ayuda del software BBC Basic (versión 5.91, Knosys Olfactometer Begin Programm).

Aromas empleados durante el registro electrofisiológico, la imagenología óptica intrínseca y la prueba de discriminación olfatoria fina

Durante los registros electrofisiológicos y la imagenología óptica intrínseca en animales anestesiados y despiertos con la cabeza fija, se realizó la estimulación olfatoria con acetato de amilo (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) y esencia de canela (Droguería Cosmopolita S.A DE C.V, Cd. México, México), ambos a una concentración del 100 % v/v. Por otra parte, durante la prueba de condicionamiento operante olfatorio (descrita más adelante) se emplearon enantiómeros aromáticos, limoneno (+) y limoneno (-), ambos en concentraciones del 100 % v/v y 1% v/v, (diluidos en aceite mineral). Adicionalmente, para la captura de la imagenología óptica intrínseca bulbar en los animales condicionados olfatoriamente se realizó la estimulación con butirato de etilo (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA), acetato de amilo (Sigma-Aldrich Inc.), limoneno (+) (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) y limoneno ((-); Sigma-Aldrich Inc.) a una concentración del 100% y 1% v/v, diluido en aceite mineral.

Prueba de alimento enterrado

Al finalizar el protocolo de enriquecimiento olfatorio, con la finalidad de evaluar la capacidad para detectar aromas, se realizó la prueba de alimento enterrado (Alvarado-Martínez et al., 2013). Antes de la prueba los animales fueron habituados durante 30 minutos a la caja de prueba con aserrín limpio con las mismas características de la caja de alojamiento (caja de acrílico: 24 x 18 x 25 cm). Después del periodo de habituación, un trozo de galleta de chocolate (50 mg; TRIKI-TRAKES ®, Cd. Méx., México) fue colocado aleatoriamente en una de las esquinas de la caja de prueba, oculto bajo 2 cm de aserrín. Se cuantificó la latencia para encontrar la galleta. El tiempo máximo para la ejecución de la prueba fue de 600 segundos (Alvarado-Martínez et al., 2013).

Prueba de habituación-deshabitación olfatoria

Al término del enriquecimiento olfatorio, con la finalidad de evaluar la capacidad para discriminar aromas (deshabitación) y la memoria de estos (habituación), en

los ratones con y sin implante, así como en los ratones administrados con el P β A₁₋₄₂ o con su secuencia inversa, como control, se realizó la prueba conductual olfatoria conocida como habituación/deshabituación (Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Pimentel-Farfán, 2016; Hernández-Soto, 2021). Para ello, los animales fueron habituados al entorno experimental en una caja de acrílico (27 x 17 x 12 cm) con aserrín limpio, cuya tapa fue provista con una malla metálica, en la cual se colocaron recipientes circulares metálicos (4.5 cm de diámetro) con un papel filtro de 2 x 2 cm durante por lo menos 30 minutos. Cada uno de los animales fue expuesto a dos diferentes aromas (vainilla o vinagre 100% v/v: depositados en el papel filtro) durante 3 minutos en 3 ensayos sucesivos, con un intervalo interestímulo de 1 minuto. Previo a la presentación de los aromas, los animales fueron expuestos al recipiente metálico con el papel filtro que contenía 5 μ l de agua destilada, durante 2 ensayos. Cada una de las pruebas fue grabada para su análisis posterior. Las pruebas fueron realizadas durante la fase de luz del ciclo luz/oscuridad. Este procedimiento fue repetido una semana después usando los mismos aromas, pero a una concentración más baja (1%). Para la cuantificación de los resultados se analizó el tiempo de exploración del recipiente metálico, considerando una distancia igual o menor a 2 cm entre el recipiente y la nariz del animal. Adicionalmente, el tiempo de exploración fue normalizado a la primera presentación de cada estímulo (considerado como 100% para el análisis). La fase de habituación de la prueba se refleja en la reducción de la exploración ante la presentación repetida de un mismo aroma, mientras que la deshabituación se refleja en el incremento en la exploración de un nuevo aroma, lo que también se interpreta como la discriminación entre un aroma conocido y uno novedoso (Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2021). Finalmente, se cuantificó el índice de habituación cruzada (Wesson *et al.*, 2010; Hernández Soto *et al.*, 2021), a través de la sustracción del tiempo normalizado de la exploración para la última exposición a un aroma de un bloque determinado que es restada de la exploración normalizada de la primera exposición al aroma novedoso del siguiente bloque.

Prueba de preferencia y aversión olfatoria innata

En esta tesis también evaluamos la respuesta innata ante la presencia de aromas atractivos y aversivos (Lin *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2011; Lazarini *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2017). Para la aversión innata empleamos 2, 5-Dihidro-2, 4, 5-Trimetiltiazolina (TMT; Sigma Aldrich), que es un componente volátil presente en las heces del zorro (Cho *et al.*, 2011; Lazarini *et al.*, 2014). Para la atracción innata olfatoria, empleamos aceite de cacahuate (Kaporo ®; Lin *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2017). Al inicio de la prueba los animales fueron colocados en una caja de acrílico transparente, limpia y sin aserrín. La caja fue dividida imaginariamente en tres secciones iguales (15.6 x 25 x 21 cm). Posteriormente, 2 cuadrados de papel filtro (2 x 2 cm) fueron colocados en el centro de las 2 secciones laterales. Inicialmente, ambos papeles filtro estaban impregnados con 5 µl de aceite mineral, como vehículo (Sigma Aldrich). En estas condiciones, se permitió a los animales explorar la caja libremente durante un periodo de 3 minutos. Al término de este periodo, ambos papeles filtro fueron reemplazados con dos papeles filtro nuevos que fueron impregnados con las siguientes sustancias: uno con aceite mineral y otro ya sea con TMT 10% v/v (prueba de aversión innata) o con aceite de cacahuate 50 % v/v (prueba de preferencia). En estas condiciones, se permitió la exploración libre de los animales en la caja de prueba durante un periodo de 3 minutos. Todas las conductas fueron grabadas con una cámara digital para permitir su análisis fuera de línea. Se cuantificó el tiempo que los animales invirtieron en cada uno de los tres sectores de la caja de prueba. El índice de preferencia olfatoria fue calculado como la diferencia entre el tiempo que cada animal invirtió en el compartimiento que contenía ya sea TMT o aceite de cacahuate, y el tiempo que el animal invirtió en el mismo compartimento durante el ensayo de familiarización; un valor positivo de este índice indica una preferencia olfatoria y un valor negativo indica aversión olfatoria (Lazarini *et al.*, 2014).

Prueba de campo abierto

Con la finalidad de evaluar la locomoción y la exploración de los animales administrados con el PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa como control, realizamos una

prueba de campo abierto. Para ello, se empleó una arena de 50 cm de ancho x 50 cm de largo x 50 cm de alto, provista con sensores de movimiento (SuperFlex Open Field, Omnitech Electronics, Inc). Los animales fueron colocados en la arena durante 10 minutos y, al finalizar la prueba, se cuantificó su movimiento con ayuda del software Fusion (Omnitech Electronics Inc). Con este software se evaluó el tiempo en el que el animal permaneció en movimiento, la distancia recorrida en centímetros, el tiempo de permanencia en el centro y en las orillas de la caja.

Inyección intracerebroventricular del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa como control

Previo al protocolo de enriquecimiento olfatorio descrito en la sección anterior, se realizó la administración intracerebroventricular del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa como control. Para ello, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una combinación de ketamina (100mg/Kg, Cheminova) y xilazina (4mg/Kg, Cheminova) para la inducción de anestesia. Posteriormente, los animales se mantuvieron en anestesia con sevoflurano al 0.8%. Aseguramos el nivel de anestesia de los animales revisando el reflejo al pinchazo en las patas traseras. Se aplicaron gotas oftálmicas en los ojos para evitar lesiones. El cuerpo de los animales fue mantenido a una temperatura a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ usando una almohadilla eléctrica. Posteriormente, los animales fueron montados en un equipo estereotáxico para la realización de la cirugía. Previamente a la realización de la incisión, limpiamos el área de la cirugía con un antiséptico de amplio espectro (Microdacyn Oculus ®), seguido de alcohol etílico al 70%. Posteriormente, inyectamos 0.03 ml de lidocaína al 2% (Pisacaína ®) subcutánea para generar anestesia local. Se removió, con un escalpelo, la piel que recubre el cráneo, se retiró el periostio y se introdujo una aguja de inyección a través de un trepano para la administración intracerebroventricular (ICV) del péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa como control, en un ventrículo lateral ubicado en las siguientes coordenadas estereotáxicas, de acuerdo con el atlas de Franklin & Paxinos, 2007, AP: -0.22, ML: ± 1.0 y DV -2.5. La perfusión de 5 μl de la solución con el P β A₁₋₄₂ (500 pmol), o de su secuencia inversa, se realizó a una velocidad de 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Después de 5 minutos de finalizada la

perfusión, se removió la aguja y la piel fue suturada. Finalmente, se colocóacrílico dental sobre la herida para evitar cualquier infección. Al finalizar la cirugía, los animales fueron llevados a una cámara de recuperación adicionada con una almohadilla térmica a temperatura controlada de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente, a los animales se les administró un antibiótico de amplio espectro (Fluvicina Pfizer 0.5mg/Kg) para evitar cualquier infección y para minimizar la inflamación. Adicionalmente, para evitar la formación de un edema se inyectó meloxicam intramuscularmente (Mobicox Boehringer Ingelheim, 15mg/kg). Cada animal tuvo un periodo de recuperación de 3 días, previos a la realización del protocolo de enriquecimiento olfatorio descrito anteriormente.

Cirugía estereotáxica para la imagenología óptica intrínseca crónica y la prueba de condicionamiento operante olfatorio

Con la finalidad de implantar un soporte craneal que permite mantener al animal con la cabeza fija, mientras se encuentra despierto, durante la imagenología óptica y el registro electrofisiológico del potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés), así como durante la prueba de condicionamiento operante, que se describen más adelante, se realizó el procedimiento general de cirugía estereotáxica detallado al inicio de la sección anterior. Posteriormente, para la visualización de la imagenología óptica intrínseca en la superficie del BOP, se adelgazó el cráneo en una ventana de 3 x 2 mm sobre uno de los bulbos olfatorios, seleccionado aleatoriamente. Para evitar el sobrecalentamiento del BOP, se perfundió constantemente líquido cefalorraquídeo artificial frío (LCRa; composición mM: 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃ y 30 D-glucosa, pH 7.4) sobre el área de adelgazamiento. Posteriormente, se colocó una laminilla transparente de polidimetilsiloxano (PDMS, por sus siglas en inglés) a base de silicona suave de 5 mm de diámetro (Sylgard 184 Dow Corning, Inc.) que se adhirió al cráneo con cianoacrilato (KolaLoka ®). Para asegurar la permanencia de la ventana, se aplicó un adhesivo auto curable con luz UV (Figura 9; Heo *et al.*, 2016). Las laminillas de PDMS se prepararon mezclando el elastómero base y el agente de curado, en una proporción de 10:1 (v/v), desgasificado completamente dentro de un desecador de

vacío. El PDMS se dejó solidificar dentro de una placa de cultivo celular esterilizada (diámetro de 100 mm) en una incubadora (80° C, 1–2 h). El PDMS obtenido fue esterilizado por autoclave y exposición a luz UV.

En los grupos de animales inyectados con el péptido β amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa como control, se colocó una cánula de acero inoxidable en las siguientes coordenadas estereotáxicas, de acuerdo con el atlas de Franklin & Paxinos, 2007, AP: - 0.22, ML: \pm 1.0 y DV - 1.5. La cánula permitió la inserción de un inyector en la coordenada DV: -2.5 para realizar la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa, tras el entrenamiento en la prueba de discriminación olfatoria, que se describe más adelante. Para permitir la fijación de la cabeza durante la imagenología óptica intrínseca, el registro del LFP y durante la prueba conductual se fijó una placa metálica con cianoacrilato y acrílico dental sobre el cráneo, tal como se observa en la Figura 8. Como ya se indicó, para los experimentos con animales anestesiados, también se colocaron 2 tornillos, que sirven como una referencia (REF) y una tierra (GND; por sus siglas en inglés) para los registros de la actividad eléctrica neuronal con un sistema de registro con electrodos múltiples (Figura 8).

Al finalizar la cirugía, cada ratón fue transferido a una caja de recuperación adicionada con una almohadilla térmica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, hasta su recuperación completa. Al término del periodo de recuperación, el animal fue regresado a su caja de alojamiento con agua y comida *ad libitum* durante 3 días, durante los cuales se administró antibiótico (Fluvicina Pfizer 0.5mg/Kg) y meloxicam (Mobicox Boehringer Ingelheim, 15mg/kg). Durante estos días los animales fueron monitoreados para evaluar signos de estrés que incluyeran una disminución del peso corporal, letargo y cambios conductuales. De no presentarse estos signos, se comenzó con la restricción de agua para las pruebas olfatorias posteriores.

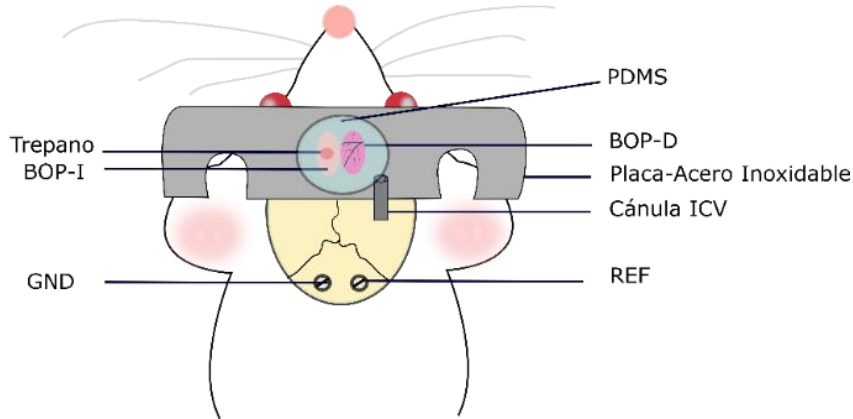


Figura 9. Implante crónico para la prueba de discriminación olfatoria e imagenología óptica intrínseca. Se muestra un esquema de un ratón con el implante de un sistema de fijación, inyección y registro. BOP-I: Bulbo olfatorio principal izquierdo, BOP-D: Bulbo olfatorio derecho. Cánula para la administración intracerebroventricular (ICV) del péptido beta amiloide o su secuencia inversa como control. Se muestran también los tornillos de referencia (REF) y tierra (GND) para los registros con multielectrodos que se efectuaron tras el entrenamiento para la prueba de condicionamiento operante olfatorio.

Registro del potencial de campo local en animales anestesiados

Uno a siete días después del enriquecimiento olfatorio, y uno a tres días después de las pruebas olfatorias descritas anteriormente, se realizó el registro del potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés) del bulbo olfatorio principal en animales anestesiados y despiertos con la cabeza fija. Los animales del grupo no implantado se anestesiaron profundamente con uretano (2 g/kg, i.p.) y fueron posicionados en un equipo estereotáxico, mientras que los animales despiertos fueron posicionados usando la placa metálica implantada en su cráneo (ver procedimiento quirúrgico en la sección anterior) sobre el equipo estereotáxico al cual se familiarizaron previamente durante un periodo de tres días. Para realizar los registros electrofisiológicos el PDMS fue removido. En todos los casos un electrodo de borosilicato (1-2 M Ω), lleno con LCRa (composición mM: 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃ y 30 D-glucosa, pH 7.4), fue posicionado en la capa granular del BOP empleando las siguientes coordenadas estereotáxicas con respecto a Bregma: AP: + 4.8, ML: \pm 0.7, DV: -1.7 (Franklin & Paxinos, 2007). Con ello, fue posible realizar el registro del LFP (Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2021). Simultáneamente, fue monitoreada la respiración con

un sensor piezoeléctrico situado en el tórax de los animales (Hernández-Soto *et al.*, 2021). Se registró la actividad espontánea durante 30 minutos y posteriormente, un hisopo impregnado con 5 μ l de acetato de amilo (100% v/v) o esencia de limón (100% v/v) fue posicionado frente a la nariz del animal (aproximadamente a 2 cm de distancia) durante 10 segundos. Este procedimiento se repitió secuencialmente tres veces, con un intervalo inter-estímulo de 3 minutos. Las señales fueron amplificadas (0.3-0.3 kHz; 7P511L, Grass Instruments Co.) y digitalizadas a 1kHz (MiniDigi 1B, Axon Instruments) con el software AxoScope (versión 10.7, Molecular Devices). Las grabaciones fueron analizadas usando Clampfit (versión 10.7, Molecular Devices). Los análisis del espectro de potencia fueron realizados en diez segmentos aleatorios de 10 segundos mediante el algoritmo de la transformada rápida de Fourier (FFT; por sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos permitieron calcular la potencia relativa en las siguientes bandas de frecuencia: theta (1-12 Hz), beta (12-30 Hz) y gamma (30-120 Hz). La potencia relativa fue obtenida con base al porcentaje de la potencia de cada banda de frecuencia con respecto al total obtenido de la banda ancha (1-120 Hz; considerado como 100% para el análisis). Los espectrogramas de potencia fueron graficados usando el software NeuroExplorer (versión 5.037 Nex Technologies).

Registro con multielectrodos en animales anestesiados

Al finalizar las pruebas conductuales descritas anteriormente, se realizó el registro de la actividad del BOP con un arreglo de multielectrodos, con el fin de evaluar los cambios inducidos por el EO y/o el P β A sobre la actividad eléctrica de las diferentes capas del BOP. El día del registro, los animales fueron anestesiados con uretano (2g/Kg, i.p.). La anestesia fue comprobada mediante la ausencia de respuesta motora a estímulos dolorosos. Posteriormente, se removió la piel y el periostio a la altura del BOP. 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) con respecto a Bregma: AP: + 4.8 y ML: \pm 0.7. Finalmente, con ayuda de una aguja 26G, se retiró la dura. Adicionalmente, se colocaron 2 tornillos de REF y GND justo por debajo de Bregma teniendo especial cuidado de

no alcanzar el cerebro. Lo anterior, con la finalidad de referenciar el registro y 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 μm y con una separación de 50 μm 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 DV: 0.7 (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 (versión 3.3.5 Plexon Inc.) y NeuroExplorer (versión 5.037 Nex Technologies). Para evaluar la actividad eléctrica inducida con aromas, los animales fueron estimulados con 4 aromas diferentes, acetato de amilo, butirato de etilo, limoneno (+) y limoneno (-), diluidos en aceite mineral tanto al 1% v/v, como al 100%. Cada aroma fue presentado 3 veces, durante 10 segundos, con un intervalo interestímulo de 10 minutos. Dado que la actividad neuronal depende directamente de la frecuencia respiratoria de los animales, se realizó el registro de la respiración con ayuda de un piezoeléctrico colocado sobre el tórax del animal. El registro de la respiración fue adquirido con ayuda de un digitalizador DigiAmp 1B y el software Clampex 10.6.2. (Axon Molecular Devices). Simultáneamente, la señal fue entregada a una entrada análoga en el sistema de registro de Plexon, para ser analizada fuera de línea con respecto de la actividad neuronal.

Prueba de discriminación olfatoria fina operante tipo Go/No-Go

Todos los experimentos conductuales fueron realizados durante la fase de luz entre las 8:00 am y las 12:00 pm. Se efectuó una fase de habituación al entorno, una fase de entrenamiento y una fase de prueba. Cada una de estas fases se realizó en un equipo de condicionamiento operante construido en el laboratorio en una cabina sonoamortiguada (Figura 10). El equipo está provisto de una bocina para indicar al animal el inicio de los ensayos o las respuestas incorrectas durante las pruebas. Este equipo también incluye un tubo de vidrio, de 3 mm de diámetro, conectado a

un olfactómetro (descrito previamente) para la emisión de los aromas. Finalmente, para la recompensa, se utilizó una aguja endotraqueal de 25 G con la punta roma. Con ello, fue posible la entrega de 2 μ l de agua con ayuda de un solenoide. Así mismo, para la detección del momento en que el animal lame el sitio de la recompensa, se colocó un sensor infrarrojo de barrera. Tanto la bocina como el sensor infrarrojo, el solenoide y el olfactómetro utilizados durante la prueba fueron controlados, externamente, con ayuda de un código elaborado en Matlab 2019a (MathWorks, Inc).

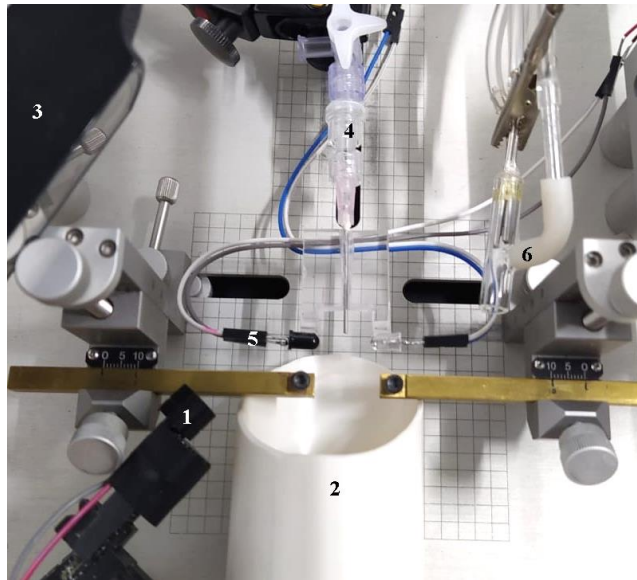


Figura 10. Cámara de condicionamiento operante olfatorio. 1, bocina. 2, tubo de restricción. 3, cámara de videograbación. 4, dispensador de agua. 5, sensor infrarrojo de barrera. 6, tubo de vidrio, conectado a un olfactómetro,

Para las pruebas conductuales, 3 días después de la cirugía, los animales fueron restringidos a un consumo diario de agua de 1 ml/día durante 3 días previos a la fase de entrenamiento (Guao *et al.*, 2014). Desde el inicio de la restricción de agua se monitoreó el peso de los animales, para vigilar que no disminuyera a más del 20% de su peso corporal (Guao *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2017). Se proporcionó agua a los animales con ayuda de un dispensador provisto con una aguja endotraqueal, similar a la que se les presentó en la caja de entrenamiento. Lo anterior, con la finalidad de permitirle al ratón familiarizarse con el material de la aguja y comenzar la asociación de la recompensa a dicho material. Después de la restricción de agua,

los animales fueron manipulados y habituados al entorno de entrenamiento, incluyendo las manos del experimentador, el tubo de restricción, el tubo de recompensa, a los sonidos en el cuarto experimental y otros factores, durante 30 minutos por 3 días consecutivos, manteniendo constante el horario de habituación para cada animal. Lo anterior, permite la reducción en los niveles de estrés de los animales (Guo *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2017). Antes de cada ensayo, los animales fueron colocados en un tubo de plástico con la cabeza restringida de movimiento, mediante dos tornillos situados en ambos extremos de la placa metálica implantada en la cabeza de los animales. Los tornillos fueron asegurados en un equipo estereotáxico adaptado. Al término de la fase de habituación los animales fueron entrenados para discriminar entre dos odorantes, uno recompensante (limoneno (+) al 100% v/v) y otro no recompensante (Limoneno (-) al 100% v/v) en un paradigma de condicionamiento operante conocido como *Go/No-Go* (Abraham *et al.*, 2004, Abraham *et al.*, 2012; 2010; Guo *et al.*, 2014, Chu *et al.*, 2017). Los ratones realizaron sesiones diarias de 100 ensayos. En cada ensayo, uno de los dos aromas fue entregado de forma pseudoaleatoria, con un máximo de 3 ensayos consecutivos del mismo aroma. El ensayo *Go* fue considerado como correcto cuando al término de los 4 segundos de la presentación de limoneno (+) 100% v/v, el animal lamió por lo menos una vez el sitio de la recompensa durante el periodo de respuesta de 2 segundos, al término de este tiempo le fue dispensada una gota de agua de 25 μ l. El ensayo *No-Go* se consideró como correcto cuando un animal no lamió durante el periodo de respuesta (2 segundos) tras la presentación de limoneno (-) 100% v/v (4 segundos). Los ensayos se consideraron incorrectos si el animal lamió el sitio de la recompensa durante el periodo de respuesta (2 segundos) después de la presentación de limoneno (-) 100% v/v o si no respondió tras la presencia de limoneno (+) 100% v/v. Como castigo, se hizo sonar la bocina a una frecuencia de 5000 Hz, en ambos casos (Figura 11). Cada uno de los ensayos, independientemente si fueron respuestas correctas o incorrectas, se realizaron con un periodo interestímulo de 10 segundos, igual a la fase de asociación. Cuando los animales alcanzaron más del 80% de respuestas correctas de la totalidad de los ensayos por día, fueron administrados ICV con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa y,

posteriormente, iniciaron el protocolo de EO siguiendo la metodología descrita previamente. Durante el EO, se continuó con el entrenamiento de los animales en la tarea *Go/No-Go* empleando aromas a una concentración baja (1% v/v). Lo anterior, debido que esta concentración supone un reto olfatorio para los animales control, en comparación con los animales enriquecidos olfatoriamente (Hernández-Soto, 2018). El protocolo descrito permite evaluar los efectos de la administración crónica del P β A₁₋₄₂ sobre la discriminación olfatoria en los roedores.

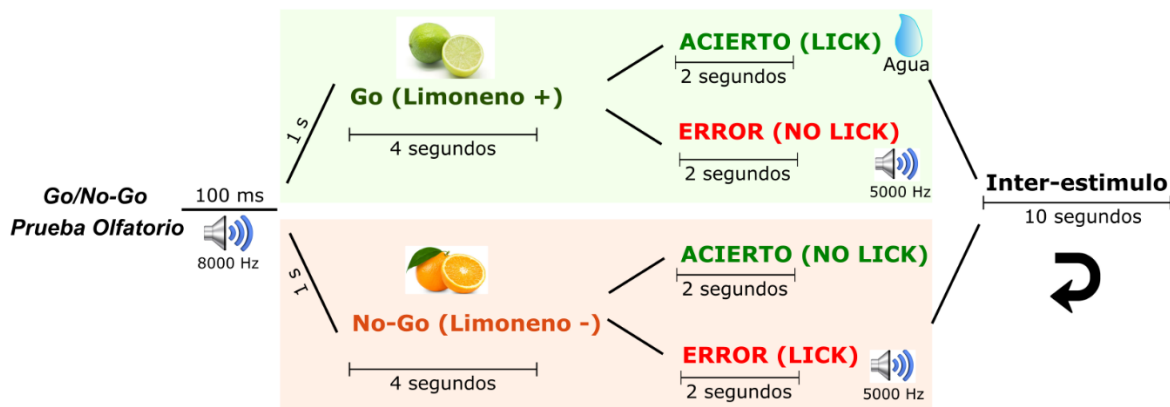


Figura 11. Esquema del condicionamiento operante tipo *Go/No-Go*. Se muestra un esquema de ensayos con las 4 respuestas posibles para la prueba conductual. Todos los ensayos, 100 en total, fueron aleatorizados. Cada ensayo inicia con un estímulo auditivo (8000 Hz) durante 100 milisegundos. Tras 1 segundo de espera, se presenta aleatoriamente uno de los dos aromas (limoneno (+) o limoneno (-); 100% v/v). Se consideraron ensayos correctos a aquellos en los que el animal lamó el lickómetro al finalizar la presentación de limoneno (+) por 4 segundos, y aquellos en los que el animal evita lamer en respuesta a la presentación de limoneno (-) también por 4 segundos. Solo los ensayos correctos después de la presentación del aroma con limoneno (+) son recompensados con una gota de agua. Los ensayos incorrectos corresponden a aquellos en los que el animal no lamó el lickómetro durante la presentación de limoneno (+) o aquellos en los que el animal lamó durante la estimulación con limoneno (-). Un estímulo auditivo (5000 Hz) se hizo sonar como castigo en ambos casos.

Imagenología óptica intrínseca en animales despiertos y anestesiados

Adquirimos imágenes ópticas intrínsecas de la superficie dorsal del bulbo olfatorio, donde es posible observar patrones de activación glomerular tras la estimulación con aromas (Rubin & Katz, 1999). Los experimentos fueron realizados en animales despiertos con la cabeza fija y bajo anestesia profunda. Los animales implantados que ya contaban con una ventana para la captura de la imagenología óptica fueron

montados en un equipo estereotáxico. Previo a la captura de las imágenes los animales fueron habituados durante 3 días al sistema de registro por un periodo de 30 minutos. Por otra parte, los animales del segundo grupo fueron anestesiado con uretano (2g/Kg i.p.) y posicionados en un equipo estereotáxico. Se removió el cráneo sobre uno de los bulbos olfatorios (ventana de 2 x 1 mm) dejando la duramadre intacta. Durante este proceso el tejido fue irrigado constantemente con LCRa. Finalmente, el bulbo olfatorio expuesto fue cubierto con un cubreobjetos de vidrio.

Para los animales implantados que fueron administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa como control, las imágenes fueron capturadas al término del entrenamiento del condicionamiento operante olfatorio (semana 1) y una vez por semana tras la administración del P β A₁₋₄₂, o su secuencia inversa, durante 12 días del EO (semanas 2 y 3). Con la finalidad de evaluar posibles cambios en la activación glomerular tras las distintas condiciones experimentales se realizó en todos los grupos experimentales el registro de la actividad espontánea, así como en presencia de odorantes: esencia de canela, butirato de etilo, acetato de amilo, limoneno (+) y limoneno (-). Cada uno de los aromas fue utilizado a una concentración del 100% y, posteriormente, fueron diluidos en aceite mineral a una concentración del 1% v/v. Para la toma de imágenes, se empleó un sistema de registro provisto de una cámara (Imager 3001F System Optical Imaging). El tejido se iluminó con una fuente de luz blanca que se pasó por dos filtros de luz, uno verde de 530 nm y otro rojo de 630 nm. El primero (530 nm), permite una captura del patrón de vasos sanguíneos de la superficie del BOP, con lo cual es posible determinar los sitios de activación que se observan con ayuda del segundo filtro de interferencia (630 nm). Todas las imágenes presentan una dimensión de 156 x 252 pixeles y la región visualizada de la superficie del bulbo olfatorio fue de 2mm x 1mm, con un tamaño de píxel de 50 μ m². Simultáneamente, se adquirió el electrocardiograma de los animales. Esta señal fue digitalizada con ayuda del software Clampex 10.6.2 (Axon Molecular Devices), y fue sincronizada con el software Vdaq (Vdaq 3001F, Optical Imaging Ltd), del sistema de adquisición de imágenes, para la sustracción del movimiento provocado por el latido cardiaco en

las imágenes del bulbo olfatorio. Durante la adquisición, se realizó la captura de 25 imágenes (1 segundo), que corresponden a la actividad espontánea bulbar o pre-estímulo. Posteriormente, se colectaron 100 imágenes (4 segundos) durante la actividad evocada con aromas. Finalmente, se capturaron 275 imágenes (11 segundos) que corresponden a un periodo post-estímulo. Cada uno de los aromas fueron presentados de 3-10 veces y las estimulaciones que no evocaron un cambio evidente en la reflectancia fueron descartados. Cada estimulación fue separada por un intervalo inter-estímulo de 3 minutos. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en un formato multi-TIFF con ayuda del software Vdaq (Vdaq 3001F, Optical Imaging Ltd), para su posterior análisis fuera de línea como se describe más adelante.

Oligomerización del péptido β -amiloide

La oligomerización del P β A₁₋₄₂ y su secuencia inversa (American Peptide), se llevó a cabo con un protocolo previamente estandarizado por Lambert y colaboradores (1998) y empleado por nuestro equipo de trabajo (Balleza-Tapia, 2014; Hernández-Soto *et al.*, 2019). Para ello, el P β A o su secuencia inversa se incubó con 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a una concentración final del péptido de 1mM a temperatura ambiente por 60 min. La solución se evaporó para remover todo el HFIP durante un periodo de aproximadamente 18 horas, al cabo del cual el péptido se resuspendió a una concentración de 5 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% y, posteriormente, se diluyó en medio F12 (sin rojo fenol) a una concentración final de 100 μ M. Esta solución se incubó por 24 horas de 4 a 5 °C y se centrifugó, a la misma temperatura, a 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contiene oligómeros y monómeros de P β A se colocó en alícuotas con 30 μ l y se usó directamente en los experimentos (Balleza-Tapia, 2014; Hernández-Soto *et al.*, 2019). Las alícuotas se mantuvieron en refrigeración a 4°C con la finalidad de evitar la formación de fibrillas de P β A (Balleza-Tapia, 2014; Hernández-Soto *et al.*, 2019). La composición de la solución oligomerizada del P β A₁₋₄₂ se corroboró mediante electroforesis estándar seguida de una tinción con plata, que muestra la presencia

de monómeros, dímeros, trímeros/tetrámeros, heptámeros/octámeros y protofibrillas (Hernández-Soto *et al.*, 2019).

Western blot

Las muestras de bulbo olfatorio se homogeneizaron en buffer de lisis (5 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato de sodio, 50 mM fluoruro de sodio, 100 mM pirofosfato ácido de sodio, 250 mM sacarosa, 1% Igepal Ca-630, pH 7.5) con inhibidores de proteasas (4693116001; Roche Diagnostics GmbH). Los lisados se centrifugaron a 13523 x g, durante 10 min, a 4°C. Se tomaron volúmenes suficientes para tomar 50 µg de proteína sobrenadante (cuantificada mediante el método de Bradford, Kielkopf *et al.*, 2020). Posteriormente, se mezclaron esas cantidades iguales de proteína total (50 µg) con buffer de muestra Laemmli 2X (1:1). Se hirvió esta mezcla durante 10 minutos a 95°C, y se corrió en geles de SDS-PAGE al 15%. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa durante 40 min utilizando un buffer de transferencia (Tris base 1.5 M, Glicina 0.2M, SDS 10%) y se bloquearon en leche desnatada al 5%, durante 1 hora. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios anti-BDNF a una dilución 1:500 (ab205067; Abcam plc.) y anti-β Tubulina a una dilución 1: 1000 (ab6046; Abcam plc.), en tampón de fosfato de sodio con Tween al 0.05%. Se utilizó un anticuerpo primario para la β-Tubulina (ab6046; Abcam plc) como proteína de control de carga. La inmunoreactividad se evaluó usando anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina a una dilución 1: 5000, anti-ratón de cabra (ab7069; Abcam plc) y anti-conejo de cabra (111-055-003; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc), respectivamente. La detección se realizó empleando el kit de sustrato conjugado de fosfatasa alcalina (170-6432; Bio-Rad Laboratories). Las transferencias del *Western blot* se digitalizaron con un scanner (Perfection V500 EPSON) y los valores de densidad óptica de BDNF se normalizaron a la cantidad de β-Tubulina con el software de análisis Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories).

Inmunofluorescencia

Para la inmunodetección del BDNF o del P β A, se obtuvieron rebanadas sagitales del bulbo olfatorio principal de 30 μ m de grosor. Las rebanadas fueron incubadas en una solución bloqueadora (PBS 0.01 M, 0.1% Tritón X-100 y 10% suero de burro), durante 30 minutos, a temperatura ambiente, seguido de 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las rebanadas fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-BDNF a una dilución 1: 1000 (ab205067; Abcam plc) o con anticuerpo primario BAM-10 (MA1-91209; Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1: 1000. Después de 3 lavados de 10 minutos con PBS 0.01 M, se evaluó la presencia de marca usando el anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 anti-ratón de cabra (A-11004; Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1: 500. Para el marcaje de los núcleos celulares las rebanadas fueron incubadas con DAPI (D1306; Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1: 50000, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, las rebanadas fueron montadas en portaobjetos, cubiertas con cubreobjetos utilizando un medio de montaje (DPX, Sigma-Aldrich Inc.) y se les dejó secar por una noche a temperatura ambiente. Las imágenes fueron capturadas usando un microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss Inc.), con objetivos de 40x. Se cuantificó la fluorescencia de 3 rebanadas de BOP por animal mediante el software Zen blue 3.4 (Carl Zeiss Inc.). En cada rebanada se realizó la captura de una imagen de 100 μ m x 140 μ m, que contenía la totalidad de las capas del BOP. Posteriormente, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de 5 ventanas aleatorias de 20 μ m x 20 μ m. Para la aleatorización de las ventanas seleccionadas se empleó un código elaborado en Matlab 2019a (MathWorks, Inc), empleando la función *randi*.

Análisis estadístico

Registros electrofisiológicos

Los registros del LFP de la totalidad de las capas del bulbo olfatorio fueron analizados fuera de línea utilizando el Programa NeuroExplorer (versión 5.037 Nex Technologies). La señal fue descompuesta mediante la transformada rápida de

Fourier con una ventana tipo Hamming. Con ello, se obtuvo la potencia de la actividad espontánea y la actividad inducida con aromas. Se promediaron las 3 estimulaciones efectuadas para el mismo aroma. Posteriormente, para obtener el porcentaje de cambio de la actividad eléctrica bulbar, después de la estimulación olfatoria, los valores promedios de la potencia de 1-59 Hz fueron normalizados con respecto a la potencia de la actividad espontánea, establecida como el 100% para el análisis. Finalmente, se realizó una ANOVA de dos vías de múltiples comparaciones con una $p < 0.05$.

Registro de la respiración

Los registros de la respiración fueron obtenidos con un sensor piezoeléctrico y analizados como se describe a continuación. Las señales fueron amplificadas, filtradas (0.3-0.3 kHz; 7P511L, Grass Instruments Co.) y digitalizadas a 1kHz (MiniDigi 1B, Axon Instruments) con el software AxoScope (versión 10.7, Molecular Devices, CA, USA). Los registros fueron analizados usando Clampfit (versión 10.7, Molecular Devices). Se analizaron 10 segmentos de 10 segundos cada uno, durante la actividad espontánea. Se contabilizó el número de ciclos inspiratorios por segundo y se obtuvo la frecuencia respiratoria promedio. Debido a la distribución normal de los datos los resultados obtenidos fueron analizados con una prueba T de Student. Con la finalidad de establecer posibles relaciones entre la potencia relativa de theta del BOP y la frecuencia respiratoria, se realizó un análisis de la correlación de Pearson (Hernández-Soto *et al.*, 2021). Los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 8.1, GraphPad Software Inc.) y se graficaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM) en todos los casos.

Imagenología óptica intrínseca

Los datos fueron segmentados de acuerdo con la duración del periodo pre-estímulo, a la estimulación con aromas y a la condición post-estímulo. El cambio en la reflectancia en cada píxel ($\Delta R/R$) a lo largo del archivo multi-TIFF fue analizado con la siguiente fórmula: $R1-R0/R1$, donde $R1$ es la reflectancia promedio de cada

píxel durante la presentación del aroma (4 segundos) y R_0 es la reflectancia promedio durante el periodo pre-estímulo.

Se obtuvo la imagen promedio durante la estimulación con aromas y con ella se realizó la identificación automática de los glomérulos activos y su área. Dichos análisis fueron realizados con ayuda de los softwares WinMix (Optical Imaging Ltd) e ImageJ (versión 1.51k), tal como lo describe Grishagin (2015), con algunas modificaciones. Cada imagen RGB promediada se transformó a un formato de 8 bits (0 = negro a 255 = blanco). Para analizar el área y el número de glomérulos, con base en los cambios en la reflectancia durante la presentación del olor, usamos la función “*analizar partículas*” del software Imagen J. Se estableció un umbral de 1.5 desviaciones estándar del histograma de distribución de píxeles para obtener una imagen binaria con aquellos píxeles que superaban este valor. Un grupo de píxeles mayor o igual a 10 ($\geq 500 \mu\text{m}^2$) se consideró como un glomérulo (Rubin & Katz, 1999; Nagayama *et al.*, 2014). Adicionalmente, se realizó la evaluación temporal del cambio de reflectancia para cada glomérulo, con una resolución de 1 fotograma (40 ms), con la función “*multi-measure*” en el software imagen J. Con ello, fue posible obtener los cambios de la reflectancia a lo largo de los 16 segundos del registro. El cambio en la reflectancia usado para la comparación entre grupos se obtuvo de la diferencia de la reflectancia en el último segundo de la estimulación con aromas (últimos 25 fotogramas durante el aroma). Así mismo, se cuantificó la media de los grupos de píxeles o glomérulos identificados. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 8.1, GraphPad Software Inc.) y se graficaron como la media \pm el EEM en todos los casos. La distribución acumulada del área glomerular fue graficada en GraphPad Prism (versión 8.1, GraphPad Software Inc.). Finalmente, comparamos la similitud de los mapas olfatorios evocados con acetato de amilo y esencia de canela. Para ello, realizamos la cuantificación de la Distancia Euclidiana (DE) entre todos los glomérulos identificados en el mapa olfatorio obtenido durante la estimulación con acetato de amilo y el mapa olfatorio en presencia de esencia de canela. El centroide y las coordenadas de cada glomérulo fueron identificado con ayuda del software ImageJ (versión 1.51k). La DE entre todos los centroides de los glomérulos fue calculada

empleando una rutina personalizada en Matlab 2019a (MathWorks, Inc), usando la función *pdist2*. El resultado fue promediado por cada animal estimulado con ambos aromas.

Evaluaciones conductuales

Para la prueba de habituación-deshabitación se cuantificó el tiempo de exploración de cada uno de los aromas presentados. Con la finalidad de evaluar las diferencias entre los grupos se realizó una ANOVA de dos vías con una $p < 0.05$.

Para las pruebas de campo abierto, debido a la distribución no normal de los datos ($p > 0.05$, prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov), éstos fueron analizados mediante las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 8.1, GraphPad Software Inc.) y se graficaron como la media \pm el EEM en todos los casos.

Western Blot

La densidad óptica de los niveles de BDNF fue evaluada empleando una prueba T de Student no pareada, debido a la distribución normal de los datos. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 8.1, GraphPad Software Inc.) y se graficaron como la media \pm el EEM en todos los casos. Así mismo, fueron reportados los datos individuales de densidad óptica.

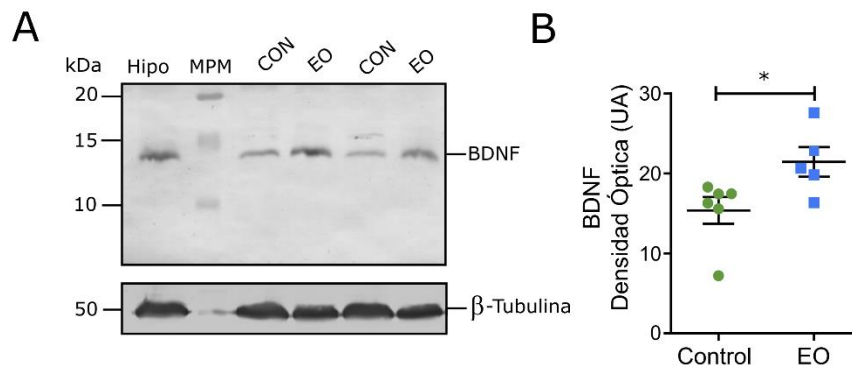
Inmunofluorescencia

Las muestras fueron analizadas con el software Zen lite (Zen Blue Edition 3.4, Carl Zeiss Microscopy GmbH). Se calculó la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante una prueba paramétrica T de Student debido a la distribución normal de los datos. Los datos se graficaron como la media \pm el EEM en todos los casos.

RESULTADOS

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la expresión de BDNF en el bulbo olfatorio principal

Con el propósito de evaluar las modificaciones moleculares que produce el enriquecimiento olfatorio, se realizó un análisis de los niveles del BDNF en el BOP, mediante la técnica de *Western Blot*. La cuantificación de los niveles de BDNF bulbar, normalizados con respecto a los niveles β -Tubulina, indica que los animales enriquecidos presentan niveles de BDNF significativamente más altos (Figura 12 A-B; $n = 5$; $p < 0.05$) en comparación con los animales control (Figura 12 A-B; $n = 6$).



Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la actividad glomerular evocada con aroma

Con el objetivo de evaluar si el enriquecimiento modifica los patrones de activación glomerular evocados con aromas en la superficie dorsal del BOP, empleamos la técnica de imagenología óptica intrínseca en animales anestesiados y despiertos con la cabeza fija (ver materiales y métodos). Durante la estimulación con aromas

(acetato de amilo y canela) encontramos áreas discretas con una forma circular (de aproximadamente $500\mu\text{m}^2$), que corresponden a los glomérulos activos en animales control y enriquecidos olfatoriamente. Con relación al grupo de animales anestesiados, nuestros datos muestran que los animales enriquecidos olfatoriamente muestran una reducción significativa en el número de glomérulos evocados durante la estimulación con acetato de amilo (Figura 13 A-B; 9.57 ± 1.52 glomérulos; $n = 7$) en comparación con los animales control anestesiados (Figura 13 A-B; 15.67 ± 1.71 glomérulos; $n = 6$). Del mismo modo, durante la estimulación con esencia de canela los animales enriquecidos olfatoriamente presentan una reducción en el número de glomérulos evocados (Figura 13 A-B; 6.00 ± 1.03 glomérulos; $n = 6$) en comparación con los animales control anestesiados (Figura 13 A-B; 16.00 ± 2.86 glomérulos, $n = 5$; $p < 0.05$). El análisis del área de los glomérulos muestra que los animales enriquecidos olfatoriamente presentan glomérulos más grandes durante la estimulación con acetato de amilo (Figura 13 C; $1.13 \pm 0.32 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 7$) que los de los animales control (Figura 12 C; $0.49 \pm 0.07 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 6$; $p < 0.05$). Así mismo, los animales enriquecidos olfatoriamente exhiben glomérulos más grandes (Figura 13 C; $2.93 \pm 0.73 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 6$) que los de los animales control (Figura 13 C; $0.89 \pm 0.06 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, $n = 5$; $p < 0.05$) cuando son estimulados con esencia de canela. La distribución acumulada del área glomerular de los glomérulos reclutados durante la estimulación con acetato de amilo o esencia de canela en los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 13 D-E; $n = 7$) muestra un desplazamiento a la derecha en contraste con la de los animales control (Figura 13 D-E; $n = 6$). La cuantificación de la intensidad glomerular durante la estimulación con acetato de amilo en animales enriquecidos olfatoriamente, expresada como una reducción en la reflectancia en la superficie del MOB, muestra una activación glomerular más fuerte (Figura 13 F, H; -20.04 ± 2.99 % de reflectancia; $n = 6$) en comparación con la de los animales control (Figura 13 F, H; -10.39 ± 2.17 % de reflectancia; $n = 4$; $p < 0.05$). Adicionalmente, la intensidad de activación glomerular inducida por esencia de canela fue más fuerte en los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 13 G-H; -12.47 ± 3.11 % de reflectancia; $n = 5$), en comparación con la de los animales control (Figura 13 G-H;

-5.93 ± 1.20 % de reflectancia; n = 5; p<0.05). Se analizaron las diferencias entre la distribución espacial de la respuesta glomerular evocada con acetato de amilo y esencia de canela, mediante la cuantificación de la distancia euclidiana entre los glomérulos evocados en ambos mapas olfatorios. Los resultados muestran que los mapas olfatorios en animales enriquecidos olfatoriamente son más diferenciables (Figura 13 I; $1.39 \pm 0.008 \times 10^{-3}$ DE; n = 4; p<0.05) en comparación con los obtenidos en animales control (Figura 13 I; $1.14 \pm 0.031 \times 10^{-3}$ DE; n = 3; p<0.05).

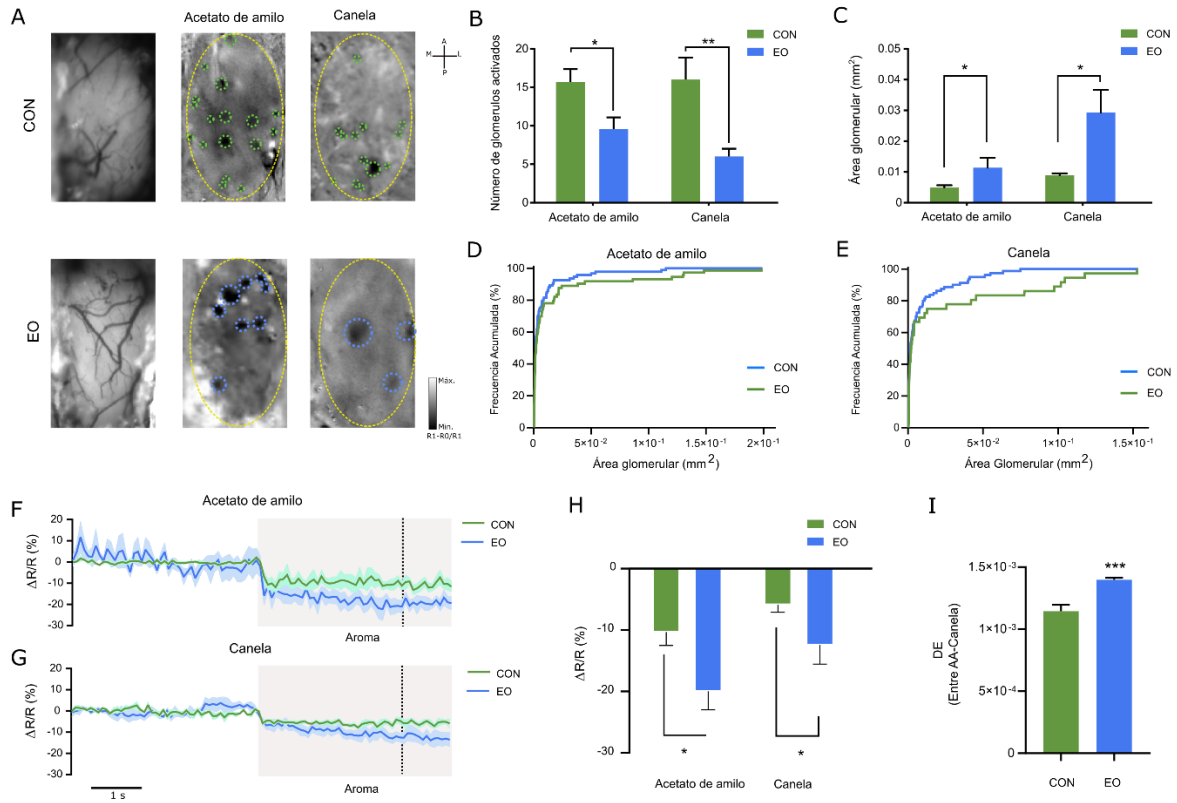


Figura 13. Evaluación de la actividad glomerular evocada tras la estimulación con acetato de amilo y esencia de canela en animales control y enriquecidos olfatoriamente anestesiados. A) Patrón de vasos sanguíneos de la superficie dorsal del bulbo olfatorio principal (BOP; izquierda) y sus señales ópticas intrínsecas evocadas con acetato de amilo (en medio) y esencia de canela (derecha), en animales control (CON; imágenes superiores) y enriquecidos olfatoriamente (EO; imágenes inferiores). Las líneas punteadas, amarillas, verdes y azules indican las regiones de interés (ROI; por sus siglas en inglés) situadas sobre la superficie dorsal del BOP y los glomérulos activados. B) Cuantificación del número total de glomérulos activados. C) Área glomerular. D) Distribución acumulada del área de los glomérulos evocados con acetato de amilo. E) Distribución acumulada del área de los glomérulos evocados con esencia de canela. F) Curso temporal de la activación glomerular evocada con acetato de amilo. G) Curso temporal de la activación glomerular evocada con esencia de canela. Las líneas solidas representan la media y las regiones sombreadas representan el EEM y el recuadro gris representa el periodo de aplicación del aroma. H) Cambio de la reflectancia promedio al final de la estimulación (último segundo, línea punteada vertical) con acetato de amilo y esencia de canela cuantificado para los animales control (verde) y enriquecidos olfatoriamente (azul). I) Distancia Euclidiana promedio (DE) entre los glomérulos evocados con acetato de amilo y esencia de canela, en el mismo animal para los grupos control (CON; verde) y enriquecidos olfatoriamente (EO; azul). *, **, *** Denotan una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La actividad neuronal en el BOP en ausencia o en presencia de aromas, difiere notablemente en animales despiertos y anestesiados (Chery *et al.*, 2014; Rinberg *et al.*, 2006). Por ello, con la finalidad de evaluar si los cambios inducidos por el enriquecimiento olfatorio sobre la activación glomerular inducida con aromas dependen del estado de conciencia de los animales, realizamos la evaluación de la imagenología óptica intrínseca del BOP en animales despiertos con la cabeza fija. Nuestros resultados indican que el número de glomérulos evocados tras la estimulación con acetato de amilo es significativamente menor en los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 14 B; 4.22 ± 0.52 glomérulos; $n = 3$; $p < 0.05$) en comparación con los animales control despiertos (Figura 14; 5.78 ± 0.60 glomérulos, $n = 3$; $p < 0.05$). Así mismo, cuando los animales fueron estimulados con esencia de canela el número de glomérulos activos tendió a ser más pequeño en animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 14 B; 4.67 ± 0.62 glomérulos; $n = 3$; $p = 0.098$) en comparación con los animales control (Figura 14 B; 6.00 ± 0.76 glomérulos, $n = 3$; $p < 0.05$). Un análisis del área de los glomérulos activados reveló que los animales enriquecidos olfatoriamente exhiben glomérulos más grandes durante la estimulación con acetato de amilo (Figura 14 C; $4.54 \pm 1.69 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 3$) en comparación con la de los animales control (Figura 14 C; $2.02 \pm 0.42 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 3$; $p = 0.084$). De igual forma, se observa un incremento en el área de los glomérulos activos en los animales enriquecidos olfatoriamente durante la estimulación con esencia de canela (Figura 14 C; $4.02 \pm 1.62 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 3$) en relación con la de los animales control (Figura 14 C; $1.44 \pm 0.32 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, $n = 3$; $p = 0.069$). La distribución acumulada del área de los glomérulos reclutados durante la estimulación con acetato de amilo (Figura 14 D; $n = 3$) y esencia de canela (Figura 14 D; $n = 3$) en animales enriquecidos olfatoriamente presenta un desplazamiento a la derecha de la distribución con respecto a la de los animales control (Figura 14 D; $n = 3$ en ambos grupos). La cuantificación de la intensidad de activación glomerular inducida tras la estimulación con acetato de amilo fue similar entre los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 14 F, H; -17.76 ± 6.83 % de la reflectancia; $n = 3$) y los animales control (Figura 14 F, H; -7.10 ± 14.27 % de reflectancia; $n = 3$; $p > 0.05$). De la misma forma, se observa que la intensidad

glomerular inducida durante la estimulación con esencia de canela fue similar en los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 14 G-H; -17.17 ± 7.87 % de la reflectancia; $n = 3$) y los animales control despiertos (Figura 14 G-H; -16.73 ± 7.88 % de la reflectancia; $n = 3$; $p > 0.05$). La evaluación de la distancia euclidiana glomerular de los mapas glomerulares evocados durante la estimulación con acetato de amilo y canela muestra que ambos mapas son más disímiles en los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 14 I; $4.80 \pm 0.11 \times 10^{-3}$ DE; $n = 3$; $p < 0.05$) en comparación con los animales control despiertos (Figura 14 I; $4.27 \pm 0.01 \times 10^{-3}$ DE; $n = 3$).

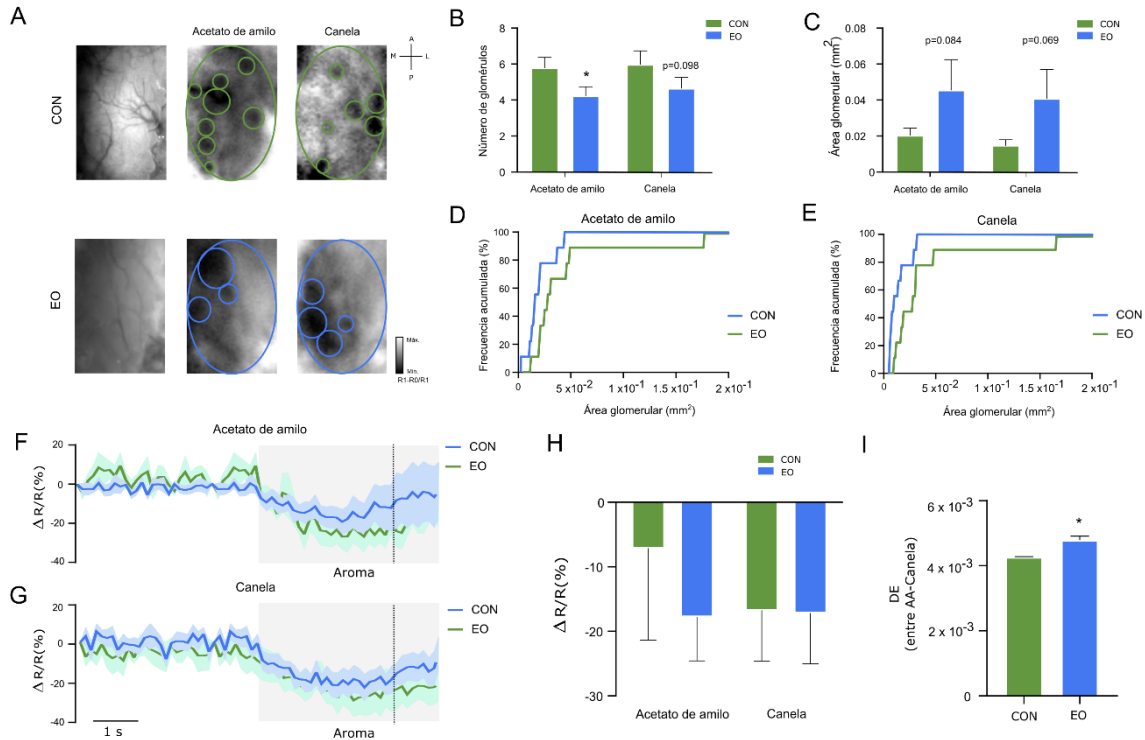


Figura 14. Evaluación de la actividad glomerular evocada tras la estimulación con acetato de amilo y esencia de canela en animales control y enriquecidos olfatoriamente despiertos. A) Patrón de vasos sanguíneos de la superficie dorsal del bulbo olfatorio principal (BOP; izquierda) y sus señales ópticas intrínsecas evocadas con acetato de amilo (en medio) y esencia de canela (derecha), en animales control (CON; imágenes superiores) y enriquecidos olfatoriamente (EO; imágenes inferiores). Las líneas punteadas, amarillas, verdes y azules indican las regiones de interés (ROI; por sus siglas en inglés) situadas sobre la superficie dorsal del BOP y los glomérulos activados. B) Cuantificación del número total de glomérulos activados. C) Área glomerular. D) Distribución acumulada del área de los glomérulos evocados con acetato de amilo. E) Distribución acumulada del área de los glomérulos evocados con esencia de canela. F) Curso temporal de la activación glomerular evocada con acetato de amilo. G) Curso temporal de la activación glomerular evocada con esencia de canela. Las líneas solidas representan la media y las regiones sombreadas representan el EEM y el recuadro gris representa el periodo de aplicación del aroma. H) Cambio de la reflectancia promedio al final de la estimulación (último segundo, línea punteada vertical) con acetato de amilo y esencia de canela cuantificado para los animales control (verde) y enriquecidos olfatoriamente (azul). I) Distancia Euclidiana promedio (DE) entre los glomérulos evocados con acetato de amilo y esencia de canela, en el mismo animal para los grupos control (CON; verde) y enriquecidos olfatoriamente (EO; azul). * Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. * $p < 0.05$.

Efecto del enriquecimiento olfatorio en la actividad del circuito bulbar durante la actividad espontánea e inducida con aromas

El LFP del BOP en ratones anestesiados, durante la actividad espontánea e inducida con aromas, presenta oscilaciones lentas más potentes en el rango de frecuencia theta (1-12 Hz). Así mismo se presenta una superposición de oscilaciones con menor potencia en el rango de frecuencias beta (12-30 Hz) y gamma (30-120 Hz; Figura 15). Este patrón fue claramente distinguible en los animales enriquecidos olfatoriamente y en los controles anestesiados con uretano. Sin embargo, la proporción de los componentes rápidos de frecuencia muestra un incremento en los animales enriquecidos olfatoriamente, comparados con los animales control, mientras que la proporción de oscilaciones lentas disminuyó (Figura 15). La proporción de la potencia en la banda theta durante la actividad espontánea del BOP de los animales enriquecidos olfatoriamente fue significativamente más pequeña (Figura 15 A; 44.99 ± 7.91 %; $n = 6$) en comparación con la de los animales control anestesiados (Figura 15 A; 76.11 ± 4.08 %; $p < 0.05$, $n = 10$). En contraste, la proporción de la potencia en las bandas de frecuencia beta (Figura 15 A; 30.19 ± 6.37 %) y gamma (Figura 15 A; 27.48 ± 7.14 %; $n = 6$) de los animales enriquecidos olfatoriamente fue significativamente más grande que las de los animales control (Figura 15 A; 14.29 ± 2.75 % y 12.25 ± 2.23 %; respectivamente; $p < 0.05$, $n = 10$).

Durante la estimulación con un aroma monomolecular (acetato de amilo) la proporción de la potencia de la banda theta en los animales enriquecidos olfatoriamente fue significativamente más pequeña (Figura 15 B; 73.69 ± 7.06 %; $n = 6$) en relación con la de los animales control (Figura 15 B; 91.53 ± 1.41 %; $p < 0.05$, $n = 10$). Por el contrario, la proporción de la potencia de las bandas beta (Figura 15 B; 16.59 ± 4.74 %) y gamma (Figura 15 B; 10.90 ± 3.70 %; $n = 6$) fue significativamente mayor que las de los animales control (Figura 15 B; 5.68 ± 1.03 % y 3.81 ± 0.77 %; respectivamente; $p < 0.05$, $n = 10$). Ante la estimulación con un aroma complejo (esencia de limón; Vinicis *et al.*, 2012; Darjazi, 2013; Al-Jabri & Hossain, 2014) se observó que la proporción de la potencia de la banda theta en los animales enriquecidos olfatoriamente, fue más pequeña (Figura 15 C; 64.25 ± 7.90

%; n = 6) que la de los animales control (Figura 15 C; 87.64 ± 2.49 %; $p < 0.05$, n = 10). Por otra parte, la proporción de la potencia de las bandas de frecuencia beta (Figura 15 C; 23.14 ± 5.28 %) y gamma (Figura 15 C; 15.30 ± 4.65 %; n = 6) en los animales enriquecidos olfatoriamente fue significativamente más grande que las de los animales control (Figura 15 C; 7.07 ± 1.62 % and 6.05 ± 1.34 %; respectivamente; $p < 0.05$, n = 10).

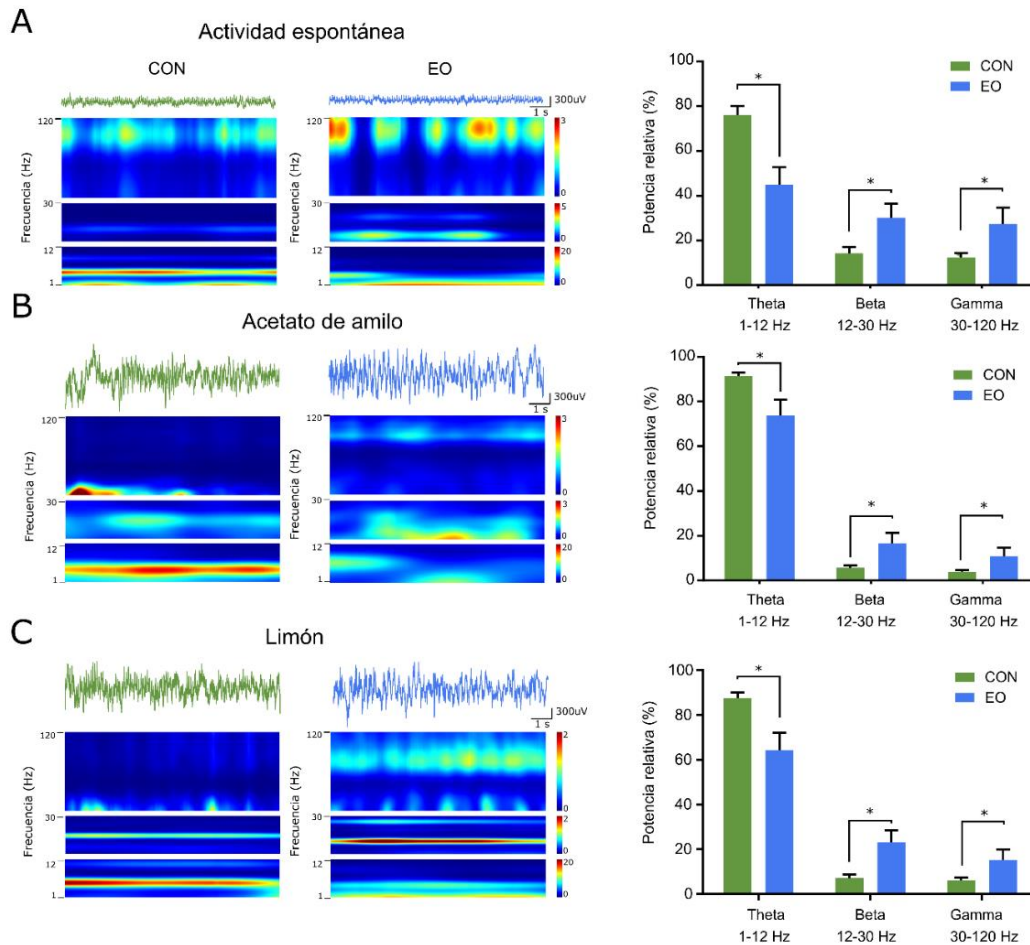


Figura 15. Evaluación de la actividad neuronal poblacional bulbar espontánea y durante la estimulación con acetato de amilo y esencia de canela en animales anestesiados de los grupos control y enriquecidos olfatoriamente. Registros electrofisiológicos del potencial de campo local en el bulbo olfatorio principal (BOP) y sus espectrogramas de potencia correspondientes en animales control (izquierda) y enriquecidos olfatoriamente (en medio), durante la actividad espontánea (A) y en presencia de acetato de amilo (B) y esencia de limón (C). La escala de color en los espectrogramas representa la potencia relativa en todos los casos. Las gráficas de la derecha muestran las cuantificaciones de la potencia relativa en las tres bandas de frecuencia: theta (1-12 Hz), beta (12-30 Hz) y gamma (30-120 Hz) para los animales control (CON; verde) y enriquecidos con aromas (EO; azul). Note una reducción en la banda de frecuencia theta y un incremento en la banda de frecuencia beta y gama en los animales enriquecidos olfatoriamente en las tres condiciones. * Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. * $p < 0.05$.

La respiración modula fuertemente las oscilaciones theta del BOP (Rojas-Líbano *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020; Figura 16 A), por lo que evaluamos si los cambios observados en la actividad theta de los animales enriquecidos olfatoriamente estaban relacionados con cambios en la frecuencia respiratoria. Nuestros resultados indican que la frecuencia respiratoria no está alterada en los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 16 B; 3.76 ± 0.36 Hz; $p > 0.05$; $n = 6$), comparados con los animales control anestesiados (Figura 16 B; 3.32 ± 0.36 Hz; $p > 0.05$; $n = 10$). Además, encontramos que la frecuencia respiratoria no está correlacionada con la potencia relativa de la banda de frecuencia theta en ninguno de los grupos experimentales evaluados (Figura 16 C; $r^2 = -0.29$; $p > 0.05$).

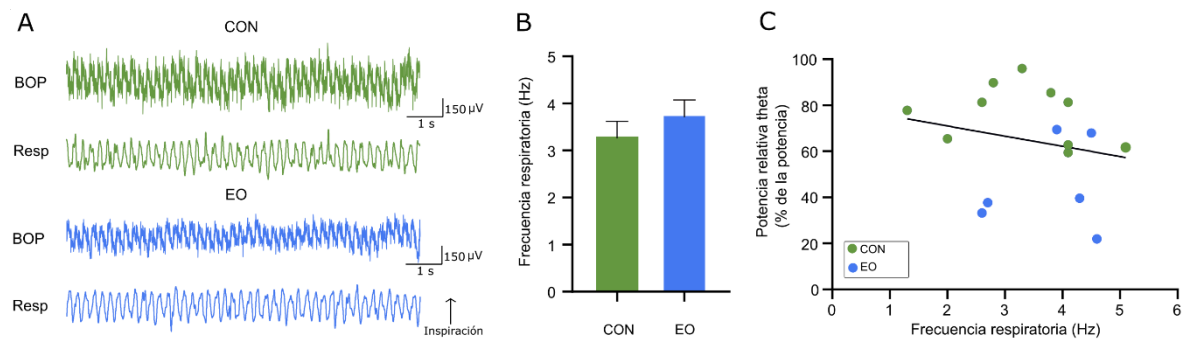


Figura 16. Evaluación de la frecuencia respiratoria y su correlación con la potencia relativa de las oscilaciones theta bulbar en animales control y enriquecidos olfatoriamente. A) Trazos representativos de los registros del potencial de campo local del bulbo olfatorio principal (BOP; arriba) y la respiración (Resp; abajo) medida como los movimientos rítmicos del tórax en animales control (CON; trazos superiores) y enriquecidos olfatoriamente (EO; trazos inferiores). B) Cuantificación de la frecuencia respiratoria en ambos grupos. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. C) Ausencia de correlación entre la frecuencia respiratoria y la potencia relativa de la banda de frecuencia theta durante la actividad espontánea. $p > 0.05$.

Los anestésicos como el uretano son capaces de inducir modificaciones en el patrón de oscilaciones neuronales disminuyendo la potencia de las oscilaciones rápidas e incrementando las oscilaciones lentas (Li *et al.*, 2012). Por ello, con la finalidad de evaluar si los cambios inducidos por el enriquecimiento olfatorio en el circuito bulbar dependen del estado de conciencia de los animales, realizamos la evaluación del LFP del BOP en animales despiertos con la cabeza fija. Nuestros resultados indican que, durante la actividad espontánea e inducida con aromas, la actividad oscilatoria bulbar fue dominada por oscilaciones lentas más potentes en el rango de frecuencia

theta (1-12 Hz). Adicionalmente, se observa la presencia de oscilaciones con menor potencia en el rango de frecuencias beta (12-30 Hz) y gamma (30-120 Hz; Figura 17). Este patrón de actividad en el BOP se presentó tanto en los animales enriquecidos olfatoriamente como en los animales control despiertos. Sin embargo, la proporción de los componentes de frecuencia rápidos en animales enriquecidos olfatoriamente incrementó comparados con los animales control mientras que los componentes lentos de frecuencia disminuyeron (Figura 16). Adicionalmente nuestros resultados indican que, durante la actividad espontánea, en ausencia de aromas, los animales enriquecidos olfatoriamente presentan una reducción significativa de la potencia de la banda theta (Figura 17 A; $88.73 \pm 0.75 \%$; $n = 3$) en comparación con la de los animales control despiertos (Figura 17 A; $95.55 \pm 0.90 \%$; $p < 0.05$, $n = 3$). Por el contrario, se observó que la proporción de la potencia relativa en las bandas de frecuencia beta (Figura 17 A; $7.23 \pm 0.86 \%$) y gamma (Figura 17 A; $4.03 \pm 0.16 \%$; $n = 3$) en los animales enriquecidos olfatoriamente fue significativamente más grande que la de los animales control despiertos (Figura 17 A; $2.83 \pm 0.34 \%$ y $1.61 \pm 0.57 \%$; respectivamente; $p < 0.05$, $n = 3$). Por otra parte, la cuantificación de la potencia relativa del LFP en el BOP durante la estimulación con acetato de amilo indica que los animales enriquecidos olfatoriamente presentan una reducción significativa en la banda de frecuencia theta (Figura 17 B; $88.10 \pm 1.69 \%$; $n = 3$) con respecto a la de los animales control despiertos (Figura 17 B; $94.49 \pm 2.51 \%$; $p < 0.05$, $n = 3$). En contraste, la proporción de la potencia en las bandas de frecuencia beta (Figura 17 B; $9.12 \pm 1.77 \%$) y gamma (Figura 17 B; $2.78 \pm 0.08 \%$; $n = 3$) en los animales enriquecidos olfatoriamente fue significativamente más grande que la de los animales control despiertos (Figura 17 B; $4.99 \pm 2.29 \%$ y $0.52 \pm 0.22 \%$; respectivamente; $p < 0.05$, $n = 3$). Adicionalmente, se observa que durante la estimulación con esencia de limón los animales enriquecidos olfatoriamente presentan una reducción significativa en la potencia relativa de la banda de frecuencia theta (Figura 17 C; $85.83 \pm 2.15 \%$; $n = 3$) en comparación con la de los animales control despiertos (Figura 17 C; $93.17 \pm 0.40 \%$; $p < 0.05$, $n = 3$). Por el contrario, la cuantificación de la potencia relativa de las bandas de frecuencia beta (Figura 17 C; $9.90 \pm 1.99 \%$) y gamma (Figura 17 C; $4.27 \pm 0.76 \%$; $n = 3$)

muestran un incremento significativo en comparación con la de los animales control despiertos (Figura 17 C; $5.46 \pm 0.63 \%$ and $1.37 \pm 0.28 \%$; respectivamente; $p < 0.05$, $n = 3$).

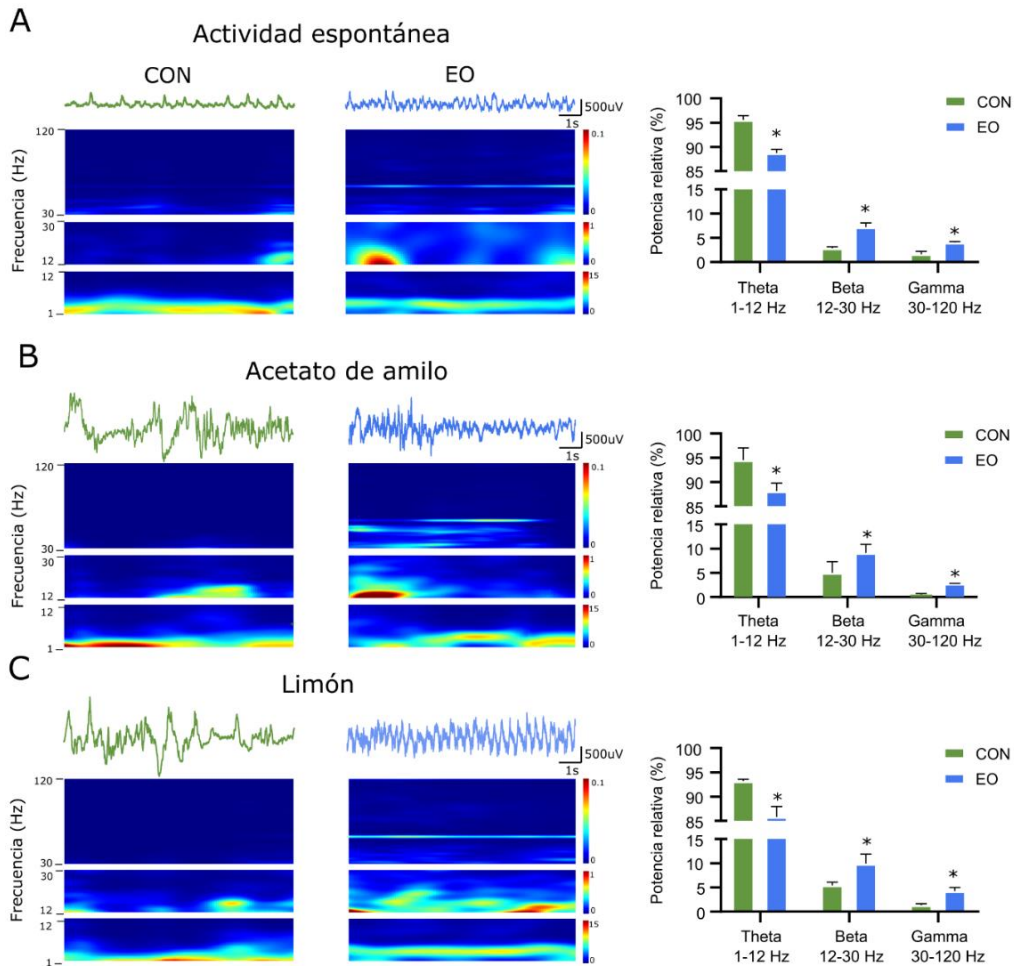


Figura 17. Evaluación de la actividad neuronal poblacional bulbar espontánea y durante la estimulación con acetato de amilo y esencia de canela en animales control y enriquecidos olfatoriamente despiertos con la cabeza fija. Registros electrofisiológicos del potencial de campo local en el bulbo olfatorio principal (BOP) y sus espectrogramas de potencia correspondientes en animales control (izquierda) y enriquecidos olfatoriamente (en medio), durante la actividad espontánea (A) y en presencia de acetato de amilo (B) y esencia de limón (C). La escala de color en los espectrogramas representa la potencia relativa en todos los casos. Las gráficas de la derecha muestran las cuantificaciones de la potencia relativa en las tres bandas de frecuencia: theta (1-12 Hz), beta (12-30 Hz) y gamma (30-120 Hz) para los animales control (CON; verde) y enriquecidos con aromas (EO; azul). Note una reducción en la banda de frecuencia theta y un incremento en la banda de frecuencia beta y gama en los animales enriquecidos olfatoriamente en las tres condiciones. * Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. * $p < 0.05$.

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la detección y discriminación de aromas

Con la finalidad de evaluar el impacto del enriquecimiento olfatorio sobre distintos aspectos de la olfacción, realizamos diferentes pruebas conductuales olfatorias (ver material y métodos). Inicialmente, evaluamos la habilidad de los animales para encontrar un trozo de alimento, así como su tendencia innata a buscar comida (Yang & Crawley, 2009; Rattazzi *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2018). Los resultados muestran que la latencia para encontrar el alimento escondido fue similar entre los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 18 A; 36.17 ± 11.70 segundos, $n = 6$) y los animales control (Figura 18 A; 34.28 ± 11.83 segundos; $n = 7$; $p > 0.05$). Adicionalmente, evaluamos la habilidad de los animales para habituarse a la presentación repetitiva de aromas y la discriminación de aromas distintos mediante la prueba de habituación/ deshabituación (Arbuckle *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2017; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Nittenson *et al.*, 2019). Al realizar esta prueba empleando aromas a una concentración alta (100 % v/v; Figura 18 B, D-F) observamos un rendimiento típico de habituación/ deshabituación en ambos grupos (Figura 18 D-F; $n = 10$ en ambos grupos). La habituación se define como una disminución en el tiempo de exploración ante la presentación repetida de un mismo aroma, mientras que la deshabituación se define como un incremento en la exploración ante la presentación de un aroma nuevo. No se reportan diferencias significativas en los tiempos de exploración de cada uno de los aromas presentados durante la prueba entre los animales enriquecidos olfatoriamente y los animales control (Figura 18 D-F; $n = 10$ en ambos grupos; $p > 0.05$). Una normalización de los tiempos de exploración con respecto al primer ensayo de cada bloque de aromas (considerado como 100 % para el análisis), indica que los animales enriquecidos olfatoriamente reducen su tiempo de exploración a 11.68 ± 3.23 % cuando el vinagre a una concentración alta (100% v/v; Figura 18 B, E) fue presentado por tercera vez y a 11.71 ± 5.41 % cuando la esencia de vainilla a una concentración alta (100% v/v; Figura 18 B, E) fue presentada por tercera vez. Este fenómeno fue similar a la habituación mostrada por los animales control quienes reducen su exploración a 13.85 ± 5.89 % ($n = 10$; $p < 0.05$; Figura 18 B-D) cuando el vinagre a una

concentración alta (100% v/v; Figura 18 B, D) fue presentado por tercera ocasión y a 11.23 ± 3.53 % cuando la esencia de vainilla a una concentración alta (100% v/v; Figura 18 B, D) fue presentado por tercera ocasión.

Para la evaluación de la discriminación olfatoria con base en el fenómeno de deshabitación, y que se refleja como un incremento en la exploración cuando se presenta un aroma nuevo (Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018; Hernández-Soto *et al.*, 2021), se cuantificó el índice de habituación cruzada (Wesson *et al.*, 2010). Este índice resulta de la diferencia del tiempo de exploración normalizado de la tercera exposición de un aroma particular que se resta al tiempo de exploración al aroma subsecuente en el siguiente ensayo novedoso (Hernández-Soto *et al.*, 2021). Este análisis indica que los animales enriquecidos olfatoriamente y controles no muestran diferencias significativas en la discriminación de aromas a una concentración alta (Figura 18 F; 83.40 ± 3.20 y 85.47 ± 2.63 , respectivamente; n = 6 en ambos grupos).

Con la finalidad de incrementar la dificultad en la discriminación de aromas durante la prueba de habituación/deshabitación, los aromas fueron diluidos en agua destilada a una concentración del 1% v/v (Figura 18 C, G-I). Los resultados indican que los animales enriquecidos olfatoriamente incrementaron significativamente el tiempo de exploración cuando la vainilla fue presentada durante la primera (Figura 18 C; 5.75 ± 1.31 segundos; n = 6; $p < 0.05$) y la segunda exposición (Figura 18 C; 3.75 ± 0.99 segundos; n = 6; $p < 0.05$), en comparación con los animales control (Figura 18 C; 1.66 ± 0.41 segundos y 0.53 ± 0.24 segundos respectivamente; n = 6; $p < 0.05$). El análisis de la exploración normalizada muestra que los animales enriquecidos olfatoriamente presentan una reducción significativa en el tiempo de exploración a la tercera presentación de vinagre (Figura 18 C, H; 38.82 ± 16.22 %; n = 6; $p < 0.05$) y esencia de vainilla (Figura 18 C, H; 55.40 ± 13.02 %; n = 6; $p < 0.05$) a concentraciones bajas (Figura 18 C, H; 1% v/v en agua destilada). Por el contrario, los animales control no muestran diferencias significativas en la tercera presentación de vinagre (Figura 18 C, G; 60.39 ± 18.50 %; n = 6; $p > 0.05$) y esencia de vainilla (Figura 18 C, G; 57.48 ± 22.30 %; n = 6; $p > 0.05$) a concentraciones bajas (Figura 18 C, G; 1% v/v en agua destilada). Adicionalmente, la cuantificación del

índice de habituación en animales enriquecidos olfatoriamente muestra un incremento significativo (Figura 18 I; 66.76 ± 7.68 ; $n=6$; $p<0.05$) con respecto a los animales control (Figura 18 I; 30.51 ± 18.25 ; $n=6$; $p<0.05$).

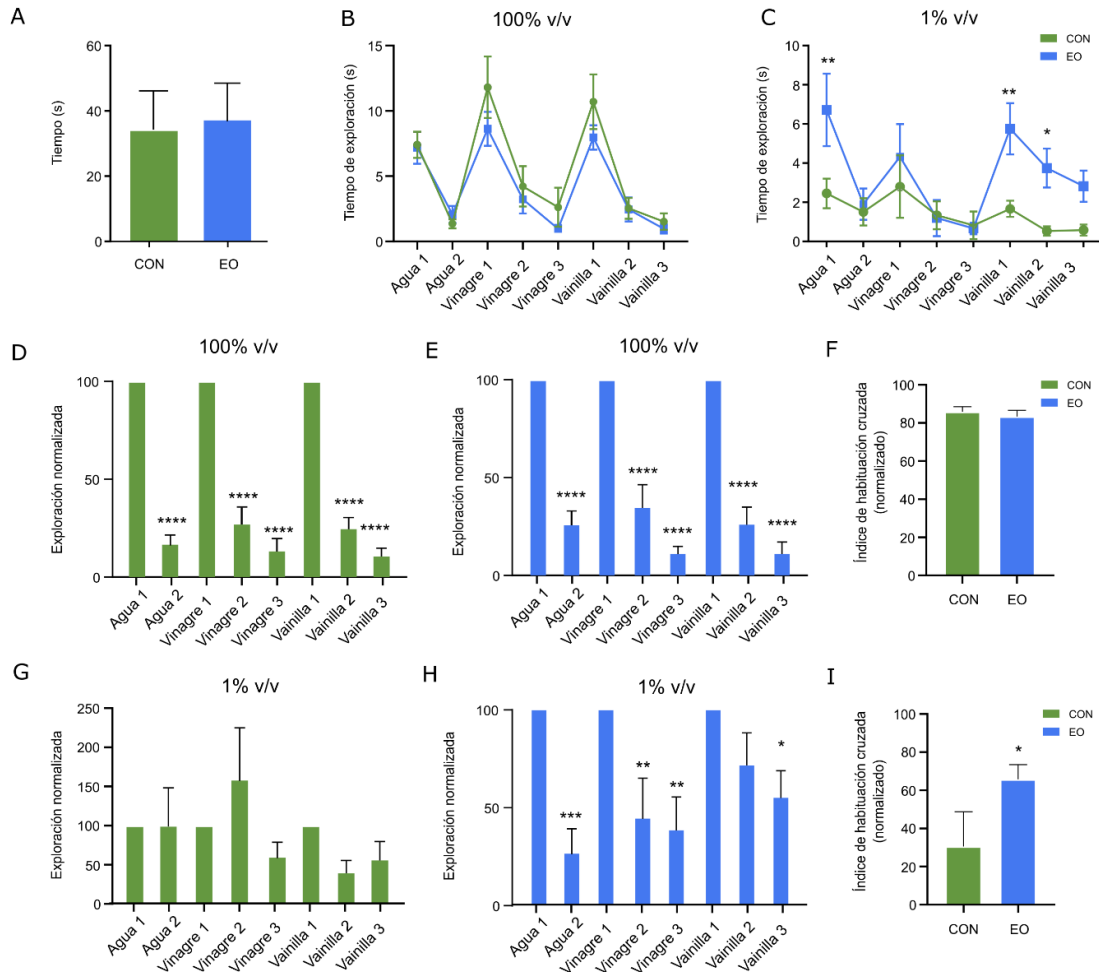


Figura 18. Prueba de alimento enterrado y habituación/deshabituación en animales control y enriquecidos olfatoriamente. A) cuantificación de la latencia para encontrar el alimento enterrado de los animales control (CON; verde) y enriquecidos olfatoriamente (EO; azul). (B, C) Tiempo de exploración promedio de la presentación repetida a agua destilada y a dos aromas (vinagre y vainilla) a un alta (100%; B) y baja (1% v/v, diluido en agua destilada; C) concentración en animales control y enriquecidos olfatoriamente. La reducción en el tiempo de exploración ante la presentación repetida de un mismo aroma refleja la habituación, mientras que un incremento en la exploración ante la presentación de un aroma nuevo refleja la deshabituación. La prueba de habituación/ deshabituación fue también cuantificada como el tiempo de exploración normalizado (considerando el primer ensayo de cada bloque como el 100% para el análisis) para los animales control (D, G) y enriquecidos olfatoriamente (E, H), a bajas y altas concentraciones. F, I) Índice de habituación cruzada para ambos grupos y concentraciones. * , ** , *** , **** Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. * $p<0.05$, ** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

Adicionalmente evaluamos la habilidad de los animales implantados con una placa de acero inoxidable en la cabeza, para habituarse a la presentación repetida de aromas y su discriminación, para ello realizamos la prueba de habituación/deshabituación empleando aromas a una concentración baja (Figura 19; 1% v/v). Los resultados indican que los animales enriquecidos con aromas incrementaron significativamente su tiempo de exploración cuando la esencia de vainilla fue presentada por primera vez (Figura 19 A; 7.88 ± 2.52 segundos; $n = 3$; $p < 0.05$) comparada con los animales control implantados (Figura 19 A; 0.19 ± 0.19 segundos; $n = 3$; $p < 0.05$). Tras realizar la cuantificación de la exploración normalizada se observó que los animales enriquecidos olfatoriamente reducen su tiempo de exploración a 29.01 ± 2.61 % cuando el vinagre a una concentración baja (Figura 19 A, C; 1 % v/v) fue presentado por tercera ocasión y a 16.09 ± 11.76 % cuando la esencia de vainilla a una concentración baja fue presentada por tercera vez (Figura 19 A, C). En contraste, los animales control implantados no mostraron una clara habituación ante la presentación repetida del vinagre a una concentración baja (Figura 19 A, B; 1103.00 ± 933.80 % en su tercera exposición; $n = 3$; $p < 0.05$) ni a la esencia de vainilla (Figura 19 A, B; 107.60 ± 7.60 % en su tercera exposición; $n = 3$; $p < 0.05$). Tras realizar el análisis del índice de habituación cruzada, observamos que los animales enriquecidos con aromas presentan un índice (Figura 19 D; 79.55 ± 5.07 ; $n = 3$; $p < 0.05$) que es significativamente mayor que el reportado en los animales control implantados (Figura 19 D; -315.80 ± 319.94 ; $n = 3$; $p < 0.05$).

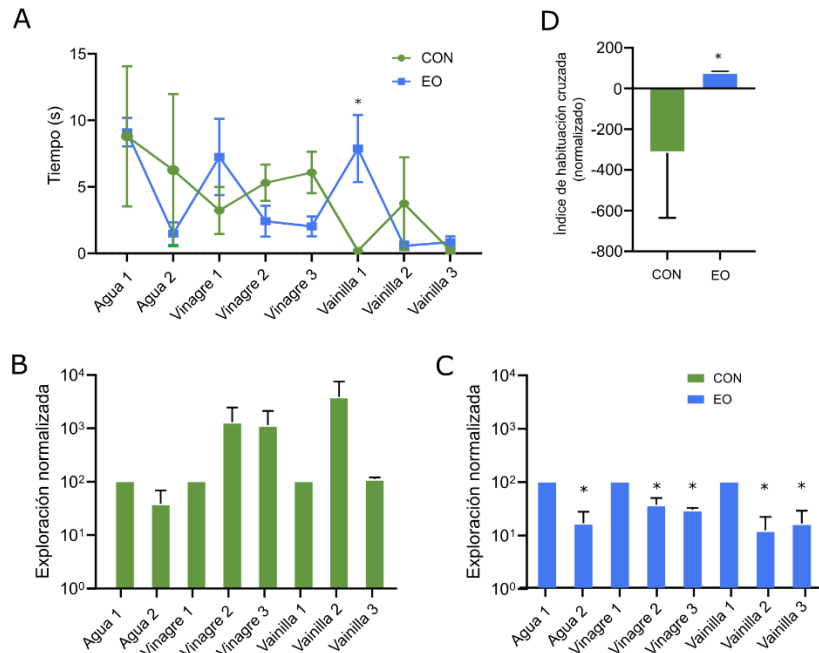


Figura 19. Prueba de habituación/deshabitación en animales control y enriquecidos olfatoriamente implantados.

A) Tiempo de exploración promedio de la presentación repetida a agua destilada y a dos aromas (vinagre y vainilla) a una concentración baja (1% v/v, diluido en agua destilada) en animales control (CON; verde) y enriquecidos olfatoriamente (EO; azul). La reducción en el tiempo de exploración ante la presentación repetida de un mismo aroma refleja la habituación, mientras que un incremento en la exploración ante la presentación de un aroma nuevo refleja la deshabitación. La prueba de habituación/ deshabitación fue también cuantificada como el tiempo de exploración normalizado (considerando el primer ensayo de cada bloque como el 100% para el análisis) para los animales control (B) y enriquecidos olfatoriamente (C). D) Índice de habituación cruzada para ambos grupos. *Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. * $p < 0.05$.

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la conducta olfatoria innata

El aceite de cacahuete y el TMT inducen una fuerte atracción o evitación olfatorias, respectivamente (Lin *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2017). Con la finalidad de evaluar si la reconfiguración producida por el enriquecimiento olfatorio influye sobre la conducta olfatoria innata, evaluamos la respuesta a ambos aromas. Durante la habituación a la caja de prueba, en ausencia de aromas, los animales de ambos grupos exhibieron una preferencia por los compartimentos laterales con respecto a la región central (Figura 19 A, D). Si embargo, no se observaron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los tres compartimentos en los cuales imaginariamente se dividió la caja de prueba (Figura 20 A-B; $p > 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos). Por el contrario, cuando el aceite de cacahuete (50% v/v)

fue situado en el compartimento lateral #3, observamos que los animales enriquecidos olfatoriamente se mantienen significativamente más tiempo en tal compartimento (Figura 20 A-B; 131.00 ± 6.74 segundos) en comparación con los animales control (Figura 20 A-B; 88.67 ± 18.35 segundos; $p < 0.05$; $n = 6$). Realizamos la cuantificación del índice de preferencia innata (ver material y métodos), que permite evaluar la respuesta innata a los aromas (Lazarini *et al.*, 2014). Un valor negativo indica una aversión a los aromas y un valor positivo indica preferencia (Lazarini *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican que los animales enriquecidos olfatoriamente muestran un índice positivo significativamente más alto (Figura 20 C; 57.40 ± 17.67 ; $n = 5$) en comparación con los animales control (Figura 20 C; 16.40 ± 16.86 ; $p < 0.05$; $n = 5$). Adicionalmente, evaluamos la aversión al TMT (10% v/v) y encontramos que los animales enriquecidos olfatoriamente significativamente se mantienen más tiempo en el compartimento opuesto (Figura 20 D-E; 125.33 ± 11.90 segundos, sección 1; $n = 12$) en comparación con los animales control (Figura 20 D-E; 85.67 ± 13.39 segundos; $p < 0.05$; $n = 12$). El análisis del índice de preferencia mostró valores negativos en ambos grupos experimentales; sin embargo, los animales enriquecidos olfatoriamente mostraron una aversión significativamente más alta (Figura 20 F; -56 ± 11.60 ; $n = 12$) que la de los animales control (Figura 20 F; -14.50 ± 21.73 segundos; $p < 0.05$; $n = 12$).

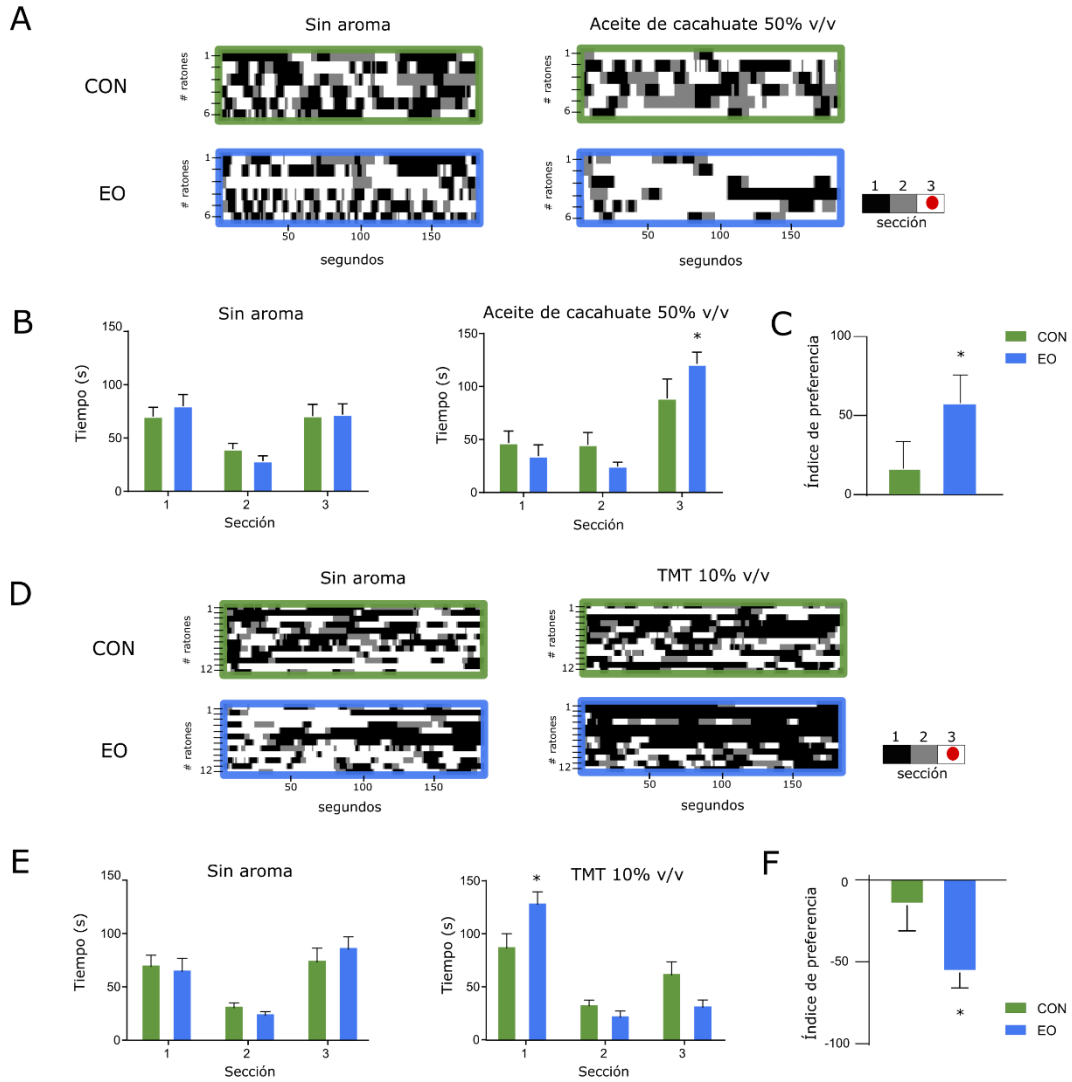


Figura 20. Prueba de preferencia y aversión olfatorias innatas en animales control y enriquecidos olfatoriamente. A, D) *Raster plots* de la ocupación temporal en cada uno de los tres sectores de la caja de prueba. El aroma (aceite de cacahuate 50 % v/v (A) o TMT 10 % v/v (D)) fue colocado en el sector #3 de la caja de prueba como lo indica el punto rojo en la caja de tres colores a la derecha. La exploración de cada sección lateral se grafica como sigue: izquierda: sección sin aroma; derecha: sección con el aroma atractivo o repulsivo (aceite de cacahuate 50% o TMT 10 % v/v, respectivamente) (B, E) El índice de preferencia a los aromas atractivo (C) y repulsivo (F) se grafica para los animales control (CON; verde) y enriquecidos olfatoriamente (EO; azul). *Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM. * $p < 0.05$.

Verificación histológica de la administración intracerebroventricular y el registro con electrodos múltiples

Con el propósito de evaluar el efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la actividad eléctrica del bulbo olfatorio en animales administrados con P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa, como control, se llevaron a cabo experimentos utilizando la preparación de animal anestesiado. En primer lugar, se llevó a cabo el análisis histológico de la administración intracerebroventricular en ratones CD-1 administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa, como control (Figura 21 A-B). Se observó que el P β A₁₋₄₂ irriga a todos los ventrículos cerebrales. Adicionalmente, se realizó la confirmación histológica de las posiciones del arreglo de electrodos múltiples al finalizar cada uno de los registros (Figura 21 C-D). Para ello, cada sonda fue teñida en su región más distal con el colorante de carbocianina lipofílica Dil (1% v/v; Sigma; Figura 21 C-D). Con ello se confirmó que cada uno de los 16 electrodos se encontraban distribuidos desde la capa más profunda (capa granular; GCL) a la capa más superficial del BOP (capa glomerular; GL). Con lo que se obtuvo el LFP de cada uno de los estratos celulares que componen al BOP.

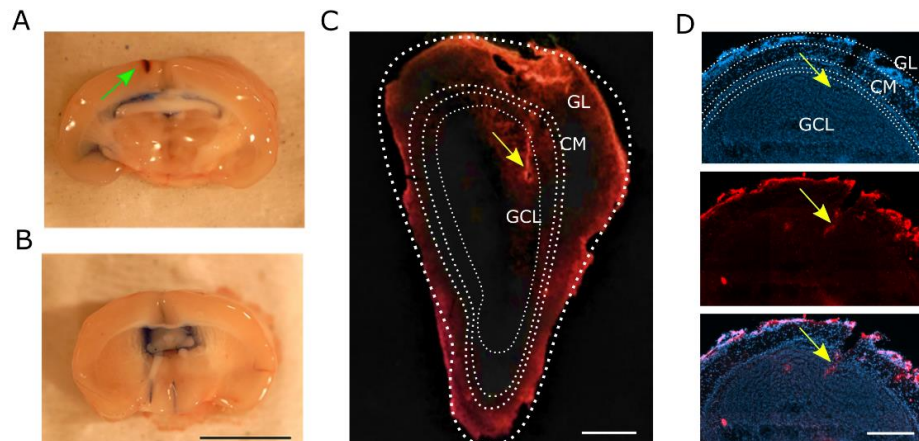


Figura 21. Verificación histológica de la administración intracerebroventricular del péptido beta amiloide y del registro con el sistema de electrodos múltiples. A) Corte coronal donde se observa el trayecto de la cánula de inyección (flecha verde) desde la corteza del hemisferio izquierdo, de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas establecidas para la administración en el ventrículo lateral (AP: -0.22 mm, ML: \pm 1.0 mm DV: -2.5 mm). Escala 5 mm. B) Fotografía donde se muestra la irrigación de tinta azul en la región anterior del cerebro. Note una irrigación completa en la totalidad de los ventrículos cerebrales y el tercer ventrículo. C) Corte coronal del bulbo olfatorio donde se muestra el trayecto del arreglo de electrodos múltiples (flecha amarilla) de acuerdo con las coordenadas establecidas (AP: +4.7 mm, ML: \pm 0.7 mm DV: -1.7 mm). Escala 250 μ m. D) Corte sagital del bulbo olfatorio donde se muestra el trayecto del arreglo de electrodos múltiples (flecha amarilla). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul; arriba) y el trayecto del arreglo de electrodos múltiples con el colorante de carbocianina lipofílica Dil (rojo; en medio). Escala 250 μ m.

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la actividad oscilatoria bulbar

La estimulación sensorial olfatoria modifica los patrones de actividad del bulbo olfatorio (Aylwin *et al.*, 2009; Kay, 2014). Con la finalidad de entender si el enriquecimiento olfatorio modifica la actividad eléctrica del bulbo olfatorio principal (BOP) tras la administración de la secuencia inversa del P β A, como control, se realizó un análisis del LFP durante la estimulación con acetato de amilo a una concentración baja (1% v/v; Figura 22). Lo anterior, dado que esto supone un reto olfatorio para los animales control, en comparación con los animales enriquecidos olfatoriamente (Hernández-Soto, 2018)

La cuantificación de la proporción de cambio durante la estimulación con el aroma, con respecto de la actividad espontánea (considerada como el 100% para el análisis) indica que, en ratones enriquecidos olfatoriamente administrados con la secuencia inversa, la estimulación olfatoria produjo un incremento significativo de la potencia promedio de la totalidad de las capas del bulbo olfatorio con respecto de la actividad espontánea ($EO_{inverso}$: $399.15 \pm 74.24\%$ del control; Figura 22 B-C; $n = 6$; $p < 0.05$). Sin embargo, este efecto no se observó en los animales control administrados con la secuencia inversa del péptido, quienes no incrementaron su respuesta tras la estimulación con acetato de amilo al 1% v/v, con respecto a la actividad espontánea ($CON_{inverso}$: $111.90 \pm 1.26\%$ del control; Figura 22 A, C; $n = 6$; $p > 0.05$). Al realizar una comparación entre ambos grupos experimentales se encontraron diferencias significativas en la totalidad de las capas del bulbo olfatorio (Figura 22; $n = 6$; $p < 0.05$).

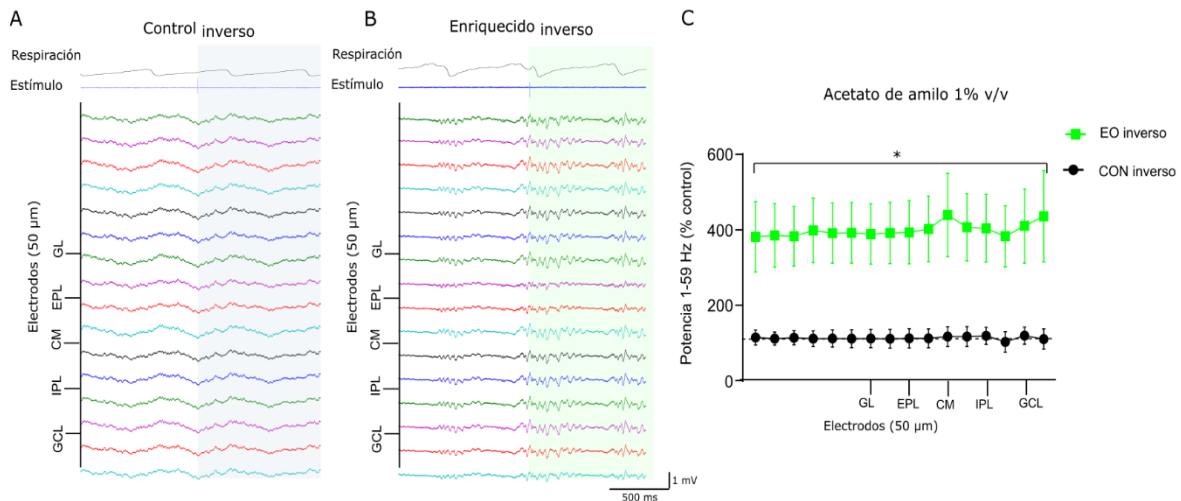


Figura 22. Cambio en la actividad de campo del BOP inducido por la presentación de acetato de amilo a una concentración baja (1% v/v) en animales control (A) y enriquecidos con aromas (B), administrados con la secuencia inversa del péptido beta amiloide. A-B) Trazos representativos del registro electrofisiológico *in vivo* de las distintas capas del bulbo olfatorio en un animal control (A) y uno enriquecido con aromas (B). El área sombreada muestra el periodo de estimulación con acetato de amilo 1% v/v. C) Cuantificación del cambio en la potencia (normalizada como % de la actividad espontánea) de la actividad del BOP tras la estimulación con acetato de amilo en un rango de frecuencia de 1-59 Hz. La línea punteada representa la actividad espontánea para todos los grupos. Note un incremento significativo de la potencia en la totalidad de los electrodos situados en el BOP en los animales enriquecidos, en comparación con el grupo control. * Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos comparada con los animales control. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre las alteraciones producidas por el P β A₁₋₄₂ en la actividad oscilatoria bulbar

Adicionalmente, con el propósito de evaluar el efecto del enriquecimiento olfatorio sobre las alteraciones producidas por el P β A₁₋₄₂, se realizó un análisis del LFP durante la estimulación con acetato de amilo al 100% v/v (Figura 23 A-E). La cuantificación de la proporción de cambio durante la estimulación con el aroma, con respecto de la actividad espontánea (considerada como el 100%) indica que, en ratones enriquecidos y controles inyectados con la secuencia inversa del péptido, la estimulación olfatoria produjo un incremento significativo de la potencia promedio de la totalidad de las capas del bulbo olfatorio con respecto de la actividad espontánea (CON_{inverso}: 1405.86 \pm 328.04% del control; n = 4; EO_{inverso}: 2521.19 \pm 400.02% del control; Figura 23 A-B, E; n = 5; p<0.05). Al realizar una comparación entre los grupos inyectados con la secuencia inversa (enriquecidos y control) no se

encontraron diferencias significativas (Figura 23 A-B, E; $p > 0.05$). Por el contrario, los animales control administrados con el $P\beta A_{1-42}$ no mostraron un incremento significativo de la potencia promedio ni en ninguna región del bulbo olfatorio, durante la estimulación olfatoria (CON $P\beta A_{1-42}$: $224.78 \pm 18.89\%$ del control; Figura 23 C, E; $n = 7$; $p > 0.05$). Sin embargo, en ratones enriquecidos con aromas e inyectados con el $P\beta A_{1-42}$, la estimulación olfatoria produjo un incremento significativo de la potencia promedio de la totalidad de las capas del bulbo olfatorio (EO $P\beta A_{1-42}$: $1925.27 \pm 595.408\%$ del control; Figura 23 D, E; $n = 7$; $p < 0.05$). Al realizar una comparación entre los grupos administrados con el $P\beta A_{1-42}$ (enriquecidos y control) se encontraron diferencias significativas en los animales enriquecidos olfatoriamente en los electrodos ubicados en la capa glomerular (GL; $673.41 \pm 191.94\%$ del control), en la capa mitral (CM (electrodo 5); $1813.47 \pm 1096.77\%$ del control) y en la capa plexiforme interna (EPL; $1633.48 \pm 759.04\%$ del control; Figura 23 E; $n = 7$; $p > 0.05$).

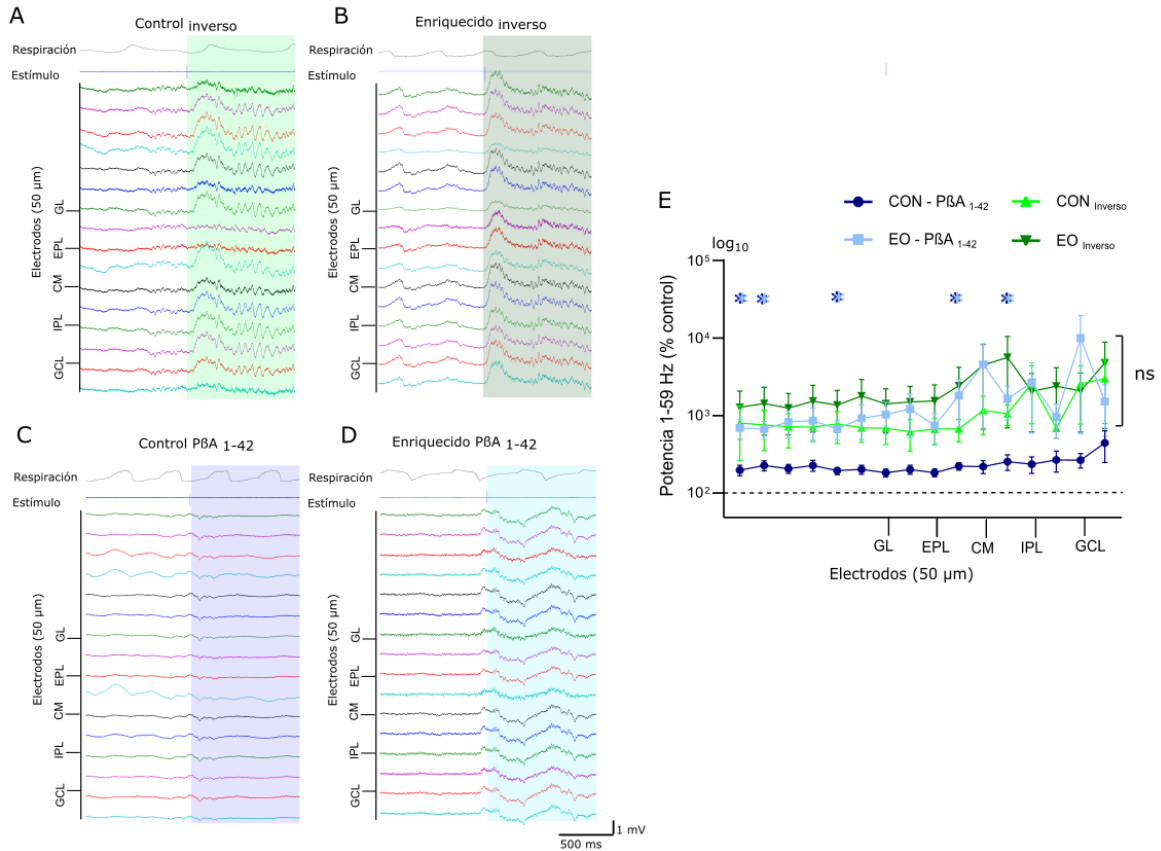


Figura 23. Cambio en la actividad de campo del BOP inducido por la presentación de acetato de amilo a una concentración alta (100 %) en animales control (A) y enriquecidos con aromas (B), administrados con el péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa. A-D) Trazos representativos del registro electrofisiológico *in vivo* de las distintas capas del bulbo en un animal control y uno enriquecido con aromas administrados con la secuencia inversa del péptido beta amiloide (A-B) y con el P β A₁₋₄₂ (C-D). El área sombreada muestra el periodo de estimulación con acetato de amilo 100% v/v. E) Cuantificación del cambio en la potencia (normalizada como % de la actividad espontánea) de la actividad del BOP tras la estimulación con acetato de amilo en un rango de frecuencia de 1-59 Hz. La línea punteada representa la actividad espontánea para todos los grupos. Note un incremento significativo de la potencia en algunos electrodos situados en la capa glomerular (GL), la capa mitral (CM) y la capa plexiforme interna (IPL) en los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el P β A₁₋₄₂ en comparación con el grupo control administrado con el P β A₁₋₄₂. * Denota una diferencia significativa en los animales enriquecidos olfatoriamente y controles administrados con el P β A₁₋₄₂. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la disminución en la capacidad para discriminar aromas inducida por el P β A₁₋₄₂

Para investigar los efectos protectores del enriquecimiento olfatorio contra las alteraciones que produce el P β A₁₋₄₂ sobre la discriminación olfatoria, se realizó una prueba conductual conocida como habituación/deshabitación (ver material y métodos), con dos aromas a una concentración del 100% (Figura 24). Nuestros datos muestran que los animales control y los enriquecidos olfatoriamente, administrados con la secuencia inversa del P β A₁₋₄₂ exhiben la conducta típica de habituación/deshabitación, que se refleja como una disminución significativa en el tiempo de exploración entre el primer y el último ensayo para cada aroma (habituación; Figura 24 A; $p < 0.05$; $n = 5$ en ambos grupos). Cuando los animales son habituados al primer aroma, la presentación de un nuevo aroma aumenta el tiempo de exploración (deshabitación; Figura 24 A; $p < 0.05$; $n = 5$ en ambos grupos). No se muestran diferencias significativas entre ambos grupos en los diferentes ensayos (Figura 24 A; $p > 0.05$; $n = 5$ en ambos grupos). En contraste, los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂, no son capaces de habituarse ante la presentación repetida de los diferentes estímulos olfatorios a una concentración del 100%, puesto que no se reportan diferencias significativas entre el primero y el último estímulo con vinagre y vainilla (Figura 24 A; $p > 0.05$; $n = 6$). Debido a la ausencia del fenómeno de habituación, los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂, no son capaces de mostrar deshabitación (Figura 24 A; $p > 0.05$; $n = 6$). En cambio, los animales enriquecidos olfatoriamente y administrados con el P β A₁₋₄₂ si presentan el fenómeno de habituación, disminuyendo de forma significativa el tiempo de exploración en los ensayos repetidos con los diferentes estímulos olfatorios (Figura 24 A; $p < 0.05$; $n = 6$). En estos animales, la presentación de un nuevo aroma aumenta el tiempo de exploración lo que se interpreta como una capacidad de deshabitación intacta (Figura 24 A; $p < 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos). Tras realizar una comparación entre ambos grupos administrados con el P β A₁₋₄₂, se observa que los animales control muestran un incremento significativo en la exploración para el segundo y tercer estímulo con vinagre (Figura 24 A; $p < 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos). Así mismo, se muestra un incremento significativo en el tiempo

de exploración en el último ensayo con vainilla (Figura 24 A; $p < 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos). Para todos los animales, se calculó el índice de habituación cruzada reportado por Wesson *et al.*, 2010, que permite evaluar la habilidad general para discriminar aromas en los roedores en la prueba de habituación/deshabituación. Para ello, se calculó la diferencia entre el tiempo de exploración normalizado del primer estímulo con respecto del tercero para cada grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas entre los animales control y enriquecidos olfatoriamente administrados con la secuencia inversa del péptido que muestran un índice positivo de habituación cruzada (Figura 24 B; $p > 0.05$; $n = 5$ en ambos grupos). Sin embargo, encontramos que los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ muestran un índice negativo de habituación cruzada del $-164.90\% \pm -169.20\%$ que es significativamente menor en comparación con los animales control y enriquecidos administrados con la secuencia inversa del péptido y con los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el P β A₁₋₄₂, quienes presentaron un índice de habituación del $90.60\% \pm 1.75\%$, $81.39\% \pm 5.59\%$ y $87.52\% \pm 3.40\%$ respectivamente (Figura 24 B; $p < 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos).

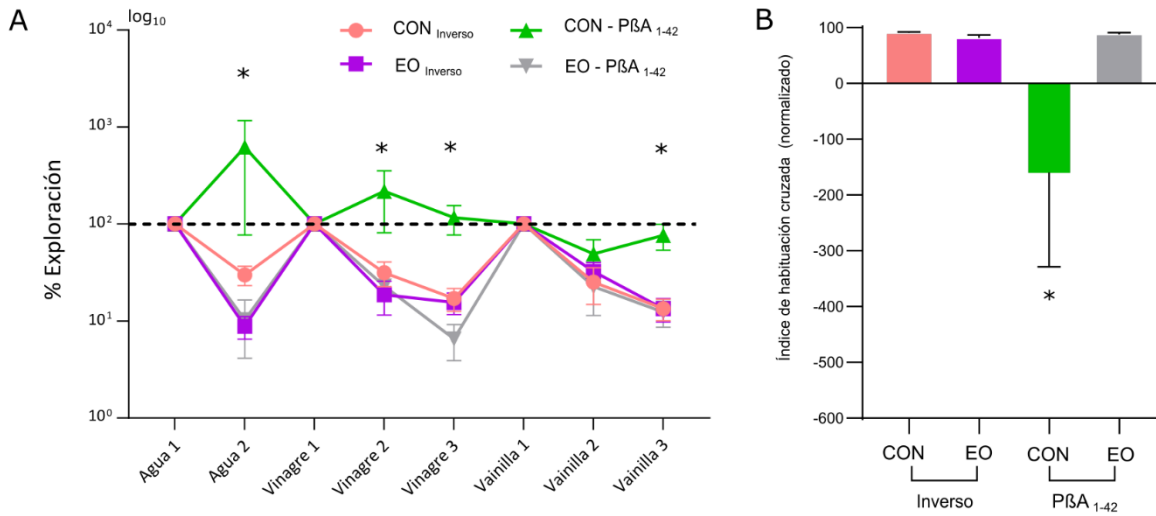


Figura 24. Prueba de habituación/deshabitación con aromas a una concentración alta en animales control y enriquecidos olfatoriamente administrados con el péptido beta amiloide (PβA₁₋₄₂) o su secuencia inversa. A) Cuantificación del tiempo de exploración (normalizado como % de la exploración del primer ensayo) durante la exposición repetida de los diferentes aromas, así como de agua, en animales control (rosa) y enriquecidos con aromas (morado), administrados con la secuencia inversa del PβA, así como de animales control (verde) y enriquecidos con aromas (gris) administrados con el PβA₁₋₄₂. Se observa un incremento significativo en el tiempo de exploración en los animales control administrados con el PβA₁₋₄₂, para las últimas exposiciones con vinagre y en el último ensayo con vainilla, en comparación con los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el PβA₁₋₄₂. B) Índice de habituación cruzada normalizado que permite calcular la discriminación olfatoria a los diferentes aromas (Wesson *et al.*, 2010). Note una disminución significativa de la discriminación olfatoria en los animales control administrados con el PβA₁₋₄₂. *p<0.05, denota una diferencia significativa comparada con los animales control administrados con PβA₁₋₄₂. Los datos se reportan como la media ± el EEM.

Así mismo, con la finalidad de evidenciar el efecto del EO sobre la discriminación de estímulos a una concentración baja, se realizó la prueba de habituación/deshabituación empleando aromas a una concentración del 1%. En estos experimentos se observó que los animales control administrados con la secuencia inversa del PβA no muestran la conducta típica de habituación/deshabituación en los ensayos repetidos con los diferentes estímulos olfatorios a concentración baja (Figura 25 A; $p > 0.05$; $n = 11$). Sin embargo, los animales administrados con la secuencia inversa PβA₄₂₋₁ y sometidos al EO mostraron el fenómeno de habituación que se refleja en una disminución significativa en el tiempo de exploración ante la presentación repetida tanto de vinagre como de vainilla (Figura 25 A; $p < 0.05$; $n = 11$). Además, estos animales fueron capaces de discriminar entre aromas a bajas concentraciones pues mostraron un incremento significativo en el tiempo de exploración para los estímulos olfatorios cuando se presentaron por primera vez (Figura 25 A; $p < 0.05$; $n = 11$). De manera similar, se observa que los animales control administrados con el PβA₁₋₄₂ no presentan una habituación a los diferentes estímulos olfatorios, lo que se refleja en valores de exploración que no muestran diferencias significativas entre los ensayos repetitivos (Figura 25 A; $p > 0.05$; $n = 11$). En contraste, los animales administrados con el PβA₁₋₄₂ y sometidos a EO muestran habituación olfatoria pues presentan una reducción significativa en el tiempo de exploración ante los estímulos olfatorios (Figura 25 A; $p < 0.05$; $n = 11$). Una comparación entre ambos grupos administrados con PβA₁₋₄₂ reveló un incremento significativo en la exploración de los animales control con respecto de los EO en la totalidad de los ensayos (Figura 25 A; $p < 0.05$; $n = 11$).

Tras realizar el análisis del índice de habituación cruzada de la prueba de habituación/ deshabituación empleando aromas a una concentración baja (1 % v/v), observamos que los animales control administrados con el PβA₄₂₋₁ muestran un índice negativo de habituación cruzada del $-337\% \pm 165.60\%$ que es significativamente menor en comparación con los animales enriquecidos olfatoriamente y administrados con el PβA₄₂₋₁ quienes presentaron un índice del $89.23\% \pm 3.30\%$ (Figura 25 B; $p < 0.05$; $n = 11$). Así mismo, los animales control

administrados con el P β A₄₂₋₁ muestran una reducción significativa del índice de habituación en comparación con los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el P β A₁₋₄₂, estos últimos mostraron un índice de habituación del 81.44 % \pm 7.60 % (Figura 25 B; p <0.05; n = 11). Adicionalmente, los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ mostraron una reducción significativa del índice de habituación cruzada del -269.60 % \pm 184.3 % en comparación con los animales enriquecidos con aromas que fueron administrados con el P β A₁₋₄₂ y con su secuencia inversa (Figura 25 B; p <0.05; n = 11). No se reportan diferencias significativas entre los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ y con la secuencia inversa (Figura 25 B; p>0.05; n = 11).

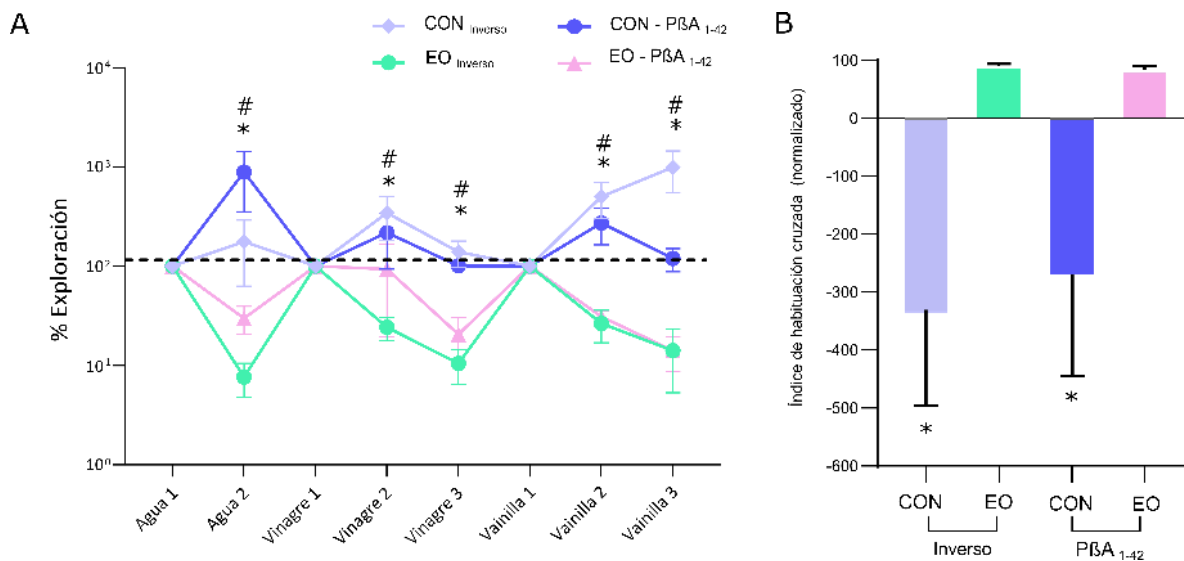


Figura 25. Prueba de habituación/deshabitación con aromas a una concentración baja en animales control y enriquecidos olfatoriamente administrados con el péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa. A) Cuantificación del tiempo de exploración (normalizado como % de la exploración del primer ensayo) durante la exposición repetida de los diferentes aromas, así como de agua, en animales control (morado claro) y enriquecidos con aromas (verde), administrados con la secuencia inversa del P β A, así como de animales control (morado intenso) y enriquecidos con aromas (rosa) administrados con el P β A₁₋₄₂. **B)** Índice de habituación cruzada normalizado que permite calcular la discriminación olfatoria a los diferentes aromas (Wesson *et al.*, 2010). Note una disminución significativa de la discriminación olfatoria en los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa que desaparece en los animales enriquecidos. * y # (p<0.05) denotan una diferencia significativa comparada con los animales control administrados con P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa, respectivamente. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Evaluación de la locomoción tras la administración del P β A₁₋₄₂ en un campo abierto

Para examinar si la administración del P β A₁₋₄₂ altera la actividad locomotora, lo que pudiera influir en las pruebas de discriminación olfatoria antes reportadas, se realizó una prueba de campo abierto. No se identificaron diferencias significativas entre los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ (Figura 26 A-D; $p > 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos) o su secuencia inversa (Figura 26 A-D; $p > 0.05$; $n = 5$ en ambos grupos), en el tiempo en que los animales permanecieron en movimiento, ni en la distancia total recorrida, ni en el tiempo de permanencia en los bordes y el centro de la arena (Figura 26 A-D; $p > 0.05$).

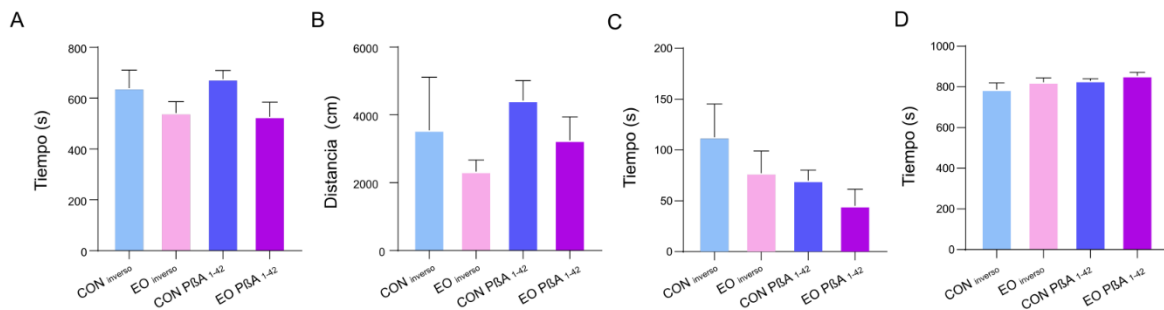


Figura 26. Evaluación de la locomoción en animales control y enriquecidos con aromas, tras la administración del péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa (P β A₄₂₋₁). Se grafica la cuantificación, para los cuatro grupos experimentales, de los siguientes parámetros: A) Tiempo que los animales permanecieron en movimiento durante los 10 minutos de la prueba de campo abierto. B) Distancia total recorrida. C) Tiempo de permanencia en el borde de la caja de prueba. D) Tiempo de permanencia en el centro de la caja de prueba. No se muestran diferencias significativas entre los grupos para cada uno de los valores cuantificados. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la disminución de la discriminación fina de aromas inducida por la administración del P β A₁₋₄₂

Con la finalidad de evaluar los cambios en la discriminación fina de aromas, tras la administración del P β A₁₋₄₂ durante el periodo de enriquecimiento olfatorio, realizamos una prueba de condicionamiento operante olfatorio (tipo *Go/No-Go*; Figura 11; ver material y métodos). Durante el transcurso de la prueba se evaluó el peso de los animales control y los enriquecidos olfatoriamente, antes y después de

la administración del P β A₁₋₄₂ (CON P β A₁₋₄₂; EO P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa (CON inverso; EO inverso). El peso de todos los animales se redujo, pero se mantuvo por arriba del 80% de su peso inicial, como consecuencia de la restricción de agua previa a la prueba conductual, para mantener la motivación de los animales durante la prueba (Guo *et al.*, 2014). No se encontraron diferencias significativas en la disminución y el mantenimiento del peso de los animales entre los grupos experimentales (Figura 27; $p > 0.05$; $n = 6$ en todos los grupos).

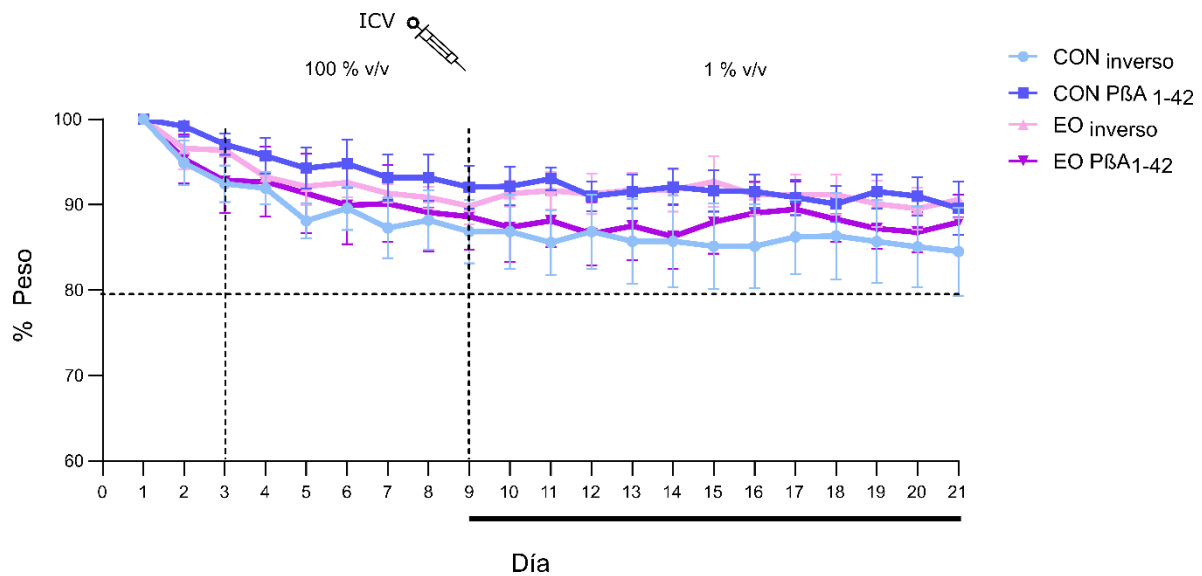


Figura 27. Peso de los animales control y enriquecidos olfatoriamente durante la prueba de condicionamiento operante, antes y después de la administración del péptido β amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa. Se muestran los 21 días del periodo de restricción de agua durante la prueba conductual. La primera línea punteada vertical indica el inicio de la prueba de condicionamiento operante empleando aromas a una concentración del 100%. Dicho procedimiento se efectuó posterior a la fase de habituación al entorno experimental por 3 días (ver materiales y métodos). La línea punteada horizontal indica el 80% del peso inicial de los animales control y enriquecidos olfatoriamente, administrados en el día 9 con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa (segunda línea vertical punteada). La línea horizontal inferior indica el periodo de enriquecimiento olfatorio para todos los grupos experimentales que inicia después de la inyección intracerebroventricular de los péptidos (indicada por la segunda línea punteada vertical). No se reportan diferencias significativas entre los grupos. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Durante el periodo de entrenamiento en la prueba Go/No-Go, previo a la administración del P β A₁₋₄₂ o de su secuencia inversa, se observa que los animales inician con un desempeño del $59.88 \pm 1.66\%$ de respuestas correctas en el día 1, alcanzando más del 80% de aciertos en el día 6. Como era de esperarse, debido a

que hasta ese día todos los animales se encontraban en condiciones idénticas, no se reportan diferencias significativas entre los grupos para este último parámetro (Figura 28 B; $p > 0.05$; CON _{inverso}: $89.60 \pm 3.53\%$ de aciertos; CON P β A₁₋₄₂: $81.83 \pm 2.60\%$ de aciertos; EO _{inverso}: $90 \pm 2.67\%$ de aciertos; EO P β A₁₋₄₂: $91 \pm 2.26\%$ de aciertos; $n = 6$ en todos los grupos). Como se menciona en los métodos, 80% o más de aciertos en la prueba fue el criterio para considerar que los animales aprendieron la regla de la prueba (Abraham *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2017). Con base a lo anterior, la administración del P β A₁₋₄₂, o su secuencia inversa, se realizó en el día 6 de entrenamiento, justo al término de la prueba conductual. Después de la inyección, se observa que la administración del P β A₁₋₄₂, en animales control, induce una disminución en el porcentaje de aciertos que, en el día 18, disminuye significativamente al $63.00 \pm 4.74\%$ (Figura 28 B; $p < 0.05$; $n = 6$). Lo cual es significativamente menor en comparación con los grupos EO P β A₁₋₄₂ (Figura 28 B; $p < 0.05$, $n = 6$; EO P β A₁₋₄₂: $83.17 \pm 4.26\%$ de aciertos), CON _{inverso} (Figura 28 B; $p < 0.05$, $n = 6$; $93.20 \pm 2.35\%$ de aciertos) y EO _{inverso} (Figura 28 B; $p < 0.05$, $n = 6$; $86.67 \pm 3.84\%$ de aciertos). Con la finalidad de evaluar el efecto del enriquecimiento olfatorio y/o la administración del P β A₁₋₄₂ sobre la sensibilidad de la discriminación de aromas (Berditchevskaia *et al.*, 2016), las respuestas fueron divididas en cuatro categorías distintas, con base en los siguientes criterios: a) Se consideró un **acierto** cuando durante la presentación del aroma recompensante (limoneno (+)) el animal lamió (Figura 28 A, C-D; Rosa); por el contrario b) se consideró un **error** si el animal no lamió durante la presentación del aroma recompensante (Figura 28 A, C-D; Gris). Adicionalmente, c) se consideró como una **respuesta correcta** (CR) si el animal no lamió al término de la presentación del aroma no recompensante (limoneno (-); Figura 28 A, C-D; Verde) y d) se consideró una **falsa alarma** (FA) si el animal lamió en respuesta a la presentación de este aroma no recompensante (Figura 28 A, C-D; Amarillo). Encontramos que los animales administrados con P β A₁₋₄₂ muestran una disminución de la proporción de aciertos y, correspondientemente, un incremento en la proporción de errores, en comparación con los demás grupos (EO P β A₁₋₄₂, CON _{inverso} y EO _{inverso}; Figura 28 C-D; $n = 6$ en todos los grupos). Por el contrario, los animales administrados con el P β A₁₋₄₂ y que fueron enriquecidos

olfatoriamente muestran una proporción de aciertos y errores comparable a la de los animales CON_{inverso} y EO_{inverso} (Figura 28 C-D).

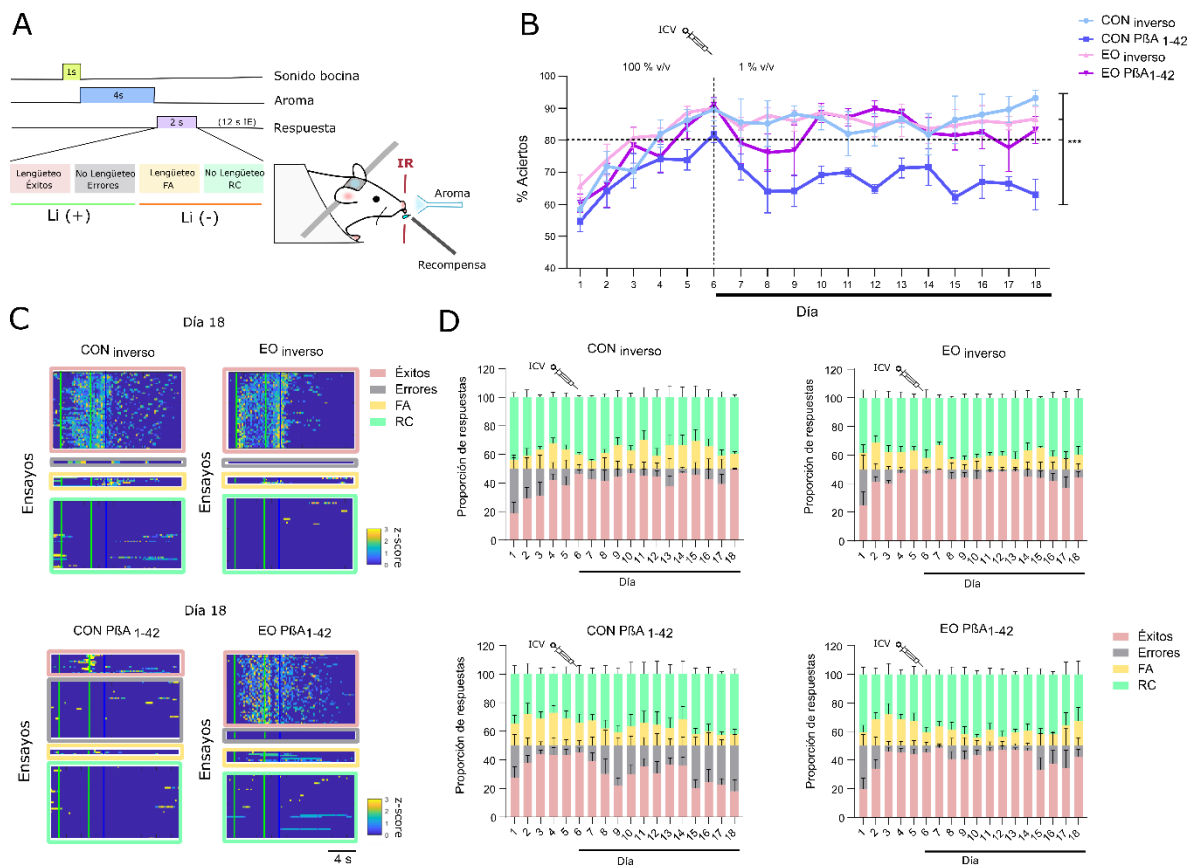


Figura 28. Prueba de condicionamiento operante en animales control y enriquecidos olfactoriamente tras la administración del péptido beta amiloide (PβA₁₋₄₂) o su secuencia inversa. A) Diagrama de la secuencia de eventos en un ensayo y del sistema de restricción de movimiento con la cabeza fija para ratones empleado durante la prueba de condicionamiento operante *Go/No-Go*. B) Porcentaje de aciertos obtenidos durante la prueba de todos los grupos experimentales. Note una disminución significativa del porcentaje de aciertos de los animales control tras la administración, al día 6, del PβA₁₋₄₂. La línea punteada horizontal representa el criterio de aprendizaje en la prueba. La línea punteada vertical indica el momento de la administración del PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa. La línea negra inferior representa el periodo de enriquecimiento olfatorio. C) *Raster plots* representativos del cambio en los lengüeteos (z-score) de animales en el último día de la prueba conductual (día 18) de los grupos administrados con el PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales control (izquierda-abajo: CON PβA₁₋₄₂; izquierda-arriba: CON_{inverso}) y animales con las mismas inyecciones, pero enriquecidos olfactoriamente (derecha-abajo: EO PβA₁₋₄₂; izquierda-arriba: EO_{inverso}). Se enmarcan en color la proporción de aciertos (rosa), errores (gris), falsas alarmas (FA; amarillo) y respuestas correctas (CR; verde). Note una disminución en la proporción de aciertos en los animales CON PβA₁₋₄₂ que no se observa en los animales EO PβA₁₋₄₂. D) Proporción de aciertos, errores, FA y CR en todos los grupos experimentales. *** p < 0.05. Los datos se reportan como la media ± el EEM.

El análisis estadístico de la proporción de aciertos a lo largo de la prueba de condicionamiento operante olfatorio no muestra diferencias significativas entre los animales EO P β A₁₋₄₂, CON_{inverso} y EO_{inverso}. Por otra parte, se observó una disminución significativa en los animales control tras la administración del P β A₁₋₄₂ con respecto al resto de los grupos experimentales (Figura 29 A; $p < 0.05$; $n = 6$ en todos los grupos). Con respecto a la proporción de errores, no se encontraron diferencias significativas en los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el P β A₁₋₄₂, en comparación con los animales control y enriquecidos olfatoriamente administrados con la secuencia inversa del péptido. En contraste, se observó un incremento significativo de los errores en los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ en comparación con los animales EO P β A₁₋₄₂, CON_{inverso} y EO_{inverso} (Figura 29 B; $p < 0.05$; $n = 6$ en todos los grupos). No se reportaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la proporción de falsas alarmas o en las respuestas correctas tras la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa (Figura 29 C-D; $p > 0.05$; $n = 6$ en todos los grupos).

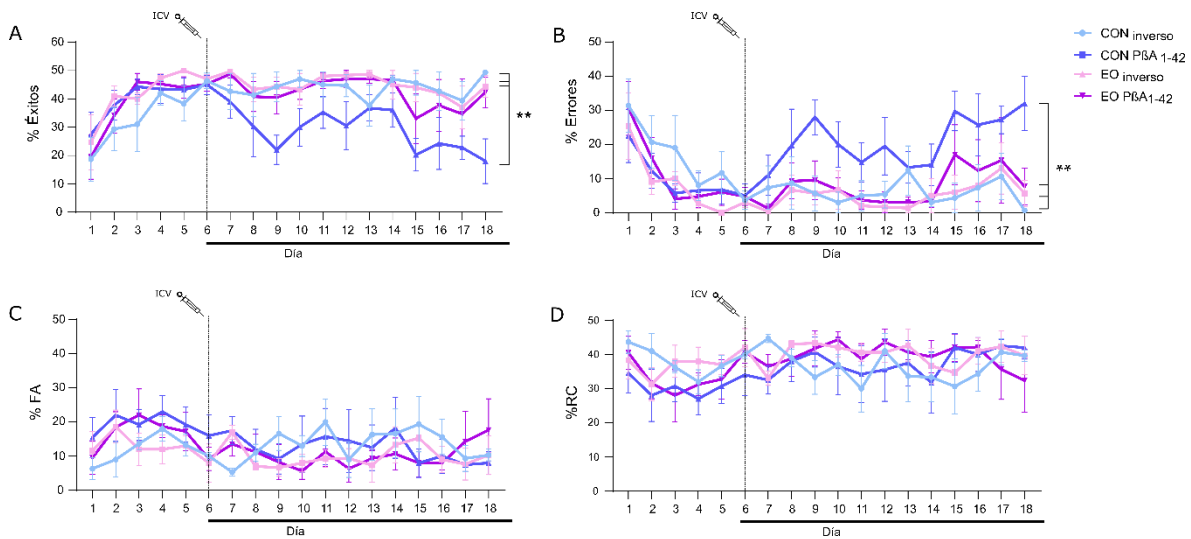


Figura 29. Categorías de respuesta en la prueba de condicionamiento operante en animales control y enriquecidos olfatoriamente antes y después a la administración del péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa. Aciertos (A), errores (B), falsas alarmas (FA; C) y respuestas correctas (CR; D) durante la prueba de condicionamiento operante Go/No-Go de todos los grupos experimentales. La línea negra inferior representa el periodo de enriquecimiento olfatorio. Note una disminución del porcentaje de aciertos (A) y un incremento del porcentaje de errores (B) significativos, en los animales control tras la administración del P β A₁₋₄₂ (día 6; línea punteada vertical). ** $p < 0.05$. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Con la finalidad de examinar si el enriquecimiento olfatorio modifica la estrategia de lengüeteo tras la administración del P β A₁₋₄₂ y su posible influencia en la respuesta descrita en el párrafo anterior, se realizó un análisis del coeficiente de variación (CV = desviación estándar/ media) de los lengüeteos. Para lo cual se consideró la frecuencia del lengüeteo durante el periodo de respuesta de 2 segundos de todos los aciertos y falsas alarmas obtenidos por día. Los resultados no muestran diferencias significativas en el CV de los lengüeteos durante los aciertos en los animales control y enriquecidos olfatoriamente antes y después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa (Figura 30 A-B; $p > 0.05$; $n = 6$ en todos los grupos). Por otro lado, observamos que el CV de los lengüeteos durante las falsas alarmas presenta fluctuaciones considerables, a través de los días, en todos los grupos experimentales (Figura 30 B; $n = 6$ en todos los grupos). Sin embargo, el análisis estadístico no reporta diferencias significativas entre los grupos (Figura 30 B; $p > 0.05$; $n = 6$ en todos los grupos).

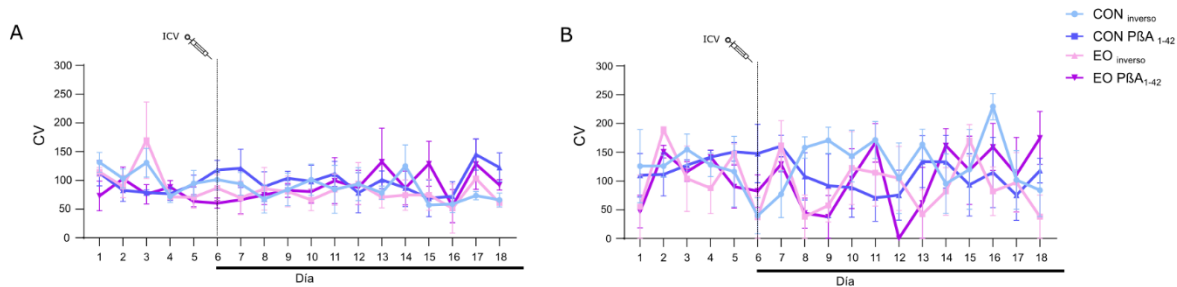


Figura 30. Variabilidad de los lengüeteos durante el periodo de respuesta en la prueba de condicionamiento operante en animales control y enriquecidos olfatoriamente antes y después de la administración del péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa. Coeficiente de variación de los lengüeteos durante los aciertos (A) y las falsas alarmas (B), en la prueba de condicionamiento operante *Go/No-Go* de todos los grupos experimentales. La línea punteada vertical indica el momento de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa. La línea negra inferior representa el periodo de enriquecimiento olfatorio. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la expresión de P β A₁₋₄₂ en el bulbo olfatorio principal

Con la finalidad de determinar si el enriquecimiento olfatorio modifica la acumulación del P β A₁₋₄₂ en animales administrados con este mismo péptido o con su secuencia inversa, se empleó la técnica de inmunofluorescencia en muestras obtenidas del

bulbo olfatorio principal de todos los grupos experimentales (Figura 31 A-E; ver material y métodos). La cuantificación relativa de la intensidad de fluorescencia del P β A₁₋₄₂ en la totalidad del bulbo olfatorio no reporta diferencias significativas entre los grupos control y enriquecidos olfatoriamente administrados con la secuencia inversa del péptido (Figura 31 A-B, E; $p > 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos; CON inverso: 409.01 ± 18.50 u.a.; EO inverso: 448.20 ± 20.17 u.a.). Adicionalmente, se muestra que los animales CON P β A₁₋₄₂ presentan un incremento significativo en la intensidad relativa de fluorescencia (618.70 ± 41.51 u.a.) en comparación con los animales EO P β A₁₋₄₂ (430.90 ± 22.49 u.a.; Figura 31 C-E, $p < 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos).

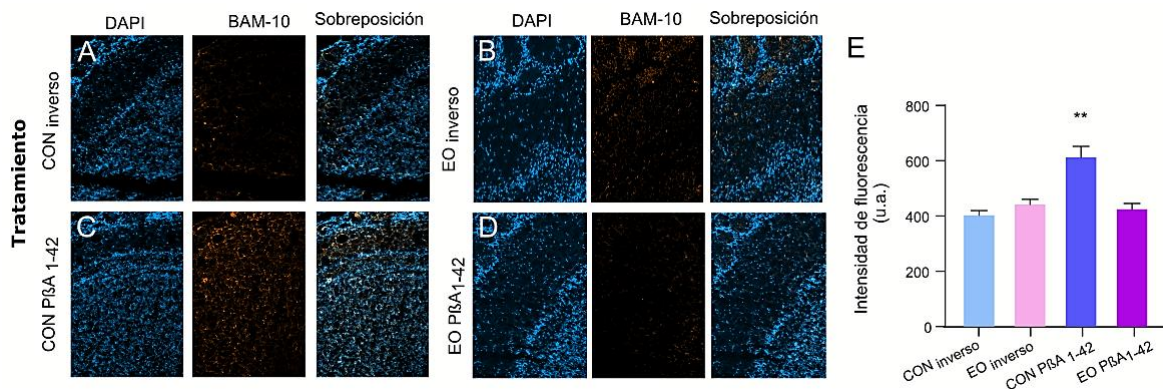


Figura 31. Acumulación del péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) en animales control y enriquecidos olfatoriamente posterior a la administración del péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y el P β A₁₋₄₂ inmunohistoquímicamente con el anticuerpo BAM10 (rojo). Se muestra una microfotografía representativa del bulbo olfatorio principal para los siguientes grupos: A) CON_{inverso} B), EO_{inverso}, C) CON P β A₁₋₄₂ y D) EO P β A₁₋₄₂. E) Cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia relativa de P β A₁₋₄₂. Note un incremento significativo de la fluorescencia acoplada al anticuerpo BAM10 en los animales CON P β A₁₋₄₂ en comparación con los animales EO P β A₁₋₄₂. ** $p < 0.05$. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Efecto del enriquecimiento olfatorio y del P β A₁₋₄₂ sobre la expresión de BDNF en el bulbo olfatorio principal

Para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la disminución de los niveles del P β A₁₋₄₂ en animales enriquecidos olfatoriamente evaluamos, mediante inmunofluorescencia, los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; por sus siglas en inglés) en el bulbo olfatorio principal. La cuantificación de la fluorescencia relativa asociada al BDNF en el bulbo olfatorio indica que los animales EO_{inverso} presentan una intensidad de la fluorescencia (431.50 ± 18.95 u.a.) que es

significativamente mayor a la de los animales CON _{inverso} (358.01 ± 10.64 u.a.; Figura 32; $p < 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos). Asimismo, al realizar una comparación de los niveles de inmunofluorescencia entre los animales que fueron administrados con el P β A₁₋₄₂ se observa un incremento significativo de la intensidad relativa de la fluorescencia en el grupo EO P β A₁₋₄₂ (452.90 ± 17.99 u.a.) en comparación con los animales CON P β A₁₋₄₂ (317.70 ± 14.42 u.a.; Figura 32; $p < 0.05$; $n = 6$ en ambos grupos).

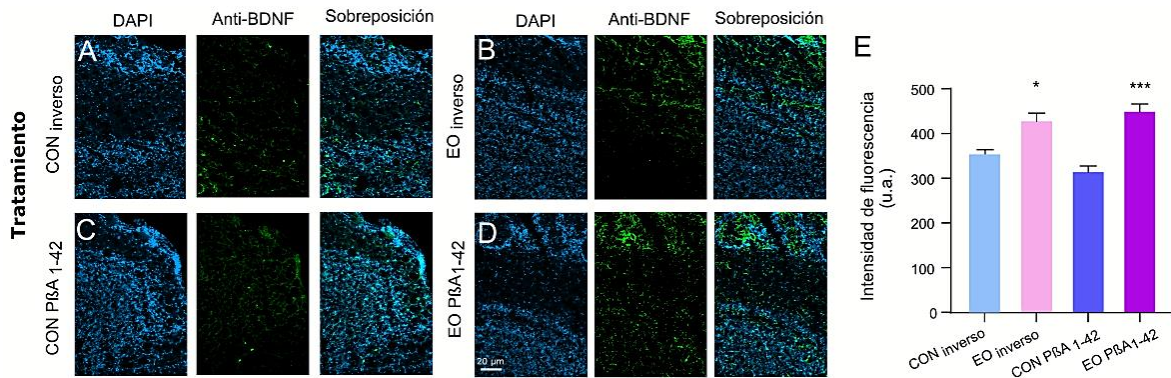


Figura 32. Acumulación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; por sus siglas en inglés) en animales control y enriquecidos olfativamente posterior a la administración del péptido beta amiloide (P β A₁₋₄₂) o su secuencia inversa. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y el BDNF inmunohistoquímicamente con el anticuerpo Anti-BDNF (verde). A) Se muestra una microfotografía representativa del bulbo olfatorio principal para los siguientes grupos: A) CON _{inverso} B), EO _{inverso}, C) CON P β A₁₋₄₂ y D) EO P β A₁₋₄₂. E) Cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia relativa de BDNF. Note un incremento significativo de la fluorescencia acoplada al anticuerpo anti-BDNF en los animales EO _{inverso} en comparación con los animales CON _{inverso}. Adicionalmente, se observa un incremento significativo de la fluorescencia de BDNF en los animales EO P β A₁₋₄₂ comparados con los animales CON P β A₁₋₄₂. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los datos se reportan como la media \pm el EEM.

Efecto de la administración del P β A₁₋₄₂ sobre la activación glomerular

Con la finalidad de evaluar posibles cambios en la activación glomerular durante el enriquecimiento olfatorio y/o la administración del P β A₁₋₄₂, o su secuencia inversa, se realizó imagenología óptica intrínseca bulbar durante la estimulación con acetato de amilo (AA), butirato de etilo (BE; ver anexo), limoneno + (Li (+); ver anexos) y limoneno (Li (-); ver anexo), a concentración alta y baja (100% y 1% v/v, respectivamente; Figuras 33 y 34). Lo anterior, se llevó a cabo en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas

después (Semana 2 y 3) de la administración de la secuencia inversa del PβA y del inicio del enriquecimiento olfatorio.

Dos semanas después de la administración de la secuencia inversa del PβA y del inicio del enriquecimiento olfatorio (semana 2; Figura 33 A-B; n = 6), se observó que, durante la estimulación con acetato de amilo a una concentración alta, los animales control y enriquecidos olfatoriamente presentan una cantidad de glomérulos similar a los encontrados antes de la administración de la secuencia inversa del péptido (Figura 33 A-B; n = 6; Semana 1 vs semana 3: CON_{inverso}: 3.70 ± 0.45 vs. 3.40 ± 0.45 glomérulos; EO_{inverso}: 3.11 ± 0.61 vs. 4.22 ± 0.46 glomérulos; $p > 0.05$). Este fenómeno es similar en los animales enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el PβA₁₋₄₂ (Figura 33 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: EO PβA₁₋₄₂: 2.55 ± 0.37 vs. 4.33 ± 0.84 glomérulos; $p > 0.05$). Por otra parte, se observó que la estimulación con acetato de amilo a una concentración alta tras la administración del PβA₁₋₄₂, en animales control, incrementa significativamente el número de glomérulos al cabo de dos semanas (Figura 33 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON PβA₁₋₄₂: 2.33 ± 0.28 vs. 4.40 ± 1.01 glomérulos; $p < 0.05$). Adicionalmente, la estimulación con acetato de amilo a una concentración baja (1% v/v) no muestra diferencias significativas en el número de glomérulos dos semanas después del inicio del enriquecimiento olfatorio y de la administración de la secuencia inversa del péptido en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Figura 33 A-B; n = 6; Semana 1 vs semana 3: CON_{inverso}: 3.91 ± 0.79 vs. 2.50 ± 0.33 glomérulos; EO_{inverso}: 3.66 ± 0.68 vs. 3.77 ± 0.70 glomérulos; $p > 0.05$). Un efecto similar se observa en los animales enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el PβA₁₋₄₂ (Figura 33 A-B; n = 6; Semana 1 vs semana 3: EO PβA₁₋₄₂: 4.13 ± 0.75 vs. 3.67 ± 1.21 glomérulos; $p > 0.05$). En contraste, la estimulación con acetato de amilo a una concentración baja induce un incremento significativo en el número de glomérulos evocados dos semanas después de la administración del PβA₁₋₄₂ en animales control (Figura 33 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON PβA₁₋₄₂: 2.46 ± 0.32 vs. 4.60 ± 1.22 glomérulos; $p < 0.05$).

El análisis del área de los glomérulos evocados con acetato de amilo a una concentración alta y baja reveló estabilidad en la misma dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ y su secuencia inversa en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Semana 2 y 3; Figura 33 C; n = 6; p>0.05). El área de los glomérulos evocados tras la estimulación con acetato de amilo a concentraciones altas en la semana 1 vs semana 3, para los diferentes grupos experimentales fue la siguiente: CON_{inverso}: 0.019 \pm 0.005 mm² vs. 0.035 \pm 0.011 mm²; EO_{inverso}: 0.025 \pm 0.008 mm² vs. 0.018 \pm 0.007 mm²; CON P β A₁₋₄₂: 0.056 \pm 0.007 mm² vs. 0.038 \pm 0.005 mm²; EO P β A₁₋₄₂: 0.054 \pm 0.012 mm² vs. 0.031 \pm 0.011 mm² (Figura 33 C; n = 6). Por otra parte, el área de los glomérulos evocados tras la estimulación con acetato de amilo a concentraciones bajas en la semana 1 vs. semana 3, para los diferentes grupos experimentales fue la siguiente: Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 0.028 \pm 0.004 mm² vs. 0.038 \pm 0.011 mm²; EO_{inverso}: 0.029 \pm 0.007 vs. 0.027 \pm 0.009 glomérulos; CON P β A₁₋₄₂: 0.043 \pm 0.007 vs. 0.034 \pm 0.004 mm²; EO P β A₁₋₄₂: 0.032 \pm 0.006 vs. 0.043 \pm 0.011 mm² (Figura 33 C; n = 6).

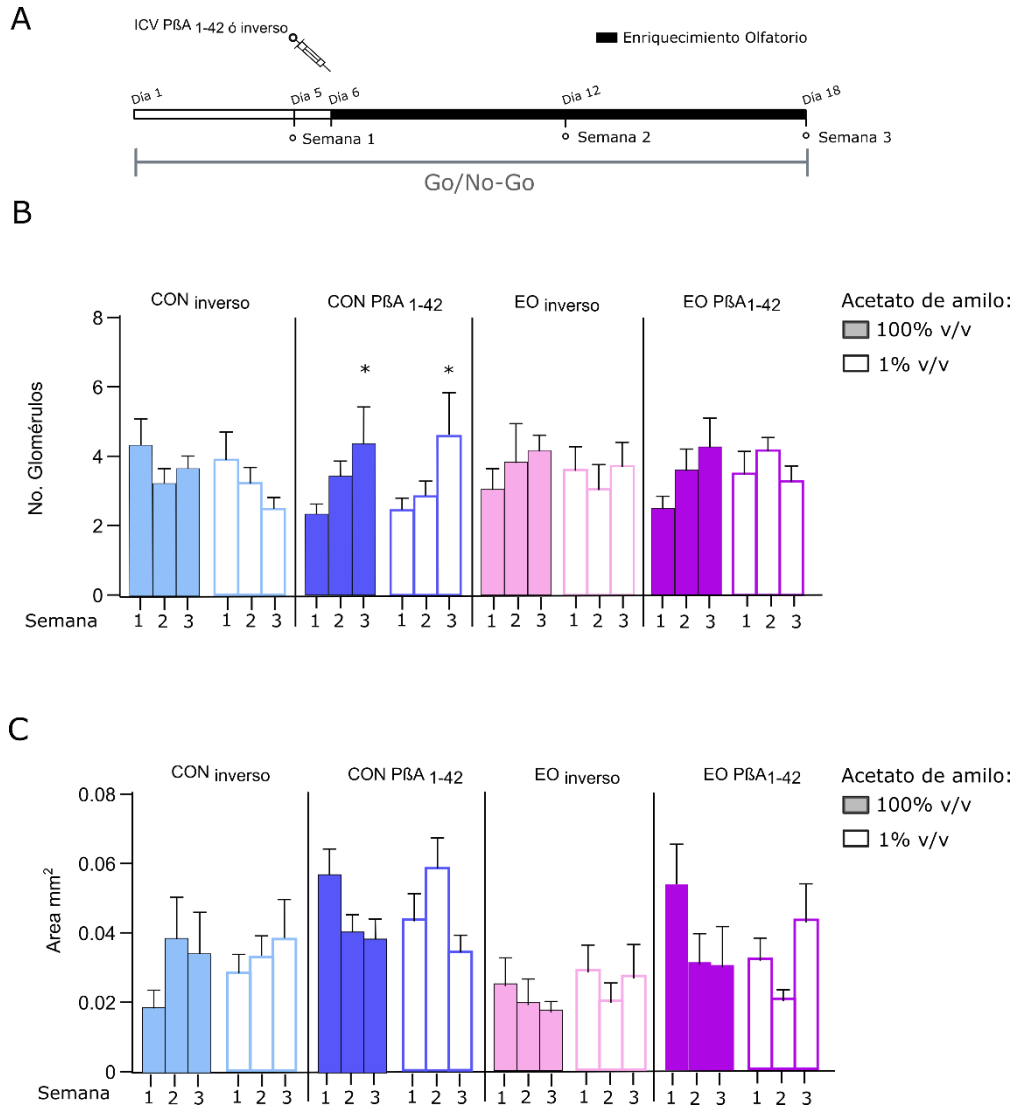


Figura 33. Cuantificación del número y el área de glomérulos activados tras la estimulación con acetato de amilo en animales control y enriquecidos olfatoriamente administrados con el PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A) Diagrama del procedimiento experimental (ver material y métodos) y de los momentos en que los animales fueron evaluados mediante imagenología óptica intrínseca bulbar durante el entrenamiento en la prueba de discriminación olfatoria Go/No-Go: un día previo (Semana 1), una semana después (Semana 2) y dos semanas después de la administración del PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa (Semana 3). B) Número y (C) área de los glomérulos activados por la estimulación con acetato de amilo. El aroma fue presentado a una concentración alta (100% v/v; barras en color sólido) y una baja (1% v/v; barras sin relleno). Se muestra un incremento significativo en el número de glomérulos activos tras la estimulación con acetato de amilo en los animales control administrados con el PβA₁₋₄₂ que no se observa en los animales enriquecidos con aromas administrados con el PβA₁₋₄₂. * p<0.05. Los datos se reportan como la media ± el EEM.

Adicionalmente, se evaluó la cinética de activación glomerular en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas después (Semana 2 y 3; Figura 34 A) de la administración de la secuencia inversa del P β A y del inicio del enriquecimiento olfatorio. En primer lugar, se cuantificaron los cambios en la dinámica de activación glomerular en los animales control y enriquecidos con aromas administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa durante la estimulación con acetato de amilo a una concentración alta (100%). Para ello, se realizó una normalización con respecto de la actividad espontánea (considerada como el 100%). Esta cuantificación muestra que, para cada captura y cada grupo experimental durante las 3 semanas de adquisición de imágenes, los patrones de activación glomerular promedio permanecen estables durante el primer segundo de la adquisición de la imagenología óptica intrínseca previos a la estimulación olfatoria (Figura 34 A-D). Así mismo, se observa que, tras la estimulación con acetato de amilo a una concentración alta (100% por 4 segundos) se produce una disminución de la reflectancia de los glomérulos activos (Figura 34 A-D; n = 6) en todos los grupos y durante las 3 capturas realizadas (1 por semana) de la imagenología óptica intrínseca bulbar.

La evaluación del cambio en la reflectancia en el último segundo de la estimulación con acetato de amilo a una concentración alta no muestra diferencias significativas al finalizar el protocolo de enriquecimiento olfatorio en animales control y enriquecidos administrados con la secuencia inversa del péptido (Semana 3; Figura 34 A, C; n=6; CON_{inverso}: $-36.69 \pm 5.57\%$; EO_{inverso}: $-25.59 \pm 13.19\%$). De la misma forma, no se encontraron diferencias significativas en la dinámica de la activación glomerular global en los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el P β A₁₋₄₂ al finalizar el protocolo de enriquecimiento (Semana 3; Figura 34 D; n = 6; EO P β A₁₋₄₂: $-33.89 \pm 3.82\%$). En contraste, los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ presentan una reducción significativa en la reflectancia dos semanas después de la administración del péptido (Semana 3; Figura 34 B; n = 6; CON P β A₁₋₄₂: $-14.26 \pm 7.69\%$).

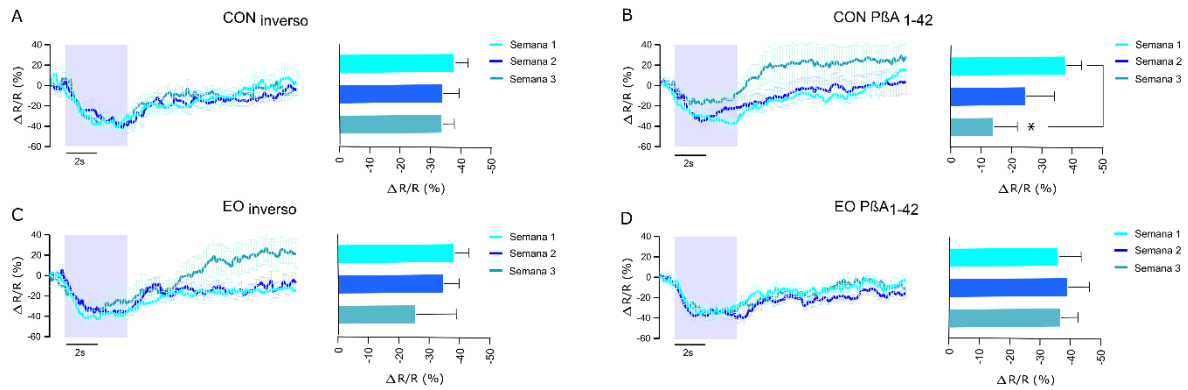


Figura 34. Curso temporal de la activación glomerular tras la estimulación con acetato de amilo a una concentración alta (100%) en animales control y enriquecidos administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A-D) Dinámica de activación glomerular antes (semana 1) y dos semanas después (semana 2 y 3) de la administración del P β A₁₋₄₂ en animales control y enriquecidos olfatoriamente (izquierda). Para cada caso, se muestra el porcentaje de cambio promedio en el tiempo de todos los glomérulos evocados tras la estimulación con acetato de amilo a una concentración alta (100% v/v, recuadro en azul para todos los casos) con respecto de la actividad espontánea (considerada como el 100%). Así mismo, se grafica la disminución de la reflectancia durante el último segundo de la estimulación con acetato de amilo (100% v/v; derecha) durante las tres semanas de captura. * $p < 0.05$. Los datos se reportan como la media \pm EEM.

DISCUSIÓN

El sistema olfatorio en mamíferos es crucial para la supervivencia y la reproducción (Van Hartevelt, & Kringelbach, 2012). Diversos factores como la dieta (Temmel *et al.*, 2002), ciertos desórdenes neurológicos (Murphy, 1999; Hawkes *et al.*, 1997, Hawkes, 2003; Hawkes & Doty, 2009; Doty, 2015), la privación sensorial (Waggener & Coppola, 2007; Mandairon *et al.*, 2006a; Aylwin *et al.*, 2009) o la experiencia sensorial (Rocheffort *et al.*, 2002; Veyrac *et al.*, 2009) cambian la percepción olfatoria. Incrementando (hiperosmia; Veyrac *et al.*, 2009) o disminuyendo esta función (hiposmia; Temmel *et al.*, 2002).

En este trabajo se demostró que el enriquecimiento olfatorio (EO), que consiste en la exposición pasiva y crónica a una gama amplia de aromas, es capaz de inducir procesos plásticos en el bulbo olfatorio principal (BOP) que se reflejan en cambios en la actividad glomerular evocada con aromas y en la potencia de la actividad neuronal poblacional. Así mismo, nuestros resultados indican que el EO induce un incremento en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) bulbar y una mejora en la discriminación e identificación olfatoria innatas de aromas a concentraciones bajas. Por otra parte, demostramos que la sola administración del péptido β amiloide (P β A₁₋₄₂) altera la discriminación fina a los aromas e induce una alteración en los patrones de activación glomerular a largo plazo. Nuestros resultados muestran que este fenómeno puede ser prevenido por el EO. Además, demostramos que el EO previene los efectos deletéreos de la administración del P β A₁₋₄₂ sobre la actividad bulbar. Esto se asoció con una mejora de la discriminación de aromas. Finalmente, reportamos que el EO es capaz de disminuir la agregación del P β A₁₋₄₂ e incrementar los niveles del BDNF. A continuación, se discuten dichos resultados.

El enriquecimiento olfatorio disminuye el número de glomérulos evocados con aromas e incrementa su área, intensidad y selectividad

Al evaluar los patrones de activación glomerular en animales enriquecidos, demostramos que la estimulación olfatoria induce un incremento en el área y la intensidad de la absorbancia de los glomérulos evocados con aromas. Así mismo,

se observa una disminución en el número de glomérulos activos, lo que permite una menor superposición de los mapas olfatorios evocados con aromas (Figura 35). Los glomérulos son estructuras complejas compuestas por diferentes interneuronas (Kasowsky *et al.*, 1999; Imai, 2014; Nawroth *et al.*, 2007), células gliales (Kasowsky *et al.*, 1999; Nawroth *et al.*, 2007; Roux *et al.*, 2011; Daumas-Meyer *et al.*, 2017) y neuropilo donde se efectúa la sinapsis entre las dendritas apicales de las células mitrales/empenachadas y las terminales axónicas de las neuronas sensoriales olfatorias (Kasowsky *et al.*, 1999; Nawroth *et al.*, 2007; Mori & Sakano, 2011; Imai, 2014; Sakano, 2020). Es probable que los cambios observados en volumen, el área y la intensidad de activación glomerular, impliquen modificaciones importantes en alguno de estos elementos. Por ejemplo, el incremento en el volumen glomerular está relacionado con un aumento en el número de interneuronas yuxtglomerulares (Woo *et al.*, 2006; Sachse *et al.*, 2007; Busto *et al.*, 2009; Bovetti *et al.*, 2009; Degano *et al.*, 2014; Bonzano *et al.*, 2016), del número de células mitrales y empenachadas (Rosselli-Austin & Williams, 1990; Liu & Urban, 2016), del número de terminales axónicas provenientes de las neuronas sensoriales olfatorias (Cadiou *et al.*, 2014; Monjaraz-Fuentes *et al.*, 2017; Degano *et al.*, 2014) y de la densidad sináptica (Hinds & Hinds, 1976; Nezlin *et al.*, 2003).

El enriquecimiento olfatorio acelera la actividad poblacional del BOP en ausencia y presencia de aromas

Por otra parte, nuestros resultados indican que el EO cambia la actividad poblacional del BOP en presencia o ausencia de aromas, lo que se refleja en una disminución en la potencia de las oscilaciones lentas (<12 Hz) así como un incremento en la potencia de las oscilaciones rápidas (>12 Hz; Figura 35). Diversos reportes indican que la experiencia sensorial induce una disminución en la respuesta de las neuronas sensoriales olfatorias (Barbour *et al.*, 2008) y las células mitrales bulbares (Buonviso *et al.*, 1998; Buonviso & Chaput, 2000; Chaudhury *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2012). Por ello, la reducción de las oscilaciones lentas observadas en nuestro trabajo podría ser el resultado de modificaciones plásticas en ambos tipos celulares. Por otra parte, el incremento en la actividad de las

interneuronas de la capa granular reportado en otros estudios (Arenkiel *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2009), podría explicar el incremento de las oscilaciones rápidas en el BOP (Boyd *et al.*, 2012), principalmente en el rango de oscilaciones gamma (>30Hz) en respuesta a la estimulación olfatoria repetitiva (Arenkiel *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2009; Mandairon *et al.*, 2006b; Zhou *et al.*, 2016; Geramita & Urban, 2016; Moreno *et al.*, 2009). Asimismo, nuestros resultados muestran que el EO induce un incremento en la potencia de las oscilaciones tipo beta (12-30 Hz), lo que podría reflejar cambios en la modulación centrífuga proveniente de la corteza piriforme (Boyd *et al.*, 2012), como se ha observado en protocolos similares al nuestro que implican experiencia olfatoria prolongada (Jacobson *et al.*, 2018; Fleming *et al.*, 2019). Tal es el caso del trabajo de Fleming y colaboradores (2019), quienes demostraron que la exposición a olores produce un incremento en la actividad de las oscilaciones beta en la corteza piriforme y mejora la discriminación de aromas (Fleming *et al.*, 2019), como se observa en los resultados reportados en esta tesis. Este fenómeno sugiere que el EO podría no sólo generar modificaciones plásticas a nivel bulbar, sino que además este fenómeno podría extenderse a otras regiones cerebrales como la corteza piriforme.

El enriquecimiento olfatorio incrementa los niveles de BDNF en el BOP

Es importante destacar que muchos de los cambios descritos podrían ser influenciados por una sobreproducción en los niveles de BDNF (Figura 35), como se ha observado en neonatos (Degano *et al.*, 2014) y adultos después de la exposición prolongada a aromas (Kim *et al.*, 2019). La expresión de BDNF depende de la actividad del BOP (Biju *et al.*, 2008; McLean *et al.*, 2001), lo que promueve la reconfiguración de la citoarquitectura glomerular (Cao *et al.*, 2007; Bergami *et al.*, 2013), el refinamiento olfatorio, la especialización sináptica y la reconfiguración de mapas glomerulares (Tisay *et al.*, 2000; Degano *et al.*, 2014). En esta tesis se demostró una correlación entre un incremento en los niveles de BDNF y las modificaciones plásticas en el BOP, sin embargo, es necesario determinar el mecanismo molecular que subyace a dicho incremento y si hay una relación causal entre ambos fenómenos.

El enriquecimiento olfatorio potencia la detección y la discriminación durante retos olfatorios

En cuanto a la conducta olfatoria, los resultados de esta tesis indican que el EO incrementa la habituación/deshabituación, la aversión y la preferencia innata a los aromas (Figura 35). Estos hallazgos concuerdan con lo observado por Mandairon y colaboradores (2018) quienes mostraron un incremento en la habituación/deshabituación como producto de la experiencia sensorial (Mandairon *et al.*, 2018; Inoue *et al.*, 2021), que persiste incluso frente a retos olfatorios que implican la discriminación de moléculas odorantes altamente similares, como los enantiómeros (Mandairon *et al.*, 2018). En nuestro trabajo mostramos que el EO genera un incremento en la discriminación de aromas a una concentración baja.

Así mismo, al evaluar el potencial de campo local (LFP) del circuito bulbar en animales EO, demostramos que la aplicación de aromas a bajas concentraciones induce un incremento de la actividad bulbar, que es de mayor magnitud comparada a la que se observa en animales control. Estas oscilaciones dependen de la sincronización de ciertos tipos neuronales en el bulbo olfatorio (Friedman & Strowbridge, 2003; Kay, 2003, 2005) que imponen diferentes patrones oscilatorios a todo el circuito (Adrian, 1942; Adrian, 1950; Kay *et al.*, 2015). Diversos reportes indican que la experiencia sensorial olfatoria (Ravel *et al.*, 2003; Beshel *et al.*, 2007) incrementa la amplitud y la frecuencia de las oscilaciones beta (15-40 Hz; Beshel *et al.*, 2007) y gamma (40-100 Hz; Ravel *et al.*, 2003; Beshel *et al.*, 2007) en el BOP (Beshel *et al.*, 2007). Las oscilaciones gamma, que surgen como producto de las sinapsis dendrodendríticas entre las células mitrales y las células granulares (Ravel *et al.*, 2003), se modifican con las demandas olfatorias (Wang *et al.*, 2019) y con la manipulación selectiva de sus receptores, tanto glutamatérgicos como gabaérgicos (Okutani *et al.*, 1999; Nusser *et al.*, 2001). En tareas de aprendizaje olfatorio, el bloqueo (Okutani *et al.*, 1999) o la ausencia (Nusser *et al.*, 2001) de los receptores GABA_A en las células mitrales mejora la discriminación de aromas aversivos y conduce a un incremento en la potencia de las oscilaciones gamma (Nusser *et al.*, 2001; Okutani *et al.*, 1999). Así mismo, se ha observado que, en tareas de discriminación olfatoria, las células mitrales disminuyen su tasa de disparo (Wang

et al., 2019). Mientras que, en la exposición pasiva a estímulos olfatorios, se presentan predominantemente respuestas excitatorias (Fuentes *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2019). Por otra parte, las células mitrales son más responsivas a los incrementos en la concentración de los estímulos olfatorios (Parabucki *et al.*, 2019; Nagayama *et al.*, 2014). Todo lo anterior sugiere que la estimulación pasiva a largo plazo, como el EO empleado en este trabajo, podría modificar las propiedades intrínsecas de las células mitrales propiciando el incremento en la actividad bulbar evocada con aromas a bajas concentraciones en los animales EO. Por otro lado, a pesar de que no son claros los mecanismos celulares involucrados en la detección de estímulos olfatorios a diferentes concentraciones (Dewan *et al.*, 2018), hay evidencias de que el incremento en el umbral de detección de aromas es un proceso que depende de la vía transduccional que ocurre en las neuronas sensoriales olfatorias (NSO), localizadas en el epitelio olfatorio (Grosmaître *et al.*, 2006). Los receptores de las NSO están acoplados a una proteína G de tipo *olf* (Jones & Reed, 1989). Los receptores de las NSO sufren un cambio conformacional tras la asociación de su ligando o molécula olfatoria (Jones & Reed, 1989), favoreciendo a través de la activación de su vía transduccional la actividad enzimática del adenilato ciclasa tipo III (Bakalyar & Reed, 1990), lo que induce un incremento en los niveles de AMPc que permiten la apertura de canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG; Nakamura & Gold, 1987). En consecuencia, además de la despolarización mediada por el flujo de Na⁺, el ingreso de Ca²⁺ por estos canales (Kurahashi & Yau, 1993), propicia la apertura de canales de Cl⁻ y potencia la despolarización de las NSO (Kurahashi & Yau, 1993), debido a que las NSO lo acumulan en su interior (Kurahashi & Yau, 1993). Diversos reportes señalan que esta corriente de Cl⁻ activada por Ca²⁺ incrementa proporcionalmente al incremento en la concentración de los estímulos olfatorios (Li *et al.*, 2018). Por lo anterior, es posible que los cambios observados en la detección de estímulos olfatorios a bajas concentraciones en los animales enriquecidos con aromas podrían estar mediados por una modulación al alza en los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ después de la estimulación olfatoria, lo que a su vez podría ejercer efectos indirectos en la activación subsecuente de las células mitrales en el BOP.

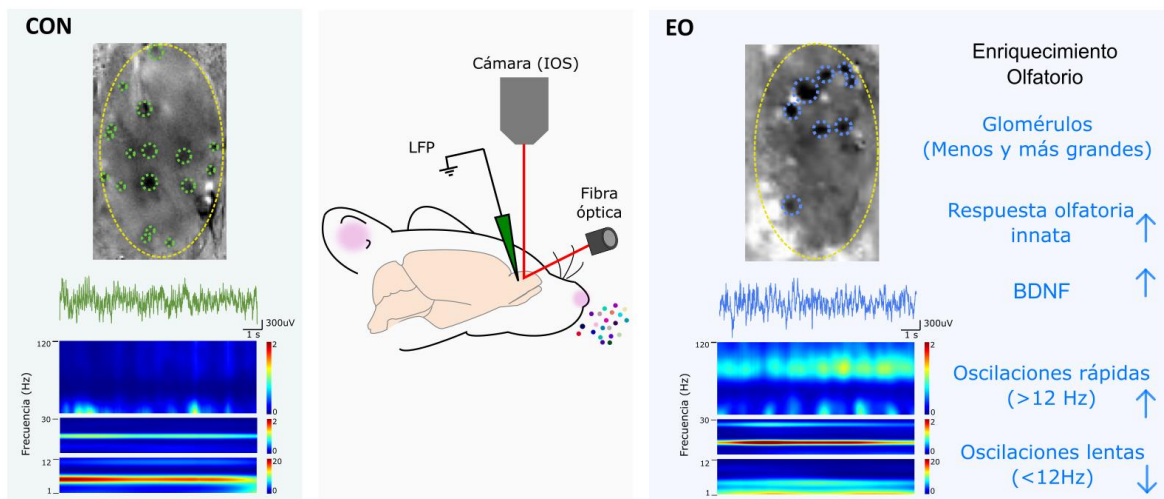


Figura 35. Modificaciones en el bulbo olfatorio principal (BOP) al término del periodo del enriquecimiento olfatorio (EO). El EO en animales adultos aumenta el área y la intensidad de los glomérulos reclutados con olores, lo que se combina con un refinamiento en los mapas glomerulares. La experiencia olfativa también cambia la actividad de la población BOP, incluida una disminución de las oscilaciones lentas (<12 Hz) y un aumento de las rápidas (>12 Hz). Todos estos cambios funcionales se correlacionan con un aumento del BDNF y con respuestas olfativas innatas mejoradas.

El enriquecimiento olfatorio evita la inhibición de la respuesta del LFP evocada con aromas en animales administrados con el P β A₁₋₄₂

Por otra parte, nuestros resultados indican que los animales sometidos a enriquecimiento olfatorio y administrados con el P β A₁₋₄₂ se protegen contra la inhibición de la respuesta del LFP durante la estimulación sensorial con acetato de amilo inducida por el P β A₁₋₄₂ (Figura 36). Como se mencionó anteriormente, la estimulación con aromas evoca patrones de actividad oscilatoria rápidos en el rango de frecuencia gamma dentro del BOP (Beshel *et al.*, 2007), mismos que son afectados por el P β A₁₋₄₂ (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). Interesantemente, parece haber una relación recíproca entre la actividad gamma cerebral y el P β A₁₋₄₂ (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013), pues mientras que el P β A₁₋₄₂ disminuye la potencia del ritmo gamma (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013), la promoción de este ritmo en distintas estructuras cerebrales disminuye los niveles del P β A₁₋₄₂ (Laccarino *et al.*, 2016). Entre estas estructuras se encuentra el hipocampo (Laccarino *et al.*, 2016), donde la estimulación optogenética de las interneuronas de disparo rápido a una frecuencia gamma produce una disminución en los niveles del P β A₁₋₄₂ (Laccarino *et*

al., 2016). Además, la estimulación no invasiva con luz a 40 Hz (incluida en el gamma), en ratones transgénicos que simulan un fenotipo similar a la Enfermedad de Alzheimer, induce una reducción en los niveles del P β A₁₋₄₂ en la corteza visual (Laccarino *et al.*, 2016). Lo anterior se debe, en parte, a un incremento de la endocitosis microglial del P β A₁₋₄₂ en el cerebro (Laccarino *et al.*, 2016). Lo que sugiere que una potenciación de los patrones oscilatorios rápidos inducidos por aromas podrían reclutar no solo a las neuronas, sino, adicionalmente a la microglía (Ferreira & Castellano, 2019). Lo anterior, podría explicar el estado protector que se observa en los animales EO contra los efectos deletéreos del P β A₁₋₄₂ sobre la actividad neuronal poblacional bulbar. Posiblemente este efecto protector esté relacionado también con una disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) que se produce por diferentes aromas, como los empleados en el EO (Miyazawa *et al.*, 1998; Miyazawa *et al.*, 2001; Benny & Thomas, 2019). Esto es relevante ya que un incremento en los niveles del P β A₁₋₄₂ cerebral correlaciona con un aumento en la actividad de la AChE (García-Ayllón *et al.*, 2008). Este fenómeno es característico en la Enfermedad de Alzheimer y ha demostrado inducir deterioro cognitivo severo en los pacientes con EA (García-Ayllón *et al.*, 2008). La AChE es una enzima que se encarga de la degradación de la acetilcolina (ACh; Trang & Khandhar, 2019) que es un neuromodulador que se asocia a los receptores muscarínicos y nicotínicos de las interneuronas de la capa glomerular y de las células mitrales del BOP (Kasa *et al.*, 1995). Chaudhury y colaboradores (2009), demostraron que el bloqueo de la actividad de la AChE por la administración de neostigmina en el BOP incrementa el disparo de las células mitrales tras la estimulación con diferentes aromas mejorando la discriminación (Chaudhury *et al.*, 2009). Estos hallazgos sugieren que el enriquecimiento olfatorio podría disminuir la actividad de la acetilcolinesterasa y contrarrestar su incremento por la administración del P β A, lo que contribuiría al mantenimiento de la actividad neuronal evocada por aromas en el BOP.

Durante el desarrollo de la EA, se producen procesos inflamatorios (Stamouli & Politis, 2016), como la activación crónica de la microglía, que contribuyen al incremento en la producción del P β A (Meraz-Ríos *et al.*, 2013) y la secreción de

citocinas proinflamatorias (Hu *et al.*, 1998; Yates *et al.*, 2000). Particularmente, el incremento en la expresión de interleucina-1beta (IL-1 β) en la EA (Shaftel *et al.*, 2008), favorece la actividad de la AChE mediante el incremento en la expresión del ARNm de AChE (Li *et al.*, 2000; Shaftel *et al.*, 2008). Lo anterior, induce una disminución en la expresión de los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR; Lombardo & Maskos, 2015). Esto es relevante ya que la activación de estos receptores previene la liberación de citosinas proinflamatorias (Gallowitsch-Puerta & Tracey, 2005; Zhan *et al.*, 2017) que se producen durante el desarrollo de la EA (Meraz-Ríos *et al.*, 2013).

Por otra parte, en el BOP, se ha reportado que la disminución en la expresión de los $\alpha 7$ nAChR induce un deterioro en el aprendizaje asociativo, la preferencia y el procesamiento de aromas (Hellier *et al.*, 2012). En contraste, un incremento en su expresión favorece la discriminación de aromas a una baja concentración (Hellier *et al.*, 2010). Lo anterior, posiblemente por la alta expresión de los receptores $\alpha 7$ nAChR en la GCL del BOP (D'Souza *et al.*, 2013). Interesantemente, como se mencionó anteriormente, la GCL presenta diversas modificaciones plásticas al término del periodo de EO. Por ello, hipotetizamos que el EO, podría contribuir con la expresión de los $\alpha 7$ nAChR en el BOP, permitiendo al mismo tiempo reducir la síntesis de citosinas proinflamatorias que se producen por la administración P β A. Lo anterior, podría contribuir con el mantenimiento de la actividad neuronal evocada por aromas en el BOP. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales que permitan confirmar estas hipótesis.

La disminución de la actividad neuronal poblacional del BOP producida por el P β A₁₋₄₂ puede ser prevenida por el incremento en los niveles de BDNF inducido por el enriquecimiento olfatorio

Adicionalmente, nuestros resultados indican que la sola administración del P β A₁₋₄₂ induce una disminución del LFP en el BOP (Figura 36). Este hallazgo coincide con reportes previos que señalan que la sola administración del P β A₁₋₄₂ en la corteza prefrontal (Flores-Martínez *et al.*, 2017) y el hipocampo (Gutiérrez-Lerma *et al.*, 2013; Alcantara-Gonzalez *et al.*, 2019), disminuye la actividad eléctrica neuronal de

campo (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Salgado-Puga *et al.*, 2017). Así mismo, se ha observado que la administración del P β A₁₋₄₂ en preparaciones *in vitro* del bulbo olfatorio, induce una disminución de la actividad espontánea bulbar (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018). De manera más directamente relacionada a nuestro hallazgo, la administración intrabulbar del P β A₁₋₄₂ a animales despiertos y en libre movimiento reduce la potencia de la actividad neuronal del BOP y la correlación funcional de ambos bulbos olfatorios (Hernández-Soto *et al.*, 2019). Lo anterior, posiblemente por la reducción de la transmisión sináptica GABAérgicas y glutamatérgica inducida por el P β A₁₋₄₂ (Karisetty *et al.*, 2020). Este fenómeno ha sido observado en estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral (Kurudenkandy *et al.*, 2014), en las que ambas sinapsis son cruciales en la generación de la actividad oscilatoria, tal como ocurre con la actividad oscilatoria bulbar (Beshel *et al.*, 2007). Uno de los mecanismos involucrados en los efectos deletéreos producidos por el P β A₁₋₄₂ en el cerebro involucra la activación de la cinasa de la glucógeno sintetasa 3 beta (GSK3 β , por sus siglas en inglés; Peña-Ortega *et al.*, 2012; Isla *et al.*, 2016). La GSK3 β está involucrada en el deterioro cognitivo, así como de la activación microglial y astrocítica, típicos de la enfermedad de Alzheimer (Armato *et al.*, 2013). La activación de la GSK3 β promueve la degradación de la proteína precursora amiloide, que inicia la vía amiloidogénica (Ly *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014), lo que resulta en un incremento en los niveles del P β A (Ly *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014). Además, la activación de la GSK3 β lleva a la fosforilación de diferentes blancos que modulan la excitabilidad neuronal, incluidos canales iónicos y receptores (Smillie & Cousin, 2011; James *et al.*, 2015). Interesantemente, resultados de nuestro laboratorio también muestran que la activación de la GSK3 β ocurre de manera simultánea a la reducción de la potencia de las oscilaciones beta y gamma rápido producida por el P β A₁₋₄₂ (Peña-Ortega *et al.*, 2012; Salgado-Puga *et al.*, 2015). Por ello, hipotetizamos que, como ocurre en otros circuitos, la administración del P β A₁₋₄₂ genera la activación de la GSK3 β y reduce la potencia de la actividad neuronal en el BOP. Esto sugiere que los inhibidores de la GSK3 β podrían prevenir los efectos del P β A₁₋₄₂ sobre la actividad neuronal del circuito bulbar (Peña-Ortega *et al.*, 2012; Salgado-Puga *et al.*, 2015).

De hecho, la administración de litio, un bloqueador inespecífico de la GSK3 β , previene la inhibición de la actividad neuronal inducida por el P β A₁₋₄₂ en la corteza entorrinal (Peña-Ortega *et al.*, 2012) y el BOP (Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018), lo que es reproducido con un inhibidor específico de la GSK3 β (Peña-Ortega *et al.*, 2012; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, 2018). El litio, además de tener un efecto inhibitorio directo sobre la GSK3 β (Freland & Beaulieu, 2012), incrementa los niveles de BDNF (Hashimoto *et al.*, 2002). Por su parte, el BDNF regula la producción del P β A₁₋₄₂ cerebral (Peng *et al.*, 2009), pues existe una relación negativa entre el BDNF y la producción del P β A (Peng *et al.*, 2009). Así, cuando los niveles de BDNF disminuyen los niveles del P β A₁₋₄₂ incrementan, y viceversa (Peng *et al.*, 2009). Además, el BDNF contrarresta los efectos celulares del P β A (Arancibia *et al.*, 2008). Se ha propuesto que uno de los mecanismos involucrados en estos efectos protectores del BDNF contra la acción inhibitoria del P β A₁₋₄₂ es la activación de sus receptores Trk, a los cuales se une con una alta afinidad (Klein *et al.*, 1991; Arai *et al.*, 1996). La activación de los receptores Trk por el BDNF propicia la activación del complejo ERK que, a su vez, es capaz de inhibir a la GSK3 β (Ding *et al.*, 2005). Es importante destacar que la GSK3 β , presenta más de 100 sustratos de fosforilación (Beurel *et al.*, 2015). Por lo que se ha propuesto que su modulación pudiera impactar diferentes mecanismos patológicos involucrados en el desarrollo de la EA (Beurel *et al.*, 2015). Por ejemplo, el incremento en la actividad de la GSK3 β es el resultado de la inhibición de la proteína fosfatasa 1 (PP1), a través de la fosforilación de su inhibidor I-2 (Beurel *et al.*, 2015). Otro de los mecanismos inhibitorios de la PP1 involucra el incremento del P β A (Vintém *et al.*, 2009). Esto sitúa a la regulación de la PP1 como un mecanismo patológico importante en el desarrollo de la EA (Vintém *et al.*, 2009). Posiblemente, el incremento observado en los niveles de BDNF durante el EO favorezca una disminución en los efectos del P β A₁₋₄₂ en el cerebro a través de estas vías, tal como se muestra en la inmunofluorescencia de P β A₁₋₄₂ reportada en esta tesis. Diversas manipulaciones como el enriquecimiento ambiental (Sun *et al.*, 2010) y el ejercicio voluntario (Soya *et al.*, 2007), incrementan los niveles de BDNF (Soya *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010). Nuestros resultados indican que el EO modifica los niveles de BDNF en el bulbo olfatorio, donde se ha

mostrado que presenta efectos tróficos que incluyen el incremento en la neurogénesis bulbar (Bath *et al.*, 2012) y la reconfiguración de las espinas dendríticas de las células granulares (McDole *et al.*, 2015). Por lo anterior, es posible sugerir que el BDNF, que incrementa durante el EO, podría participar en la protección contra los efectos deletéreos producidos por el P β A₁₋₄₂ en el circuito bulbar.

Las alteraciones en la discriminación y la detección de aromas inducidas por el P β A₁₋₄₂ son prevenidas por el enriquecimiento olfatorio

Por otra parte, nuestros resultados indican que la administración del P β A₁₋₄₂ altera la discriminación y detección de aromas en la prueba de habituación/deshabitación (Figura 36). La prueba de habituación/deshabitación es una prueba conductual olfatoria que evalúa la memoria no declarativa o implícita y que no es dependiente del hipocampo (Wesson *et al.*, 2010). El desempeño adecuado en esta prueba requiere de la función eficiente de los receptores NMDA de las células granulares del bulbo olfatorio (McNamara *et al.*, 2008), ya que el bloqueo de estos receptores con el antagonista MK-801, extingue la habituación olfatoria (McNamara *et al.*, 2008). Es importante destacar que el P β A₁₋₄₂ es capaz de modular directa o indirectamente a las subunidades GluN1 y GluN2B del receptor NMDA (Costa *et al.*, 2012), alterando el flujo de Ca²⁺ a través de estos receptores, lo que conlleva a la disfunción sináptica y la muerte neuronal (Alberdi *et al.*, 2010). Posiblemente, la disminución en la habituación de los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ esté relacionada con una alteración en los receptores NMDA de las células granulares que, como apenas mencionamos, son necesarios para el fenómeno de habituación (McNamara *et al.*, 2008).

Adicionalmente, el P β A₁₋₄₂ también se une a los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), lo que induce un incremento en la producción del P β A₁₋₄₂ (Chen *et al.*, 2017). Es importante destacar que los mGluR también son necesarios para el proceso de habituación, a través de la regulación de la activación de las neuronas principales de la corteza piriforme (McNamara *et al.*, 2008). La corteza piriforme es el área cortical olfatoria más grande en el cerebro (Price, 2004) y desempeña un

papel fundamental en la discriminación y la percepción de aromas (Wilson, 2009; Bekkers & Suzuki, 2013). Por lo anterior, aquí sugerimos que el deterioro en la habituación olfatoria que produce el P β A₁₋₄₂, y que reportamos en este trabajo, podría deberse a un efecto deletéreo sinérgico producido por el P β A₁₋₄₂ en el BOP y la corteza piriforme. Lo anterior, correlaciona con hallazgos en los pacientes que padecen de la EA quienes presentan una reducción en la habilidad para detectar, discriminar e identificar aromas (Djordjevic *et al.*, 2008) que se acompaña con alteraciones en el BOP y la corteza piriforme. Además, existen estudios experimentales que demuestran el déficit olfatorio en ratones transgénicos que simulan la EA (Wesson *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2019), que cursan con un incremento del P β A soluble en el bulbo olfatorio (Wesson *et al.*, 2010) y con alteraciones en el BOP y la corteza piriforme (Wesson *et al.*, 2010). Un estudio reciente reveló que el P β A genera diferentes alteraciones a nivel bulbar, entre las que se encuentra una disminución del número de espinas dendríticas en las células granulares que, a su vez, conlleva a alteraciones en las sinapsis dendrodendríticas con las células mitrales (Ling *et al.*, 2019). El funcionamiento adecuado de las sinapsis dendrodendríticas es crucial para la detección y la discriminación de estímulos olfatorios (Abraham *et al.*, 2010), por lo que su alteración por el P β A contribuiría a alteraciones en estas funciones olfatorias.

Otra sinapsis importante para la detección y la discriminación olfatorias es la proveniente del *locus coeruleus* (LC; Moreno *et al.*, 2012), que constituye la principal fuente de noradrenalina en el prosencéfalo. El LC proyecta al bulbo olfatorio y está involucrado en la discriminación fina de estímulos olfatorios (Moreno *et al.*, 2012). Se sabe que el LC sufre modificaciones en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer y, al igual que el bulbo olfatorio, muestra signos de agregación tardía del P β A (Ross *et al.*, 2019). Posiblemente, una agregación del péptido en otras regiones cerebrales alejadas del bulbo olfatorio, pero que regulan su función, podría contribuir al deterioro de la capacidad olfatoria que se observa en los resultados de este trabajo y en la literatura (Ross *et al.*, 2019). Lo anterior, es muy probable, debido a que en este estudio la administración del P β A se realizó de manera ICV, lo que

posiblemente generé una alteración no solo directamente en el BOP, sino también en el LC (Moreno *et al.*, 2012) y otras partes del cerebro.

Es importante destacar que la alteración en la habilidad para discriminar estímulos olfatorios inducida por el P β A₁₋₄₂ no se presentó en los animales sometidos al EO durante la prueba de habituación/deshabituación (Figura 36). Diversos reportes señalan que el EO incrementa los niveles de la noradrenalina en ratones, lo que mejora su memoria olfatoria (Veyrac *et al.*, 2007; Shea *et al.*, 2008). Posiblemente, las proyecciones provenientes del LC que llegan a la capa granular del bulbo olfatorio (Shiple *et al.*, 1985; Mandairon & Didier, 2009) modulan la memoria olfatoria y se modifiquen tras el periodo de EO. Lo anterior es muy probable, pues la exposición a estímulos novedosos, aumenta la actividad del LC (Foote *et al.*, 1980; Aston-Jones & Bloom, 1981; Bouret & Sara, 2005). Esta posibilidad ha sido evaluada por el equipo de trabajo de Veyrac (2009), quienes reportaron que la mejora de la memoria que se produce en ratones enriquecidos olfatoriamente se ve abatida tras la administración de labetalol, un antagonista general de los receptores noradrenérgicos que actúa sobre las terminales noradrenérgicas en el bulbo olfatorio (Veyrac *et al.*, 2009). Lo anterior confirma la participación directa del sistema noradrenérgico en la memoria y reconocimiento de los estímulos olfatorios en roedores (Veyrac *et al.*, 2007), además de que sustenta la posibilidad de que el sistema noradrenérgico participa en los efectos protectores, o potenciadores de la función olfatoria, que se observan en los animales enriquecidos olfatoriamente.

Las alteraciones en la discriminación fina de aromas inducidas por el P β A₁₋₄₂ son prevenidas por el enriquecimiento olfatorio

Por otra parte, nuestros resultados indican que la discriminación olfatoria fina, evaluada en una tarea de condicionamiento operante de tipo *Go/No-Go*, se mantiene estable en los días subsecuentes a la administración del P β A₁₋₄₂ en los animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 36). El aprendizaje asociativo y los cambios en la atención que se producen durante la prueba de condicionamiento operante olfatorio de tipo *Go/No-Go* modulan la actividad poblacional de diferentes áreas cerebrales involucradas en el procesamiento de aromas como el núcleo

olfatorio anterior (Han *et al.*, 2019), la corteza entorrinal (Chapuis *et al.*, 2013), el hipocampo (Gourévitch *et al.*, 2010), la corteza piriforme (Zinyuk *et al.*, 2001; Chapuis *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2019) y el bulbo olfatorio (Gourévitch *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2019). Específicamente en el BOP, la discriminación fina y las demandas en la tarea de condicionamiento operante olfatorio tipo *Go/No-Go* potencian las oscilaciones gamma (Beshel *et al.*, 2007). Estas oscilaciones presentan una alteración en los pacientes con la EA (Jeong, 2004; Engels *et al.*, 2016; Kitchigina, 2018), así como en modelos animales de esta enfermedad (Goutagny *et al.*, 2013; Klein *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Nakazono *et al.*, 2017). Por lo anterior, diversas investigaciones han centrado su atención en el restablecimiento de las oscilaciones gamma en diferentes circuitos neuronales en condiciones patológicas relacionadas con la EA (Iaccarino *et al.*, 2016; Morterell *et al.*, 2019; Etter *et al.*, 2019). Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación audiovisual a 40 Hz durante seis meses reduce la atrofia cerebral en los pacientes con la EA (Hajos *et al.*, 2022). En modelos animales, la imposición de ritmos oscilatorios tipo gamma, mediante la estimulación sensorial, reduce la acumulación del P β A₁₋₄₂ en la región de CA1 del hipocampo (Iaccarino *et al.*, 2016), la corteza visual (Iaccarino *et al.*, 2016; Martorell *et al.*, 2019) y la corteza prefrontal (Martorell *et al.*, 2019). Además, la imposición de ritmos oscilatorios gamma a través de la estimulación optogenética de células inmunorreactivas a parvalbúmina, restaura las oscilaciones gamma intrínsecas del hipocampo y promueve el restablecimiento de la memoria espacial (Etter *et al.*, 2019). Dado que el EO incrementa la potencia de las oscilaciones gamma bulbares (Hernández-Soto *et al.*, 2022), es probable que el mantenimiento de estos ritmos oscilatorios en el BOP genere un estado protector en el circuito bulbar en presencia del P β A₁₋₄₂. Lo anterior, podría permitir la discriminación eficiente de los estímulos olfatorios, tal como se observa en los animales sometidos al EO y que fueron administrados con el P β A₁₋₄₂ en esta tesis. Posiblemente, lo anterior ocurre a través de diferentes mecanismos que impliquen la reducción en los niveles de P β A₁₋₄₂, así como otros mecanismos protectores que incluirían una la modulación de las sinapsis GABAérgicas (Iaccarino *et al.*, 2016), la fagocitosis microglial (Iaccarino *et*

al., 2016; Ta *et al.*, 2019), y la liberación de BDNF (Lu & Lu, 2014; Giuffrida *et al.*, 2018). A continuación, se discute la evidencia que apoya estas posibilidades.

Se ha demostrado que el tratamiento con antagonistas del receptor GABA_A abole por completo la reducción de la agregación del P β A inducida por la imposición de oscilaciones de tipo gamma (> 40 Hz; Iaccarino *et al.*, 2016), lo que sugiere que el mantenimiento de la transmisión GABAérgica es crítica para los efectos neuroprotectores que se observan durante la estimulación con oscilaciones de alta frecuencia (Iaccarino *et al.*, 2016). Además, el establecimiento de oscilaciones de rápidas en el hipocampo (> 40 Hz) provoca un incremento de los niveles de genes proinflamatorios, como CD68, B2m, Bst2, Icam y Lyz2, relacionados con la fagocitosis microglial (Iaccarino *et al.*, 2016). Lo anterior es consistente con la evidencia acumulada de que la microglía juega un papel en la patología de la EA (Tejera & Heneka, 2016; Hansen *et al.*, 2018; Hemonnot *et al.*, 2019). Por los antecedentes descritos, es viable que el EO, genere el reclutamiento de células microgliales que reduzcan los niveles del P β A propiciando el correcto funcionamiento de la actividad neuronal poblacional al modular las oscilaciones gamma en el circuito bulbar, y favoreciendo al mismo tiempo, la discriminación fina de aromas (Beshel *et al.*, 2007). Esto es consistente con lo observado por Ta y colaboradores (2019), quienes demostraron que la activación de la microglía por la administración de IFN- γ , una citosina inflamatoria, ralentiza las oscilaciones gamma en células de hipocampo (Ta *et al.*, 2019). Lo anterior indica que la microglía participa activamente en la modulación de ritmos oscilatorios gamma que podría ser importante para los efectos neuroprotectores en la actividad neuronal poblacional observados al término del EO, aún en presencia del P β A. Aunque hasta el momento se desconoce el papel de la microglía en las interacciones neuronales del BOP como producto de la estimulación olfatoria en sujetos sanos; posiblemente el reclutamiento de la microglía que se produce por la inducción de oscilaciones gamma, tal como ocurre durante el EO (Hernández-Soto *et al.*, 2022), favorezca el correcto mantenimiento de las oscilaciones en el bulbo olfatorio. Además, es probable que el EO genere un efecto sinérgico con la identificación y la discriminación fina de aromas durante el periodo de la prueba olfatoria de tipo

Go/No-Go, ya que las oscilaciones gamma bulbares se potencian durante esta tarea (Beshel *et al.*, 2007; Martín & Ravel, 2014). Un efecto similar se ha descrito en humanos durante tareas de identificación de aromas donde se observa un incremento de la potencia de las oscilaciones gamma en la corteza piriforme (Martin & Ravel, 2014; Yan *et al.*, 2022). Lo anterior, sugiere que el efecto protector del EO podría extenderse a regiones cerebrales involucradas con el procesamiento de la información olfatoria. La modulación de las oscilaciones gamma bulbares es un fenómeno que depende de la participación de las células granulares (CG) en el BOP (Schoppa, 2006; Rojas-Líbano & Kay, 2008; Ambard & Martínez, 2009; Osinski *et al.*, 2016). El EO induce un aumento del número de CG en el BOP (Bovetti *et al.*, 2009; Veyrac *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009), las cuales también incrementan su tasa de activación en tareas olfatorias basadas en la discriminación de aromas (Hardy *et al.*, 2018) y son esenciales para la discriminación de aromas similares (Moreno *et al.*, 2009). Cuando los ratones aprenden a discriminar aromas, las respuestas evocadas de las células granulares son distintas, dependiendo si es o no un estímulo recompensante (Wang *et al.*, 2020). Lo anterior sugiere que el EO conjuntamente con la discriminación olfatoria fina podría proteger al BOP a través de los procesos plásticos que se producen en las CG, como el refinamiento de su respuesta en presencia de aromas (Wang *et al.*, 2020), un incremento en su número (Rosselli-Austin & Williams, 1990; Bovetti *et al.*, 2009), el favorecimiento de su integración funcional en el circuito bulbar (Arenkiel *et al.*, 2011) y el refinamiento de las entradas sinápticas de estas células (Arenkiel *et al.*, 2011), lo que contribuye con el surgimiento de oscilaciones tipo gamma en el BOP (Schoppa, 2006; Rojas-Líbano & Kay, 2008; Ambard & Martínez, 2009; Osinski *et al.*, 2016). Además, el acople de las oscilaciones theta/gamma del BOP (Losacco *et al.*, 2020), así como el acople de la actividad theta entre el hipocampo y la corteza prefrontal (Ramírez-Gordillo *et al.*, 2021), modulan la discriminación olfatoria (Losacco *et al.*, 2020; Ramírez-Gordillo *et al.*, 2021). Posiblemente, el EO favorezca el acople de estas oscilaciones en presencia del P β A₁₋₄₂ contribuyendo al mantenimiento de la discriminación fina de aromas.

El uso de la estimulación olfatoria ha sido de particular interés en el tratamiento de enfermedades como la demencia (Vance *et al.*, 1999; Cha *et al.*, 2021; Oleszkiewicz *et al.*, 2021) y la enfermedad de Parkinson (Haehner *et al.*, 2013). Recientemente, su uso se ha extendido al tratamiento de la sintomatología de la EA (Vence, 2003; El Haj *et al.*, 2017; Glachet *et al.*, 2018; 2019; Glachet & El Haj, 2019; 2020), mostrando que la exposición a aromas presenta efectos positivos en la memoria autobiográfica en los pacientes (El Haj *et al.*, 2017; Glachet *et al.*, 2018; 2019; Glachet & El Haj, 2019) y la memoria de eventos futuros (Glachet & El Haj, 2020). Además, se ha observado que la estimulación con aromas mejora la función cognitiva de los pacientes con Alzheimer (Fuji *et al.*, 2008; Jimbo *et al.*, 2009) y en modelos animales de esta enfermedad (Satou *et al.*, 2018). Esto es relevante ya que una de las funciones cognitivas empleadas para la discriminación olfatoria es la memoria de trabajo (Jönsson *et al.*, 2011). Por lo anterior, es probable que el EO genere un estado protector también en la memoria de trabajo permitiendo, en consecuencia, el mantenimiento de la discriminación fina aún en presencia del P β A.

Las alteraciones en la activación glomerular evocada con aromas inducidas por el P β A₁₋₄₂ son prevenidas por el enriquecimiento olfatorio

Por otra parte, los resultados de esta tesis muestran un incremento en el número y una disminución en el área y la intensidad de la señal de los glomérulos activos durante la estimulación olfatoria dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ en animales control (Figura 36). Como se mencionó anteriormente, las señales olfatorias se transducen desde la periferia a través de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO), que proyectan sus terminales axónicas a los glomérulos del BOP (Wachowiak & Cohen, 2001). En humanos, se presenta un incremento en la acumulación de P β A en la capa glomerular (Son *et al.*, 2021a), lo que es consistente con lo observado en modelos animales transgénicos que recapitulan la fisiopatología de la EA (Son *et al.*, 2021b), que también muestran un incremento en la expresión de β -secretasa en las terminales axónicas de las NSO (Son *et al.*, 2019b). Por lo anterior, es probable que un incremento en la síntesis de P β A en la capa glomerular podría conducir a las alteraciones observadas en los

animales control de esta tesis. Este hallazgo concuerda con lo observado en el tejido bulbar *postmortem* de pacientes que cursaron con EA (Son *et al.*, 2021), donde se muestra una reducción de volumen de la capa glomerular y del número de células periglomerulares TH+, así como un incremento en la acumulación del P β A en el BOP (Son *et al.*, 2021). Es probable que esta reducción en el volumen bulbar observado tras la administración de P β A en animales control se deba a una disminución en el número de neuronas en la capa glomerular del BOP (Son *et al.*, 2021).

En contraste con estos hallazgos, nuestros resultados indican que al término del periodo de EO y de la discriminación olfatoria fina, los mapas glomerulares evocados con aromas no presentaron modificaciones aún en presencia del P β A¹⁻⁴² (Figura 36). Dado que la discriminación fina de aromas durante la prueba de condicionamiento operante olfatorio no modifica el número de glomérulos evocados con aromas ni su intensidad de activación (Abraham *et al.*, 2014). Es probable que la discriminación fina de aromas y el EO contribuyan con el mantenimiento de los mapas glomerulares que se observa de forma crónica en los animales enriquecidos olfatoriamente aún en presencia del P β A. Ogg y colaboradores (2015), encontraron que la estimulación eléctrica repetitiva del nervio olfatorio no modifica la respuesta glomerular, posiblemente por la uniformidad en la disponibilidad de glutamato en las terminales de las NSO (Ogg *et al.*, 2015). Sin embargo, existe gran cantidad de evidencia que indica que la estimulación olfatoria, que activa a las NSO en la periferia (Glezer & Malnic, 2019), modifica los patrones de activación glomerular (Rubin & Katz, 1999; Lecoq *et al.*, 2009; Vincis *et al.*, 2012). Por lo que es probable que el mantenimiento en el patrón de activación glomerular en los animales enriquecidos olfatoriamente y que fueron entrenados en la prueba de condicionamiento operante, se deba a efectos plásticos que ocurren en la periferia del sistema olfatorio, específicamente en las NSO (Ogg *et al.*, 2015). Se requieren experimentos que evalúen el potencial del EO y la discriminación olfatoria fina sobre las alteraciones en el sistema olfatorio periférico, que permitan corroborar esta hipótesis.

Numerosos estudios han demostrado que la supervivencia y la integración de las neuronas en el BOP es favorecida por el EO (Rocheffort *et al.*, 2002; Yamaguchi & Mori, 2005; Bovetti *et al.*, 2009; Bonzano *et al.*, 2014). Asimismo, el EO induce un incremento de neuronas periglomerulares dopaminérgicas y las positivas a calretinina, en el BOP (Kato *et al.*, 2012; Bonzano *et al.*, 2014), lo que podría contribuir con el incremento de dopamina extracelular, tal como se ha observado durante el entrenamiento de preferencia a aromas (Coopersmith *et al.*, 1991). El incremento de dopamina extracelular se ha asociado con la liberación de factores neurotróficos como el BDNF (Williams & Undieh, 2009), que actualmente representa un enfoque de tratamiento viable durante el curso de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Lu & Lu, 2014; Giuffrida *et al.*, 2018). Lo anterior, se apoya en que en pacientes con demencia y EA se han encontrado niveles reducidos de BDNF en el plasma y el hipocampo (Fahnestock, 2011; Brown *et al.*, 2020; van den Bosh *et al.*, 2021). Además, el BDNF protege a las neuronas contra el daño celular (Knusel *et al.*, 1992; Lindvall *et al.*, 1994), y la neurotoxicidad inducida por el P β A (Arancibia *et al.*, 2008; Mitroshina *et al.*, 2020) mediante la activación de su receptor TrkB (Arancibia *et al.*, 2008). Dado que los datos de esta tesis indican que el EO incrementa el BDNF bulbar, es posible que el mantenimiento de los mapas glomerulares en presencia del P β A₁₋₄₂ involucre procesos plásticos en las células dopaminérgicas que favorecen el incremento del BDNF bulbar.

En resumen, en este trabajo hemos mostrado que el EO induce modificaciones plásticas en el circuito bulbar que son consistentes con una mejora de la discriminación, la preferencia y la aversión innatas a los aromas. Dichas modificaciones podrían estar involucradas en la prevención del deterioro inducido en la detección de estímulos olfatorios tras la administración del P β A.

Estos resultados sugieren que el EO podría ser una herramienta terapéutica para aminorar las alteraciones en el sistema olfatorio en los pacientes con EA. Además, con relación al deterioro cognitivo progresivo que se presenta en los pacientes con EA, sería interesante determinar si la pérdida olfatoria representa un factor desencadenante para el desarrollo de la EA y si la estimulación olfatoria como la que se induce por el EO podría detener su avance progresivo. Con ello, sería posible

establecer fehacientemente el uso de EO como una vía terapéutica para la disfunción olfatoria y las alteraciones cognitivas que se producen durante el desarrollo de la EA. Sin embargo, se requieren más estudios que permitan confirmar estas aseveraciones.

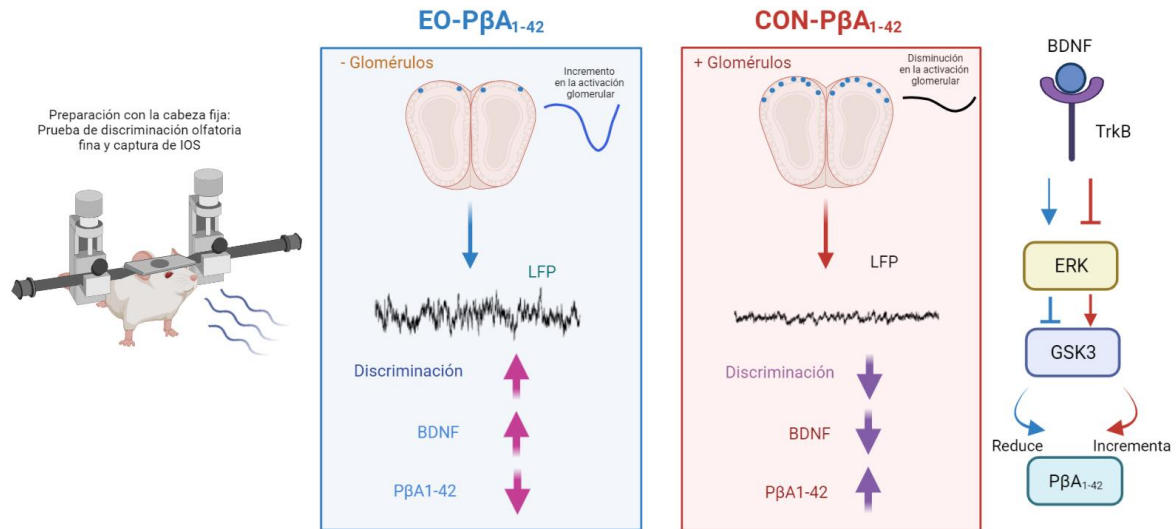


Figura 36. Modificaciones en el BOP ante el enriquecimiento olfatorio (EO) (izquierda) y en animales controles (derecha) administrados con el PβA₁₋₄₂. El grupo sometido a EO y administrado con el PβA₁₋₄₂ (EO-PβA₁₋₄₂) presenta un menor número de glomérulos activados por aromas, así como un incremento en la magnitud de su activación comparado con el grupo control administrado con el PβA₁₋₄₂ (CON-PβA₁₋₄₂). Adicionalmente, nuestros resultados muestran que los animales EO-PβA₁₋₄₂ presentan un incremento de la actividad neuronal poblacional en presencia de aromas que no se observa en los animales CON-PβA₁₋₄₂. Finalmente, mostramos que al término del protocolo de EO, se induce un incremento en la expresión de BDNF, así como una reducción en la expresión del PβA₁₋₄₂ en los animales EO-PβA₁₋₄₂ en comparación con los animales CON-PβA₁₋₄₂. Estos resultados, podrían indicar que el incremento de BDNF induce un incremento en la activación del receptor de tropomiosina relacionado a la quinasa B (TrkB), el cual activa al complejo ERK que induce, a su vez, la inhibición de la cinasa de la glucógeno sintetasa 3 (GSK3). Lo anterior, podría contribuir con una reducción en la expresión de PβA₁₋₄₂ bulbar.

CONCLUSIONES

- El EO incrementa los niveles de BDNF en el BOP sugiriendo modificaciones plásticas en las interacciones neuronales de este circuito.
- El EO modifica el patrón de activación glomerular evocado con aromas, generando mapas olfatorios que son más diferenciables en animales anestesiados y despiertos.
- El EO modifica la actividad neuronal poblacional en el BOP, que se observa en el LFP como una reducción de la potencia de las oscilaciones de baja frecuencia y un incremento de la potencia de las oscilaciones de alta frecuencia.
- El EO mejora la discriminación de aromas a una concentración baja, lo que supone un reto olfatorio para los animales. Este fenómeno es consistente con un incremento en la preferencia y la aversión innatas a los aromas.
- El EO genera un estado protector en el circuito bulbar contra los efectos deletéreos inducidos por el P β A₁₋₄₂, lo que se observa en el LFP como un incremento significativo de la potencia en presencia de aromas.
- El EO previene las alteraciones inducidas por el P β A₁₋₄₂ en la discriminación de aromas a una concentración baja.
- El EO previene las alteraciones producidas por el P β A₁₋₄₂ en la discriminación fina de aromas en una prueba de condicionamiento operante olfatorio de tipo *Go/No-Go*.
- El EO disminuye la agregación del P β A₁₋₄₂ en el circuito bulbar, lo que indica que el EO podría generar modificaciones importantes en la vía amiloidogénica involucrada con el procesamiento del P β A₁₋₄₂.
- El EO incrementa los niveles del BDNF bulbar en presencia del P β A₁₋₄₂.
- El EO previene las alteraciones producidas por el P β A₁₋₄₂ en la activación glomerular evocada con aromas a concentraciones altas y bajas. Lo anterior, se observa como un mantenimiento a largo plazo en el número, el área y la dinámica de activación glomerular.

PERSPECTIVAS

En esta tesis se determinó que el EO induce modificaciones plásticas en el circuito bulbar que lo protegen contra las alteraciones que se generan tras la administración del P β A. Sin embargo, es necesario establecer si este efecto es persistente (a largo plazo) y si se extiende a otras regiones corticales involucradas con el procesamiento de la información olfatoria. Lo anterior, permitiría esclarecer si el EO es capaz de ralentizar, aminorar o detener los efectos nocivos que se producen por el incremento del P β A en los circuitos neuronales.

Dado que la fisiopatología de la EA exhibe diversos mecanismos intracelulares y extracelulares, como se ha sugerido en animales transgénicos e inducidos, que simulan un fenotipo similar a la EA, es necesario determinar si el EO es capaz de inducir un estado protector similar a lo observado en esta tesis en dichos modelos. Lo anterior, podría situar al EO como una vía terapéutica temprana en el desarrollo de la EA en humanos.

Así mismo, los registros electrofisiológicos en animales despiertos obtenidos en esta tesis podrían ayudar a determinar si la conectividad funcional neuronal en el BOP se mantiene tras la administración del P β A durante una tarea de discriminación olfatoria operante.

En cuanto a los mecanismos moleculares que subyace el EO, es necesario determinar si el incremento en la expresión de BDNF bulbar reportado al término del periodo de EO, realmente contribuye a la reducción en los niveles del P β A intrabulbar a través de la inhibición de la GSK3 β y la activación del TrkB, como se propone en esta tesis.

Finalmente, sería pertinente evaluar las posibles modificaciones de las propiedades intrínsecas y morfológicas de las células glomerulares en el BOP, pues esto permitiría dilucidar los mecanismos relacionados con el mantenimiento de los mapas glomerulares al término del EO, aún en presencia del P β A.

REFERENCIAS

- Abraham, N. M., Egger, V., Shimshek, D. R., Renden, R., Fukunaga, I., Sprengel, R., ... & Kuner, T. (2010). Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron*, 65(3), 399-411.
- Abraham, N. M., Guerin, D., Bhaukaurally, K., & Carleton, A. (2012). Similar odor discrimination behavior in head-restrained and freely moving mice. *PLoS One*, 7(12), e51789.
- Abraham, N. M., Spors, H., Carleton, A., Margrie, T. W., Kuner, T., & Schaefer, A. T. (2004). Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron*, 44(5), 865-876.
- Abraham, N. M., Vincis, R., Lagier, S., Rodriguez, I., & Carleton, A. (2014). Long term functional plasticity of sensory inputs mediated by olfactory learning. *Elife*, 3, e02109.
- Adrian, E. D. (1942). Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *The Journal of physiology*, 100(4), 459-473.
- Adrian, E. D. (1950). The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 2(1-4), 377-388.
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J. L., Trullas, R., ... & Matute, C. (2010). Amyloid β oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell calcium*, 47(3), 264-272.
- Alcantara-Gonzalez, D., Villasana-Salazar, B., & Peña-Ortega, F. (2019). Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine-induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus*, 29(12), 1150-1164.
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS One*, 8(9), e75745.
- Ambard, M., & Martinez, D. (2009). Intense synaptic activity between mitral and granule cells leads to precise spike timing during gamma oscillations in the olfactory bulb. *BMC Neuroscience*, 10(1), 1-1.
- Amidfar, M., de Oliveira, J., Kucharska, E., Budni, J., & Kim, Y. K. (2020). The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life sciences*, 257, 118020.
- Anomal, R., de Villers-Sidani, E., Merzenich, M. M., & Panizzutti, R. (2013). Manipulation of BDNF signaling modifies the experience-dependent plasticity induced by pure tone exposure during the critical period in the primary auditory cortex. *PLoS one*, 8(5), e64208.
- Antunes, G., Simoes de Souza F.M. (2016) Olfactory receptor signaling. *Methods Cell Biol.*132:127-45.
- Arai, S., Kinouchi, H., Akabane, A., Owada, Y., Kamii, H., Kawase, M., & Yoshimoto, T. (1996). Induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the receptor trk B mRNA following middle cerebral artery occlusion in rat. *Neuroscience letters*, 211(1), 57-60.
- Arancibia, S., Silhol, M., Mouliere, F., Meffre, J., Höllinger, I., Maurice, T., & Tapia-Arancibia, L. (2008). Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced

- neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiology of disease*, 31(3), 316-326.
- Archunan G. (2018). Odorant Binding Proteins: a key player in the sense of smell. *Bioinformation*, 14(1), 36–37.
- Arenkiel, B. R., Hasegawa, H., Yi, J. J., Larsen, R. S., Wallace, M. L., Philpot, B. D., ... & Ehlers, M. D. (2011). Activity-induced remodeling of olfactory bulb microcircuits revealed by monosynaptic tracing. *PLoS one*, 6(12), e29423.
- Armato, U., Chakravarthy, B., Pacchiana, R., & Whitfield, J. F. (2013). Alzheimer's disease: An update of the roles of receptors, astrocytes and primary cilia. *International journal of molecular medicine*, 31(1), 3-10.
- Armstrong, R. A. (2009). The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 47(4), 289-299.
- Arnold, S. E., Lee, E. B., Moberg, P. J., Stutzbach, L., Kazi, H., Han, L. Y., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2010). Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Annals of neurology*, 67(4), 462–469.
- Arruda, D., Publio, R., & Roque, A. C. (2013). The periglomerular cell of the olfactory bulb and its role in controlling mitral cell spiking: a computational model. *PLoS One*, 8(2), e56148.
- Attems, J., & Jellinger, K. A. (2006). Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Clinical neuropathology*, 25(6), 265-271.
- Autry, A. E., & Monteggia, L. M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological reviews*, 64(2), 238-258.
- Aylwin, M. L., Aguilar, G. A., Flores, F. J., & Maldonado, P. E. (2009). Odorant modulation of neuronal activity and local field potential in sensory-deprived olfactory bulb. *Neuroscience*, 162(4), 1265-1278.
- Bagnoli, E., & FitzGerald, U. (2018). Mitral cells and the glucagon-like peptide 1 receptor: The sweet smell of success? *European Journal of Neuroscience*.
- Bakalyar, H. A., & Reed, R. R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 250(4986), 1403-1406.
- Bakota, L., & Brandt, R. (2016). Tau biology and tau-directed therapies for Alzheimer's disease. *Drugs*, 76(3), 301-313.
- Balleza-Tapia, H. (2014). Caracterización de la vía transduccional involucrada en los efectos de la proteína beta amiloide sobre la dinámica de las redes neuronales del hipocampo (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Querétaro.
- Barbour, J., Neuhaus, E. M., Piechura, H., Stoepel, N., Mashukova, A., Brunert, D., ... & Warscheid, B. (2008). New insight into stimulus-induced plasticity of the olfactory epithelium in *Mus musculus* by quantitative proteomics. *Journal of proteome research*, 7(4), 1594-1605.
- Barros, W., David, M., Souza, A., Silva, M., & Matos, R. (2019). Can the effects of environmental enrichment modulate BDNF expression in hippocampal plasticity? A systematic review of animal studies. *Synapse*, 73(8), e22103.
- Bath, K. G., Akins, M. R., & Lee, F. S. (2012). BDNF control of adult SVZ neurogenesis. *Developmental psychobiology*, 54(6), 578-589.
- Bekkers, J. M., & Suzuki, N. (2013). Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends in neurosciences*, 36(7), 429-438.

- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 23(4), 213-227.
- Benny, A., & Thomas, J. (2019). Essential oils as treatment strategy for Alzheimer's disease: Current and future perspectives. *Planta medica*, 85(03), 239-248.
- Bergami, M., Vignoli, B., Motori, E., Pifferi, S., Zuccaro, E., Menini, A., & Canossa, M. (2013). TrkB signaling directs the incorporation of newly generated periglomerular cells in the adult olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 33(28), 11464-11478.
- Berkowicz, D.A., Trombley, P.Q., Shepherd, G.M. (1994) Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter, *Journal of Neurophysiology* 71:2557–2561.
- Beshel, J., Kopell, N., & Kay, L. M. (2007). Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *Journal of Neuroscience*, 27(31), 8358-8365.
- Beurel, E., Grieco, SF y Joep, RS (2015). Glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3): regulación, acciones y enfermedades. *Farmacología y terapéutica*, 148, 114–131.
- Biju, K. C., Mast, T. G., & Fadool, D. A. (2008). Olfactory sensory deprivation increases the number of proBDNF-immunoreactive mitral cells in the olfactory bulb of mice. *Neuroscience letters*, 447(1), 42-47.
- Boccaccio, A., Lagostena, L., Hagen, V., & Menini, A. (2006). Fast adaptation in mouse olfactory sensory neurons does not require the activity of phosphodiesterase. *The Journal of general physiology*, 128(2), 171-184.
- Bolding, K. A., & Franks, K. M. (2017). Complementary codes for odor identity and intensity in olfactory cortex. *Elife*, 6, e22630.
- Bolding, K. A., & Franks, K. M. (2018). Recurrent cortical circuits implement concentration-invariant odor coding. *bioRxiv*, 294132.
- Bonzano, S., Bovetti, S., Fasolo, A., Peretto, P., & De Marchis, S. (2014). Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, 40(10), 3450-3457.
- Bonzano, S., Bovetti, S., Gendusa, C., Peretto, P., & De Marchis, S. (2016). Adult born olfactory bulb dopaminergic interneurons: molecular determinants and experience-dependent plasticity. *Frontiers in neuroscience*, 10, 189.
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2012). *Medical Physiology, 2e Updated Edition E-Book: with Student Consult Online Access*. Elsevier Health Sciences.
- Boto, T., & Alcorta, E. (2013). Toward identifying specific roles for G-protein β and γ subunit variants in olfactory reception. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 114.
- Bourne, J. N., & Schoppa, N. E. (2017). Three-dimensional synaptic analyses of mitral cell and external tufted cell dendrites in rat olfactory bulb glomeruli. *Journal of Comparative Neurology*, 525(3), 592-609.
- 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.
- Boyd, A. M., Sturgill, J. F., Poo, C., & Isaacson, J. S. (2012). Cortical feedback control of olfactory bulb circuits. *Neuron*, 76(6), 1161-1174.

- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239-259.
- Bruce, H. M. (1959). An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*, 184(4680), 105.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., & Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 21(2), 513-521.
- Bryche, B., Dewaele, A., Saint-Albin, A., Le Poupon Schlegel, C., Congar, P., & Meunier, N. (2019). IL-17c is involved in olfactory mucosa responses to Poly(I:C) mimicking virus presence. *Brain, behavior, and immunity*, 79, 274–283.
- Bryche, B., Baly, C., & Meunier, N. (2021). Modulation of olfactory signal detection in the olfactory epithelium: focus on the internal and external environment, and the emerging role of the immune system. *Cell and tissue research*, 384(3), 589–605.
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175-187.
- Buonviso, N., & Chaput, M. (2000). Olfactory experience decreases responsiveness of the olfactory bulb in the adult rat. *Neuroscience*, 95(2), 325-332.
- Buonviso, N., Gervais, R., Chalansonnet, M., & Chaput, M. (1998). Short-lasting exposure to one odour decreases general reactivity in the olfactory bulb of adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 10(7), 2472-2475.
- Bushdid, C., Magnasco, M. O., Vosshall, L. B., & Keller, A. (2014). Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science*, 343(6177), 1370-1372.
- Busto, G. U., Elie, J. E., Kermen, F., Garcia, S., Sacquet, J., Jourdan, F., ... & Didier, A. (2009). Expression of Zif268 in the granule cell layer of the adult mouse olfactory bulb is modulated by experience. *European Journal of Neuroscience*, 29(7), 1431-1439.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews neuroscience*, 13(6), 407.
- Cadiou, H., Aoudé, I., Tazir, B., Molinas, A., Fenech, C., Meunier, N., & Grosmaître, X. (2014). Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *Journal of Neuroscience*, 34(14), 4857-4870.
- Cao, L., Dhillia, A., Mukai, J., Blazeski, R., Lodovichi, C., Mason, C. A., & Gogos, J. A. (2007). Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition in vivo. *Current Biology*, 17(11), 911-921.
- Cao, L., Schrank, B. R., Rodriguez, S., Benz, E. G., Moulia, T. W., Rickenbacher, G. T., ... & Albers, M. W. (2012). A β alters the connectivity of olfactory neurons in the absence of amyloid plaques in vivo. *Nature communications*, 3(1), 1-10.
- Capsoni, S., Giannotta, S., & Cattaneo, A. (2002). Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12432–12437.

- Cavanaugh, S. E., Pippin, J. J., & Barnard, N. D. (2014). Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 31(3), 279-302.
- Cha, H., Kim, S., Kim, H., Kim, G., & Kwon, K. Y. (2021). Effect of intensive olfactory training for cognitive function in patients with dementia. *Geriatrics & Gerontology International*.
- Chang, R. C. C. (Ed.). (2011). *Advanced understanding of neurodegenerative diseases*. BoD—Books on Demand.
- Chapuis, J., Cohen, Y., He, X., Zhang, Z., Jin, S., Xu, F., & Wilson, D. A. (2013). Lateral entorhinal modulation of piriform cortical activity and fine odor discrimination. *Journal of Neuroscience*, 33(33), 13449-13459.
- Chaudhury, D., Manella, L., Arellanos, A., Escanilla, O., Cleland, T. A., & Linster, C. (2010). Olfactory bulb habituation to odor stimuli. *Behavioral neuroscience*, 124(4), 490.
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205.
- Chen, W. R., Xiong, W., & Shepherd, G. M. (2000). Analysis of relations between NMDA receptors and GABA release at olfactory bulb reciprocal synapses. *Neuron*, 25(3), 625-633.
- Chery, R., Gurden, H., & Martin, C. (2014). Anesthetic regimes modulate the temporal dynamics of local field potential in the mouse olfactory bulb. *Journal of neurophysiology*, 111(5), 908-917.
- Choi, R., & Goldstein, B. J. (2018). Olfactory epithelium: Cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 3(1), 35–42.
- Christen-Zaech, S., Kraftsik, R., Pillecuit, O., Kiraly, M., Martins, R., Khalili, K., & Miklossy, J. (2003). Early olfactory involvement in Alzheimer's disease. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 30(1), 20-25.
- Cornejo-Montes-de-Oca, J. M., Hernández-Soto, R., Isla, A. G., Morado-Urbina, C. E., & Peña-Ortega, F. (2018). Tolfenamic Acid Prevents Amyloid β -induced Olfactory Bulb Dysfunction In Vivo. *Current Alzheimer Research*, 15(8), 731-742.
- Costa, D. A., Cracchiolo, J. R., Bachstetter, A. D., Hughes, T. F., Bales, K. R., Paul, S. M., ... & Potter, H. (2007). Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiology of aging*, 28(6), 831-844.
- Costa, R. O., Lacor, P. N., Ferreira, I. L., Resende, R., Auberson, Y. P., Klein, W. L., ... & Pereira, C. M. (2012). Endoplasmic reticulum stress occurs downstream of GluN2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor in mature hippocampal cultures treated with amyloid- β oligomers. *Aging cell*, 11(5), 823-833.
- Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S. R., Green, P. S., Leverenz, J., Cross, D., & Gerton, B. (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Archives of neurology*, 69(1), 29–38.

- Crespo, C., Jorge, R. J., Alonso, J. R., Briñn, J. G., Arévalo, R., & Aijón, J. (1997). Segregated distribution of TH-immunoreactivity in olfactory glomeruli. *Neuroreport*, 8(9), 2311-2316.
- Crino, P. B., Martin, J. A., Hill, W. D., Greenberg, B., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (1995). Beta-Amyloid peptide and amyloid precursor proteins in olfactory mucosa of patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Down syndrome. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 104(8), 655–661.
- Croze, M. L., & Zimmer, L. (2018). Ozone Atmospheric Pollution and Alzheimer's Disease: From Epidemiological Facts to Molecular Mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(2), 503-522.
- Daumas-Meyer, V., Champeil-Potokar, G., Chaumontet, C., Dahirel, P., Papillon, C., Congar, P., & Denis, I. (2017). Fasting induces astroglial plasticity in the olfactory bulb glomeruli of rats. *Glia*, 66(4), 762-776.
- deCatanzaro, D. (2011). Blastocyst implantation is vulnerable to stress-induced rises in endogenous estrogens and also to excretions of estrogens by proximate males. *Journal of reproductive immunology*, 90(1), 14.
- Deckner, M. L., Risling, M., & Frisén, J. (1997). Apoptotic death of olfactory sensory neurons in the adult rat. *Experimental neurology*, 143(1), 132-140.
- Degano, A. L., Park, M. J., Penati, J., Li, Q., & Ronnett, G. V. (2014). MeCP2 is required for activity-dependent refinement of olfactory circuits. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 59, 63-75.
- D'Souza, R. D., Parsa, P. V., & Vijayaraghavan, S. (2013). Nicotinic receptors modulate olfactory bulb external tufted cells via an excitation-dependent inhibitory mechanism. *Journal of neurophysiology*, 110(7), 1544–1553.
- Dewan, A., Cichy, A., Zhang, J., Miguel, K., Feinstein, P., Rinberg, D., & Bozza, T. (2018). Single olfactory receptors set odor detection thresholds. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Dhawale, A. K., Hagiwara, A., Bhalla, U. S., Murthy, V. N., & Albeanu, D. F. (2010). Non-redundant odor coding by sister mitral cells revealed by light addressable glomeruli in the mouse. *Nature neuroscience*, 13(11), 1404.
- Ding, Q., Xia, W., Liu, J. C., Yang, J. Y., Lee, D. F., Xia, J., ... & Bargou, R. C. (2005). Erk associates with and primes GSK-3 β for its inactivation resulting in upregulation of β -catenin. *Molecular cell*, 19(2), 159-170.
- Djordjevic, J., Jones-Gotman, M., De Sousa, K., & Chertkow, H. (2008). Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 29(5), 693-706.
- Dong, H. W., & Ennis, M. (2013). Activation of group I metabotropic glutamate receptors enhances persistent sodium current and rhythmic bursting in main olfactory bulb external tufted cells. *Journal of neurophysiology*, 111(3), 641-647.
- Doty, R. L. (2010). The great pheromone myth: mammalian pheromones, audiomones, visuomones and snarks.
- Doty, R. L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 8(6), 329.

- Doty, R. L., Reyes, P. F., & Gregor, T. (1987). Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain research bulletin*, 18(5), 597-600.
- Doty, R. L., Shaman, P., Applebaum, S. L., Giberson, R., Siksorski, L., & Rosenberg, L. (1984). Smell identification ability: changes with age. *Science*, 226(4681), 1441-1443.
- Durrant, D. M., Ghosh, S., & Klein, R. S. (2016). The Olfactory Bulb: An Immunosensory Effector Organ during Neurotropic Viral Infections. *ACS chemical neuroscience*, 7(4), 464–469.
- Eckman, C. B., Mehta, N. D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., ... & Refolo, L. M. (1997). A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A β 42 (43). *Human molecular genetics*, 6(12), 2087-2089.
- Economo, M. N., Hansen, K. R., & Wachowiak, M. (2016). Control of mitral/tufted cell output by selective inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Neuron*, 91(2), 397-411.
- El Haj, M., Gandolphe, M. C., Gallouj, K., Kapogiannis, D., & Antoine, P. (2018). From nose to memory: The involuntary nature of odor-evoked autobiographical memories in Alzheimer's disease. *Chemical Senses*, 43(1), 27-34.
- El-Agnaf, O. M., Mahil, D. S., Patel, B. P., & Austen, B. M. (2000). Oligomerization and toxicity of β -amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(3), 1003-1007.
- Engels, M., Hillebrand, A., Van der Flier, W. M., Stam, C. J., Scheltens, P., & Van Straaten, E. C. (2016). Slowing of hippocampal activity correlates with cognitive decline in early onset Alzheimer's disease. An MEG study with virtual electrodes. *Frontiers in human neuroscience*, 10, 238.
- Escanilla, O., Mandairon, N., & Linster, C. (2008). Odor-reward learning and enrichment have similar effects on odor perception. *Physiology & behavior*, 94(4), 621-626.
- Etter, G., van der Veldt, S., Manseau, F., Zarrinkoub, I., Trillaud-Doppia, E., & Williams, S. (2019). Optogenetic gamma stimulation rescues memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature communications*, 10(1), 1-11.
- Fahnestock, M. (2011). Brain-derived neurotrophic factor: the link between amyloid- β and memory loss. *Future Neurology*, 6(5), 627-639.
- Farmer, J., Zhao, X. V., Van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., & Christie, B. R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague–Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 124(1), 71-79.
- Felten, D. L., O'Banion, M. K., & Maida, M. S. (2015). *Netter's atlas of neuroscience*. Elsevier Health Sciences.
- Ferreira, A. C., & Castellano, J. M. (2019). Leaving the Lights on Using Gamma Entrainment to Protect against Neurodegeneration. *Neuron*, 102(5), 901-902.
- Firestein, S., & Zufall, F. (1994). The cyclic nucleotide gated channel of olfactory receptor neurons. In *Seminars in cell biology*. 5 (1), 39-46. Academic Press.

- FitzGerald, L., Okada, Y., Kalinoski, D. L., DellaCorte, C., Brand, J. G., Teeter, J. H., & Restrepo, D. (1994). Role of Inositol Triphosphate (IP 3) in Olfactory Transduction. In *Olfaction and Taste XI* (pp. 135-138). Springer, Tokyo.
- Fleming, G., Wright, B. A., & Wilson, D. A. (2019). The Value of homework: exposure to odors in the home cage enhances odor-discrimination learning in mice. *Chemical senses*, 44(2), 135-143.
- Fletcher, M. L., Masurkar, A. V., Xing, J., Imamura, F., Xiong, W., Nagayama, S., ... & Chen, W. R. (2009). Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Journal of neurophysiology*, 102(2), 817-830.
- Flores-Martínez, E., & Peña-Ortega, F. (2017). Amyloid β peptide-induced changes in prefrontal cortex activity and its response to hippocampal input. *International journal of peptides*, 2017.
- Franklin, K. B., & Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates, compact. The coronal plates and diagrams*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Freland, L., & Beaulieu, J. M. (2012). Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5, 14.
- Frick, K. M., Stearns, N. A., Pan, J. Y., & Berger-Sweeney, J. (2003). Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learning & Memory*, 10(3), 187-198.
- Friedman, D., & Stowbridge, B. W. (2003). Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *Journal of neurophysiology*, 89(5), 2601-2610.
- Fuentes, R. A., Aguilar, M. I., Aylwin, M. L., & Maldonado, P. E. (2008). Neuronal activity of mitral-tufted cells in awake rats during passive and active odorant stimulation. *Journal of neurophysiology*, 100(1), 422-430.
- Fujii, M., Hatakeyama, R., Fukuoka, Y., Yamamoto, T., Sasaki, R., Moriya, M., ... & Sasaki, H. (2008). Lavender aroma therapy for behavioral and psychological symptoms in dementia patients. *Geriatrics & gerontology international*, 8(2), 136-138.
- Fukunaga, I., Berning, M., Kollo, M., Schmaltz, A., & Schaefer, A. T. (2012). Two distinct channels of olfactory bulb output. *Neuron*, 75(2), 320-329.
- García-Ayllón, M. S., Silveyra, M. X., & Sáez-Valero, J. (2008). Association between acetylcholinesterase and β -amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), 209-215.
- Gallowitsch-Puerta, M., & Tracey, K. J. (2005). Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1062, 209-219.
- Gautam, S. H., & Verhagen, J. V. (2012). Retronasal odor representations in the dorsal olfactory bulb of rats. *Journal of Neuroscience*, 32(23), 7949-7959.
- Geramita, M., & Urban, N. N. (2016). Postnatal odor exposure increases the strength of interglomerular lateral inhibition onto olfactory bulb tufted cells. *Journal of Neuroscience*, 36(49), 12321-12327.
- German, D. C., Ng, M. C., Liang, C. L., McMahon, A., & Iacopino, A. M. (1997). Calbindin-D28k in nerve cell nuclei. *Neuroscience*, 81(3), 735-743.

- Gillespie, D. C. (2013). Sensory Organ Disorders (Retina, Auditory, Olfactory, Gustatory). In *Neural Circuit Development and Function in the Brain*. 731-759.
- Giuffrida, M. L., Copani, A., & Rizzarelli, E. (2018). A promising connection between BDNF and Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*, 10(8), 1791.
- Glachet, O., & El Haj, M. (2019). Emotional and phenomenological properties of odor-evoked autobiographical memories in Alzheimer's disease. *Brain sciences*, 9(6), 135.
- Glachet, O., & El Haj, M. (2020). Effects of olfactory stimulation on past and future thinking in Alzheimer's disease. *Chemical senses*, 45(4), 313-320.
- Glachet, O., Gandolphe, M. C., Gallouj, K., Antoine, P., & El Haj, M. (2018). Effects of olfactory stimulation on autobiographical memory in Alzheimer's disease. *Geriatric et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement*, 16(3), 311-320.
- Glachet, O., Moustafa, A. A., Gallouj, K., & El Haj, M. (2019). Smell your memories: Positive effect of odor exposure on recent and remote autobiographical memories in Alzheimer's disease. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, 41(6), 555-564.
- Glezer, I., & Malnic, B. (2019). Olfactory receptor function. *Handbook of clinical neurology*, 164, 67-78.
- Goate, A., & Hardy, J. (2012). Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations. *Journal of neurochemistry*, 120, 3-8.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., ... & Mant, R. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704.
- Goldberg, E. M., Wang, K., Goldberg, J., & Aliani, M. (2018). Factors affecting the ortho-and retronasal perception of flavors: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(6), 913-923.
- Gottfried, J. A. (2010). Central mechanisms of odour object perception. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(9), 628.
- Gourévitch, B., Kay, L. M., & Martin, C. (2010). Directional coupling from the olfactory bulb to the hippocampus during a go/no-go odor discrimination task. *Journal of neurophysiology*, 103(5), 2633-2641.
- Goutagny, R., Gu, N., Cavanagh, C., Jackson, J., Chabot, J. G., Quirion, R., ... & Williams, S. (2013). Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A β overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 37(12), 1896-1902.
- Grabowski, T. J., Cho, H. S., Vonsattel, J. P. G., Rebeck, G. W., & Greenberg, S. M. (2001). Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 49(6), 697-705.
- Griff, Edwin R., Mariam Mafhouz, and Michel A. Chaput. "Comparison of identified mitral and tufted cells in freely breathing rats: II. Odor-evoked responses." *Chemical senses* 33.9 (2008): 793-802.
- Grishagin, I. V. (2015). Automatic cell counting with ImageJ. *Analytical biochemistry*, 473, 63-65.

- Grosmaître, X., Vassalli, A., Mombaerts, P., Shepherd, G. M., & Ma, M. (2006). Odorant responses of olfactory sensory neurons expressing the odorant receptor MOR23: a patch clamp analysis in gene-targeted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1970-1975.
- 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.
- Guerreiro, R., & Bras, J. (2015). The age factor in Alzheimer's disease. *Genome medicine*, 7, 106. doi:10.1186/s13073-015-0232-5.
- Guo, Z. V., Hires, S. A., Li, N., O'Connor, D. H., Komiyama, T., Ophir, E., ... & Peron, S. (2014). Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *PLoS one*, 9(2), e88678.
- Gutiérrez-Lerma, A. I., Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms in vitro. *International Journal of Peptides*, 2013.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(2), 101.
- Haehner, A., Tosch, C., Wolz, M., Klingelhoefer, L., Fauser, M., Storch, A., ... & Hummel, T. (2013). Olfactory training in patients with Parkinson's disease. *PLoS one*, 8(4), e61680.
- Hajos, M., Megerian, J. T., Hempel, E., Vaughan, B., & Malchano, Z. (2021). Reduced brain atrophy by gamma sensory stimulation in Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's & Dementia*, 17, e057849.
- Han, Z., Chen, W., Chen, X., Zhang, K., Tong, C., Zhang, X., ... & Liang, Z. (2019). Awake and behaving mouse fMRI during Go/No-Go task. *Neuroimage*, 188, 733-742.
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology*, 217(2), 459-472.
- Hardy, D., Malvaut, S., Breton-Provencher, V., & Saghatelian, A. (2018). The role of calretinin-expressing granule cells in olfactory bulb functions and odor behavior. *Scientific reports*, 8(1), 1-17.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184.
- Hashimoto, R., Takei, N., Shimazu, K., Christ, L., Lu, B., & Chuang, D. M. (2002). Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology*, 43(7), 1173-1179.
- Hashimoto, Y., Kaneko, Y., Tsukamoto, E., Frankowski, H., Kouyama, K., Kita, Y., ... & Nishimoto, I. (2004). Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid- β peptides via p75NTR/PLAIDD. *Journal of neurochemistry*, 90(3), 549-558.
- Hawkes, C. (2003). Olfaction in neurodegenerative disorder. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 18(4), 364-372.
- Hawkes, C. H., & Doty, R. L. (2009). *The neurology of olfaction*. Cambridge University Press.

- Hawkes, C. H., Shephard, B. C., & Daniel, S. E. (1997). Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 62(5), 436-446.
- He, B., Zheng, M., Liu, Q., Shi, Z., Long, S., Lu, X., ... & Yao, X. (2018). Injected amyloid beta in the olfactory bulb transfers to other brain regions via neural connections in mice. *Molecular neurobiology*, 55(2), 1703-1713.
- Hellier, J. L., Arevalo, N. L., Smith, L., Xiong, K. N., & Restrepo, D. (2012). α 7-Nicotinic acetylcholine receptor: role in early odor learning preference in mice. *PloS one*, 7(4), e35251.
- Hellier, J. L., Arevalo, N. L., Blatner, M. J., Dang, A. K., Clevenger, A. C., Adams, C. E., & Restrepo, D. (2010). Olfactory discrimination varies in mice with different levels of α 7-nicotinic acetylcholine receptor expression. *Brain research*, 1358, 140–150.
- Hemonnot, A. L., Hua, J., Ulmann, L., & Hirbec, H. (2019). Microglia in Alzheimer disease: well-known targets and new opportunities. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 233.
- Heo, C., Park, H., Kim, Y. T., Baeg, E., Kim, Y. H., Kim, S. G., & Suh, M. (2016). A soft, transparent, freely accessible cranial window for chronic imaging and electrophysiology. *Scientific reports*, 6, 27818.
- Hermey, G. (2015). Intracellular sorting pathways of the amyloid precursor protein provide novel neuroprotective strategies. *Neural regeneration research*, 10(11), 1727.
- Hernández-Soto R., Peña-Ortega JF. (2018) Influencia del enriquecimiento olfatorio sobre la activación del circuito bulbar in vivo. 1-105.
- Hernández-Soto, R., Pimentel-Farfan, K., Adan-Castro, E., Clapp, C., & Peña-Ortega F. (2022) Main olfactory bulb reconfiguration by prolonged passive olfactory experience correlates with increased brain-derived neurotrophic factor and improved innate olfaction. *European Journal of Neuroscience*.
- Hernández-Soto, R., Rojas-García, K. D., & Peña-Ortega, F. (2019). Sudden Intrabulbar Amyloid Increase Simultaneously Disrupts Olfactory Bulb Oscillations and Odor Detection. *Neural plasticity*, 2019.
- Hernández-Soto, R., Villasana-Salazar, B., Pinedo-Vargas, L., & Peña-Ortega, F. (2021). Chronic intermittent hypoxia alters main olfactory bulb activity and olfaction. *Experimental Neurology*, 113653.
- Herreras, O. (2016). Local field potentials: myths and misunderstandings. *Frontiers in neural circuits*, 10, 101.
- Hinds, J. W., & Hinds, P. L. (1976). Synapse formation in the mouse olfactory bulb Quantitative studies. *Journal of Comparative Neurology*, 169(1), 15-40.
- Holbrook, E. H., Wu, E., Curry, W. T., Lin, D. T., & Schwob, J. E. (2011). Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *The Laryngoscope*, 121(8), 1687-1701.
- Hoover, K. C. (2010). Smell with inspiration: the evolutionary significance of olfaction. *American journal of physical anthropology*, 143(S51), 63-74.
- Hummel, T., Landis, B. N., & Hüttenbrink, K. B. (2011). Smell and taste disorders. *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*, 10.

- Hüttenbrink, K. B., Hummel, T., Berg, D., Gasser, T., & Hähner, A. (2013). Olfactory dysfunction: common in later life and early warning of neurodegenerative disease. *Deutsches Ärzteblatt International*, 110(1-2), 1.
- Hu, J., Akama, K. T., Krafft, G. A., Chromy, B. A., & Van Eldik, L. J. (1998). Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain research*, 785(2), 195–206.
- Iaccarino, H. F., Singer, A. C., Martorell, A. J., Rudenko, A., Gao, F., Gillingham, T. Z., ... & Adaikkan, C. (2016). Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature*, 540(7632), 230-235.
- Ickes, B. R., Pham, T. M., Sanders, L. A., Albeck, D. S., Mohammed, A. H., & Granholm, A. C. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental neurology*, 164(1), 45-52.
- Igarashi, K. M., Ieki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., ... & Mori, K. (2012). Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *Journal of Neuroscience*, 32(23), 7970-7985.
- Ihara, S., & Touhara, K. (2018). G Protein-Coupled Receptor Kinase 3 (GRK3) in Olfaction. In *Olfactory Receptors* (pp. 33-41). Humana Press, New York, NY.
- Imai, T. (2014, November). Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 35, pp. 180-188). Academic Press.
- Imamura, F., & Greer, C. A. (2009). Dendritic branching of olfactory bulb mitral and tufted cells: regulation by TrkB. *PLoS One*, 4(8), e6729.
- Inoue, N., Nishizumi, H., Ooyama, R., Mogi, K., Nishimori, K., Kikusui, T., & Sakano, H. (2021). The olfactory critical period is determined by activity dependent Sema7A/PlxnC1 signaling within glomeruli. *Elife*, 10, e65078.
- Ishman, S. L., Loehrl, T. A., & Smith, M. M. (2003). Calcification of the olfactory bulbs in three patients with hyposmia. *American journal of neuroradiology*, 24(10), 2097-2101.
- Isla, A. G., Vázquez-Cuevas, F. G., & Peña-Ortega, F. (2016). Exercise prevents amyloid- β -induced hippocampal network disruption by inhibiting GSK3 β activation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 52(1), 333-343.
- Ismail, N. A., Leong Abdullah, M. F. I., Hami, R., & Ahmad Yusof, H. (2020). A narrative review of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Growth Factors*, 38(3-4), 210-225.
- Jacobs, G. H. (2009). Evolution of colour vision in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1531), 2957-2967.
- Jacobson, G. A., Rupprecht, P., & Friedrich, R. W. (2018). Experience-dependent plasticity of odor representations in the telencephalon of zebrafish. *Current Biology*, 28(1), 1-14.
- Jafek, B. W., Murrow, B., & Linschoten, M. (2000). Evaluation and treatment of anosmia. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 8(1), 63-67.

- James, T. F., Nenov, M. N., Wildburger, N. C., Lichti, C. F., Luisi, J., Vergara, F., ... & Labate, D. (2015). The Nav1. 2 channel is regulated by GSK3. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(4), 832-844.
- Jeong, J. (2004). EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease. *Clinical neurophysiology*, 115(7), 1490-1505.
- Jiao, Y., Zhang, Z., Zhang, C., Wang, X., Sakata, K., Lu, B., & Sun, Q. Q. (2011). A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29), 12131-12136.
- Jimbo, D., Kimura, Y., Taniguchi, M., Inoue, M., & Urakami, K. (2009). Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*, 9(4), 173-179.
- Johnson, B. A., 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. *Journal of Comparative Neurology*, 518(9), 1542-1555.
- Jones, D. T., & Reed, R. R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, 244(4906), 790-795.
- Jönsson, F. U., Møller, P., & Olsson, M. J. (2011). Olfactory working memory: effects of verbalization on the 2-back task. *Memory & cognition*, 39(6), 1023-1032.
- Juilfs, D. M., Fülle, H. J., Zhao, A. Z., Houslay, M. D., Garbers, D. L., & Beavo, J. A. (1997). A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3388-3395.
- Karisetty, B. C., Bhatnagar, A., Armour, E. M., Beaver, M., Zhang, H., & Elefant, F. (2020). Amyloid- β peptide impact on synaptic function and neuroepigenetic gene control reveal new therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 220.
- Kasa, P., Hlavati, I., Dobo, E., Wolff, A., Joo, F., & Wolff, J. R. (1995). Synaptic and non-synaptic cholinergic innervation of the various types of neurons in the main olfactory bulb of adult rat: immunocytochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 67(3), 667-677.
- Kasowski, H. J., Kim, H., & Greer, C. A. (1999). Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *Journal of Comparative Neurology*, 407(2), 261-274.
- Katada, S., Hirokawa, T., Oka, Y., Suwa, M., & Touhara, K. (2005). Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *Journal of Neuroscience*, 25(7), 1806-1815.
- Kathpalia, P., Nag, T. C., Chattopadhyay, P., Sharma, A., Bhat, M. A., Roy, T. S., & Wadhwa, S. (2019). In ovo sound stimulation mediated regulation of BDNF in the auditory cortex and hippocampus of neonatal chicks. *Neuroscience*, 408, 293-307.
- Kato, H. K., Chu, M. W., Isaacson, J. S., & Komiyama, T. (2012). Dynamic sensory representations in the olfactory bulb: modulation by wakefulness and experience. *Neuron*, 76(5), 962-975.

- Kato, Y., Kaneko, N., Sawada, M., Ito, K., Arakawa, S., Murakami, S., & Sawamoto, K. (2012). A subtype-specific critical period for neurogenesis in the postnatal development of mouse olfactory glomeruli. *PLoS One*, 7(11), e48431.
- Kay, L. M. (2003). Two species of gamma oscillations in the olfactory bulb: dependence on behavioral state and synaptic interactions. *Journal of integrative neuroscience*, 2(01), 31-44
- Kay, L. M. (2005). Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(10), 3863-3868.
- Kay, L. M. (2014). Local Field Potential in Olfaction. *Encyclopedia of Computational Neuroscience*, 1–7.
- Kay, L. M. (2015). Olfactory system oscillations across phyla. *Current opinion in neurobiology*, 31, 141-147.
- Kay, L. M., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Líbano, D., & Kopell, N. (2009). Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends in neurosciences*, 32(4), 207-214.
- Kazlauckas, V., Pagnussat, N., Mioranza, S., Kalinine, E., Nunes, F., Pettenuzzo, L., ... & Lara, D. R. (2011). Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiology & behavior*, 102(5), 475-480.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493.
- Kepecs, A., Uchida, N., & Mainen, Z. F. (2005). The sniff as a unit of olfactory processing. *Chemical senses*, 31(2), 167-179.
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), pdb-prot102269.
- Kim, B. Y., Park, J. Y., Kim, E. J., Kim, B. G., Kim, S. W., & Kim, S. W. (2019). The neuroplastic effect of olfactory training to the recovery of olfactory system in mouse model. In *International forum of allergy & rhinology* (Vol. 9, No. 7, pp. 715-723).
- Kitchigina, V. F. (2018). Alterations of coherent theta and gamma network oscillations as an early biomarker of temporal lobe epilepsy and Alzheimer's disease. *Frontiers in integrative neuroscience*, 12, 36.
- Klein, A. S., Donoso, J. R., Kempter, R., Schmitz, D., & Beed, P. (2016). Early cortical changes in gamma oscillations in Alzheimer's disease. *Frontiers in systems neuroscience*, 10, 83.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., ... & Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 66(2), 395-403.
- Knight, T. W., Lindsay, D. R., & Oldham, C. M. (1975). The influence of rams on the fertility of the ewe. *J. Reprod. Fertil*, 43, 377-378.
- Knudsen, K., Flensburg Damholdt, M., Mouridsen, K., & Borghammer, P. (2015). Olfactory function in Parkinson's Disease—effects of training. *Acta Neurologica Scandinavica*, 132(6), 395-400.
- Knusel, B., Beck, K. D., Winslow, J. W., Rosenthal, A., Burton, L. E., Widmer, H. R., ... & Hefti, F. (1992). Brain-derived neurotrophic factor administration protects basal forebrain cholinergic but not nigral dopaminergic neurons from

- degenerative changes after axotomy in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience*, 12(11), 4391-4402.
- Kosaka, K., & Kosaka, T. (2005). Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anatomical science international*, 80(2), 80-90.
- Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y., & Kosaka, T. (1998). How simple is the organization of the olfactory glomerulus? the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neuroscience research*, 30(2), 101-110.
- Kotecha, A. M., Corrêa, A. D., Fisher, K. M., & Rushworth, J. V. (2018). Olfactory dysfunction as a global biomarker for sniffing out Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Biosensors*, 8(2), 41.
- Kotecha, A., Corrêa, A., Fisher, K., & Rushworth, J. (2018). Olfactory dysfunction as a global biomarker for sniffing out Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Biosensors*, 8(2), 41.
- Kovács, T. (2004). Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. *Ageing research reviews*, 3(2), 215-232.
- Kringelbach, M. L. (2004). Food for thought: hedonic experience beyond homeostasis in the human brain. *Neuroscience*, 126(4), 807-819.
- Kurahashi, T., & Menini, A. (1997). Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature*, 385(6618), 725-729.
- Kurahashi, T., & Yau, K. W. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature*, 363(6424), 71-74.
- Kurudenkandy, F. R., Zilberter, M., Biverstål, H., Presto, J., Honcharenko, D., Strömberg, R., ... & Fisahn, A. (2014). Amyloid- β -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *Journal of Neuroscience*, 34(34), 11416-11425.
- Lamb, B. A., Bardel, K. A., Kulnane, L. S., Anderson, J. J., Holtz, G., Wagner, S. L., ... & Hoeger, E. J. (1999). Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice. *Nature neuroscience*, 2(8), 695.
- Lamb, B. T., Call, L. M., Slunt, H. H., Bardel, K. A., Lawler, A. M., Eckman, C. B., ... & Sisodia, S. S. (1997). Altered metabolism of familial Alzheimer's disease-linked amyloid precursor protein variants in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Human molecular genetics*, 6(9), 1535-1541.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., ... & Wals, P. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6448-6453.
- Lampinen, Riikka, Veronika Górová, Simone Avesani, Jeffrey R. Liddell, Elina Penttilä, Táňa Závodná, Zdeněk Krejčík, Juha-Matti Lehtola, Toni Saari, Juho Kalapudas, Sanna Hannonen, Heikki Löppönen, Jan Topinka, Anne M. Koivisto, Anthony R. White, Rosalba Giugno, and Katja M. Kanninen. (2022). Biometal Dyshomeostasis in Olfactory Mucosa of Alzheimer's Disease Patients. *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 8: 4123.

- Larriva-Sahd, J. A. (2010). Chandelier and interfascicular neurons in the adult mouse piriform cortex. *Frontiers in neuroanatomy*, 4, 148.
- Laske, C., Stransky, E., Leyhe, T., Eschweiler, G. W., Maetzler, W., Wittorf, A., ... & Schott, K. (2007). BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *Journal of psychiatric research*, 41(5), 387-394.
- Laurent, G., & Davidowitz, H. (1994). Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. *Science*, 265(5180), 1872-1875.
- Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Net, P., Lazarovits, J., Horn, S., ... & Lancet, D. (1991). Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature*, 349(6312), 790.
- 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.
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y. P., Hairston, I. S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V. M. Y., ... & Sisodia, S. S. (2005). Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 120(5), 701-713.
- Lemere C. A. (2009). Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Progress in brain research*, 175, 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17506-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17506-4)
- Lepousez, G., & Lledo, P. M. (2013). Odor discrimination requires proper olfactory fast oscillations in awake mice. *Neuron*, 80(4), 1010-1024.
- Levy, E., Carman, M. D., Fernandez-Madrid, I. J., Power, M. D., Lieberburg, I., van Duinen, S. G., ... & Frangione, B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 248(4959), 1124-1126.
- Lecoq, J., Tiret, P., & Charpak, S. (2009). Peripheral adaptation codes for high odor concentration in glomeruli. *Journal of Neuroscience*, 29(10), 3067-3072.
- Li, Y., Liu, L., Kang, J., Sheng, J. G., Barger, S. W., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2000). Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(1), 149–155.
- Li, A., Zhang, L., Liu, M., Gong, L., Liu, Q., & Xu, F. (2012). Effects of different anesthetics on oscillations in the rat olfactory bulb. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(4), 458-463.
- Li, F., Ponissery-Saidu, S., Yee, K. K., Wang, H., Chen, M. L., Iguchi, N., Zhang, G., Jiang, P., Reisert, J., & Huang, L. (2013). Heterotrimeric G protein subunit G γ 13 is critical to olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(18), 7975–7984.
- Li, R. C., Ben-Chaim, Y., Yau, K. W., & Lin, C. C. (2016). Cyclic-nucleotide-gated cation current and Ca $^{2+}$ -activated Cl current elicited by odorant in vertebrate olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11078-11087.
- Li, R. C., Lin, C. C., Ren, X., Wu, J. S., Molday, L. L., Molday, R. S., & Yau, K. W. (2018). Ca $^{2+}$ -activated Cl current predominates in threshold response of

- mouse olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 5570-5575.
- Liao, K., Liu, D., & Zhu, L. Q. (2012). Enriched odor exposure decreases tau phosphorylation in the rat hippocampus and cortex. *Neuroscience Letters*, 507(1), 22-26.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., Bengzon, J., Elme, E., & Kokaia, M. (1994). Neurotrophins and brain insults. *Trends in neurosciences*, 17(11), 490-496.
- Ling, S., Li, W., Li, S., Shen, L., Wang, J., Wu, X., ... & Ye, X. (2019). Impairment of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb of APP/PS1 mice. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 2.
- Liu, A., Savya, S., & Urban, N. N. (2016). Early odorant exposure increases the number of mitral and tufted cells associated with a single glomerulus. *Journal of Neuroscience*, 36(46), 11646-11653.
- Liu, P. Z., & Nusslock, R. (2018). Exercise-mediated neurogenesis in the hippocampus via BDNF. *Frontiers in neuroscience*, 12, 52.
- Liu, Q., Li, A., Gong, L., Zhang, L., Wu, N., & Xu, F. (2013). Decreased coherence between the two olfactory bulbs in Alzheimer's disease model mice. *Neuroscience letters*, 545, 81-85.
- Livneh, Y., Adam, Y., & Mizrahi, A. (2014). Odor processing by adult-born neurons. *Neuron*, 81(5), 1097-1110.
- Losacco, J., Ramirez-Gordillo, D., Gilmer, J., & Restrepo, D. (2020). Learning improves decoding of odor identity with phase-referenced oscillations in the olfactory bulb. *Elife*, 9, e52583.
- Lombardo, S., & Maskos, U. (2015). Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*, 96(Pt B), 255-262.
- Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learning & memory*, 10(2), 86-98.
- Lu, B., Nagappan, G., & Lu, Y. B. D. N. F. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Neurotrophic factors*, 223-250.
- Luo, M., Fee, M. S., & Katz, L. C. (2003). Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science*, 299(5610), 1196-1201.
- Ly, P. T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., ... & Song, W. (2012). Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *The Journal of clinical investigation*, 123(1).
- Mackay-Sim, A. (2012). Olfactory mucosa: neural stem and progenitor cells for nervous system repair and cell models of brain disease. In *Progenitor and Stem Cell Technologies and Therapies* (pp. 309-330). Woodhead Publishing.
- Mai, J. K., Majtanik, M., & Paxinos, G. (2015). *Atlas of the human brain*. Academic Press.
- Mandairon N, Sacquet J, Jourdan F, Didier A (2006a). Long-term fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: influences of olfactory deprivation.
- Mandairon, N., & Didier, A. (2009). Neuromodulation in the main olfactory bulb. *Encyclopedia of Neuroscience*, 2743-2746.
- Mandairon, N., Didier, A., & Linster, C. (2008). Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb

- correlated with perception. *Neurobiology of learning and memory*, 90(1), 178-184.
- Mandaïron, N., Kuczewski, N., Kermen, F., Forest, J., Midroit, M., Richard, M., ... & Didier, A. (2018). Opposite regulation of inhibition by adult-born granule cells during implicit versus explicit olfactory learning. *Elife*, 7, e34976.
- Mandaïron, N., Stack, C., Kiselycznyk, C., & Linster, C. (2006b). Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behavioral neuroscience*, 120(1), 173.
- Maresh, A., Gil, D. R., Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2008). Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb—implications for odor processing. *PloS one*, 3(7), e2640.
- Marigliano, V., Gualdi, G., Servello, A., Marigliano, B., Volpe, L. D., Fioretti, A., ... & Fusetti, M. (2014). Olfactory deficit and hippocampal volume loss for early diagnosis of Alzheimer disease: a pilot study. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 28(2), 194-197.
- Martel, K. L., & Baum, M. J. (2007). Sexually dimorphic activation of the accessory, but not the main, olfactory bulb in mice by urinary volatiles. *European Journal of Neuroscience*, 26(2), 463-475.
- 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.
- Martorell, A. J., Paulson, A. L., Suk, H. J., Abdurrob, F., Drummond, G. T., Guan, W., ... & Tsai, L. H. (2019). Multi-sensory gamma stimulation ameliorates Alzheimer's-associated pathology and improves cognition. *Cell*, 177(2), 256-271.
- Mast, T. G., & Fadool, D. A. (2012). Mature and precursor brain-derived neurotrophic factor have individual roles in the mouse olfactory bulb. *PLoS One*, 7(2), e31978.
- Masurkar, A. V., & Devanand, D. P. (2014). Olfactory dysfunction in the elderly: basic circuitry and alterations with normal aging and Alzheimer's disease. *Current geriatrics reports*, 3(2), 91-100.
- McDole, B., Isgor, C., Pare, C., & Guthrie, K. (2015). BDNF over-expression increases olfactory bulb granule cell dendritic spine density in vivo. *Neuroscience*, 304, 146-160.
- McGann, J. P. (2017). Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science*, 356(6338), eaam7263.
- McLean, J. H., Darby-King, A., & Bonnell, W. S. (2001). Neonatal olfactory sensory deprivation decreases BDNF in the olfactory bulb of the rat. *Developmental Brain Research*, 128(1), 17-24.
- McNamara, A. M., Magidson, P. D., Linster, C., Wilson, D. A., & Cleland, T. A. (2008). Distinct neural mechanisms mediate olfactory memory formation at different timescales. *Learning & Memory*, 15(3), 117-125.

- Meierhenrich, U. J., Golebiowski, J., Fernandez, X., & Cabrol-Bass, D. (2004). The molecular basis of olfactory chemoreception. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(47), 6410-6412.
- Meisami, E., Mikhail, L., Baim, D., & Bhatnagar, K. P. (1998). Human Olfactory Bulb: Aging of Glomeruli and Mitral Cells and a Search for the Accessory Olfactory Bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 708-715.
- Melani, R., Chelini, G., Cenni, M. C., & Berardi, N. (2017). Enriched environment effects on remote object recognition memory. *Neuroscience*, 352, 296-305.
- Migliore, M., Hines, M. L., & Shepherd, G. M. (2005). The role of distal dendritic gap junctions in synchronization of mitral cell axonal output. *Journal of computational neuroscience*, 18(2), 151-161.
- Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B., & Bekinschtein, P. (2019). Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 363.
- Mitroshina, E. V., Yarkov, R. S., Mishchenko, T. A., Krut, V. G., Gavrish, M. S., Epifanova, E. A., ... & Vedunova, M. V. (2020). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Preserves the Functional Integrity of Neural Networks in the β -Amyloidopathy Model in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 582.
- Miyazawa, M., Hideyukitougo, & Ishihara, M. (2001). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from *Citrus paradisi*. *Natural product letters*, 15(3), 205-210.
- Miyazawa, M., Watanabe, H., Umemoto, K., & Kameoka, H. (1998). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3431-3434.
- Mohrhardt, J., Nagel, M., Fleck, D., Ben-Shaul, Y., & Spehr, M. (2018). Signal detection and coding in the accessory olfactory system. *Chemical senses*.
- Mombaerts, P. (2004). Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor–one neuron hypothesis revisited. *Current opinion in neurobiology*, 14(1), 31-36.
- Monjaraz-Fuentes, F., Millán-Adalco, D., Palomero-Rivero, M., Hudson, R., & Drucker-Colín, R. (2017). Recovery of glomerular morphology in the olfactory bulb of young mice after disruption caused by continuous odorant exposure. *Brain research*, 1670, 6-13.
- Moran, D. T., Rowley, J. C., Jafek, B. W., & Lovell, M. A. (1982). The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology*, 11(5), 721-746.
- Moreno, M. M., Bath, K., Kuczewski, N., Sacquet, J., Didier, A., & Mandairon, N. (2012). Action of the noradrenergic system on adult-born cells is required for olfactory learning in mice. *Journal of Neuroscience*, 32(11), 3748-3758.
- Moreno, M. M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., & Mandairon, N. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17980-17985.
- Morgan, C. D., & Murphy, C. (2002). Olfactory event-related potentials in Alzheimer's disease. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 8(6), 753-763.

- Mori, K., & Sakano, H. (2011). How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annual review of neuroscience*, 34, 467-499.
- Mori, K., Nagao, H., & Yoshihara, Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*, 286(5440), 711-715.
- Mui, A. M., Yang, V., Aung, M. H., Fu, J., Adekunle, A. N., Prall, B. C., ... & Pardue, M. T. (2018). Daily visual stimulation in the critical period enhances multiple aspects of vision through BDNF-mediated pathways in the mouse retina. *PLoS one*, 13(2), e0192435.
- Mukhin, V. N., Pavlov, K. I., & Klimenko, V. M. (2017). Mechanisms of Neuron Loss in Alzheimer's Disease. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 47(5), 508-516.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., & Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nature genetics*, 1(5), 345.
- Murphy, C. (2019). Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(1), 11-24.
- Muroyama, Y., Baba, A., Kitagawa, M., & Saito, T. (2016). Olfactory Sensory Neurons Control Dendritic Complexity of Mitral Cells via Notch Signaling. *PLoS genetics*, 12(12), e1006514.
- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., & Benson, M. D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 254(5028), 97-99.
- Nagahara, A. H., & Tuszynski, M. H. (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nature reviews Drug discovery*, 10(3), 209-219.
- Nagayama, S., Enerva, A., Fletcher, M. L., Masurkar, A. V., Igarashi, K. M., Mori, K., & Chen, W. R. (2010). Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system. *Frontiers in neural circuits*, 4, 120.
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in neural circuits*, 8, 98.
- Nagayama, S., Igarashi, K. M., Manabe, H., & Mori, K. (2014). Parallel tufted cell and mitral cell pathways from the olfactory bulb to the olfactory cortex. In *The olfactory system* (pp. 133-160). Springer, Tokyo.
- Nakamura, T., & Gold, G. H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, 325(6103), 442.
- Nakazono, T., Lam, T. N., Patel, A. Y., Kitazawa, M., Saito, T., Saido, T. C., & Igarashi, K. M. (2017). Impaired in vivo gamma oscillations in the medial entorhinal cortex of knock-in Alzheimer model. *Frontiers in systems neuroscience*, 11, 48.
- Nawroth, J. C., Greer, C. A., Chen, W. R., Laughlin, S. B., & Shepherd, G. M. (2007). An energy budget for the olfactory glomerulus. *Journal of Neuroscience*, 27(36), 9790-9800.
- Neeper, S. A., Gómez-Pinilla, F., Choi, J., & Cotman, C. W. (1996). Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain research*, 726(1-2), 49-56.
- Neville, K. R., & Haberly, L. B. (2004). Olfactory cortex. The synaptic organization of the brain, 5, 415-454.

- Nezlin, L. P., Heermann, S., Schild, D., & Rössler, W. (2003). Organization of glomeruli in the main olfactory bulb of *Xenopus laevis* tadpoles. *Journal of Comparative Neurology*, 464(3), 257-268.
- Ni, R., Michalski, M. H., Brown, E., Doan, N., Zinter, J., Ouellette, N. T., & Shepherd, G. M. (2015). Optimal directional volatile transport in retronasal olfaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), 14700-14704.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condrón, M. M., Axelman, K., Forsell, C., ... & Näslund, J. (2001). The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature neuroscience*, 4(9), 887.
- Nishizumi, H., Miyashita, A., Inoue, N., Inokuchi, K., Aoki, M., & Sakano, H. (2019). Primary dendrites of mitral cells synapse onto neighboring glomeruli independent of their odorant receptor identity. *Communications biology*, 2(1), 1-12.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7: 697–709.
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697.
- Norstrom, E. (2017). Metabolic processing of the amyloid precursor protein—new pieces of the Alzheimer's puzzle. *Discovery medicine*, 23(127), 269-276.
- Nusser, Z., Kay, L. M., Laurent, G., Homanics, G. E., & Mody, I. (2001). Disruption of GABAA receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *Journal of neurophysiology*, 86(6), 2823-2833.
- Ogg, M. C., Bendahamane, M., & Fletcher, M. L. (2015). Habituation of glomerular responses in the olfactory bulb following prolonged odor stimulation reflects reduced peripheral input. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 53.
- Ohloff, G., Winter, B., & Fehr, C. (1994). Chemical classification and structure—Odour relationships. In *Perfumes* (pp. 287-330). Springer, Dordrecht.
- Okutani, F., Yagi, F., & Kaba, H. (1999). GABAergic control of olfactory learning in young rats. *Neuroscience*, 93(4), 1297-1300.
- Oleszkiewicz, A., Abriat, A., Doelz, G., Azema, E., & Hummel, T. (2021). Beyond olfaction: Beneficial effects of olfactory training extend to aging-related cognitive decline. *Behavioral Neuroscience*.
- Osinski, B. L., & Kay, L. M. (2016). Granule cell excitability regulates gamma and beta oscillations in a model of the olfactory bulb dendrodendritic microcircuit. *Journal of Neurophysiology*, 116(2), 522-539.
- Otaegui-Arrazola, A., Amiano, P., Elbusto, A., Urdaneta, E., & Martínez-Lage, P. (2014). Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. *European journal of nutrition*, 53(1), 1-23.
- Palasz, E., Wysocka, A., Gasiorowska, A., Chalimoniuk, M., Niewiadomski, W., & Niewiadomska, G. (2020). BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 1170.

- Parabucki, A., Bizer, A., Morris, G., Munoz, A. E., Bala, A. D., Smear, M., & Shusterman, R. (2019). Odor concentration change coding in the olfactory bulb. *Eneuro*, 6(1).
- Peana, A. T., Marzocco, S., Popolo, A., & Pinto, A. (2006). (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life sciences*, 78(7), 719-723.
- Pelosi, P., & Maida, R. (1990). Odorant-binding proteins in vertebrates and insects: similarities and possible common function. *Chemical Senses*, 15(2), 205-215.
- Peña-Ortega, F. (2019). Brain Arrhythmias Induced by Amyloid Beta and Inflammation: Involvement in Alzheimer's Disease and Other Inflammation-related Pathologies. *Current Alzheimer Research*, 16(12), 1108-1131.
- Peña-Ortega, F., Solis-Cisneros, Á., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., & Javier Lopez-Guerrero, J. (2012). Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3. *Current Alzheimer Research*, 9(7), 857-863.
- Pelosi P. Odorant-binding proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1994;29(3):199-228.
- Peng, S., Garzon, D. J., Marchese, M., Klein, W., Ginsberg, S. D., Francis, B. M., ... & Fahnstock, M. (2009). Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 29(29), 9321-9329.
- Petreanu, L., & Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *Journal of Neuroscience*, 22(14), 6106-6113.
- Pietrobon, M., Zamparo, I., Maritan, M., Franchi, S. A., Pozzan, T., & Lodovichi, C. (2011). Interplay among cGMP, cAMP, and Ca²⁺ in living olfactory sensory neurons in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience*, 31(23), 8395-8405.
- Pimentel Farfán, AK (2016) Prevención de los efectos del péptido beta amiloide in vitro por el enriquecimiento sensorial. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.1-81.
- Pinching, A. J., & Powell, T. P. S. (1971). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *Journal of cell science*, 9(2), 305-345.
- Pinching, A. J., & Powell, T. P. S. (1971). The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *Journal of cell science*, 9(2), 347-377.
- Primo, V., Rovera, M., Zanon, S., Oliva, M., Demo, M., Daghero, J., & Sabini, L. (2001). Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Mintostachys verticillata* (Griseb.) Epling. *Revista Argentina de microbiologia*, 33(2), 113-117.
- Purves, D., Augustine, G. J., & Fitzpatrick, D. otros (2001). *Neuroscience*.
- Qu, Z. S., Li, L., Sun, X. J., Zhao, Y. W., Zhang, J., Geng, Z., ... & Ren, Q. G. (2014). Glycogen synthase kinase-3 regulates production of amyloid- β peptides and tau phosphorylation in diabetic rat brain. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Raji, C. A., Lopez, O. L., Kuller, L. H., Carmichael, O. T., & Becker, J. T. (2009). Age, Alzheimer disease, and brain structure. *Neurology*, 73(22), 1899-1905.
- Ramirez-Gordillo, D., Parra, A. A., Bayer, K. U., & Restrepo, D. (2021). Hippocampal-prefrontal theta coupling develops as mice become proficient in associative odorant discrimination learning. *bioRxiv*.

- Ramos, M.F.S., A.C. Siani, M.C. Souza, E.C. Rosas, and M.G.M.O. Henriques (2006). Evaluation of the antiinflammatory activity of essential oils from five Myrtaceae species. *Revista Fitos*, 2(2): 58–66.
- Ravel, N., Chabaud, P., Martin, C., Gaveau, V., Hugues, E., Tallon-Baudry, C., ... & 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. *European Journal of Neuroscience*, 17(2), 350-358.
- Reasner, D. S., & Johnston, R. E. (1988). Acceleration of reproductive development in female Djungarian hamsters by adult males. *Physiology & behavior*, 43(1), 57-64.
- Redolfi, N., & Lodovichi, C. (2015). Role of the odorant receptor in neuronal connectivity in the olfactory bulb. *Swiss Medical Weekly*, (51).
- Reger, M. A., Watson, G. S., Green, P. S., Baker, L. D., Cholerton, B., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Cherrier, M. M., Schellenberg, G. D., Frey, W. H., 2nd, & Craft, S. (2008). Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 13(3), 323–331.
- Reisert, J., & Bradley, J. (2005). Activation of olfactory cyclic-nucleotide gated channels revisited. *The Journal of physiology*, 569(1), 4-5.
- Renkawek, K. (1994). The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer disease and associated disorders*, 8(1), 38-48.
- Richard, M. B., Taylor, S. R., & Greer, C. A. (2010). Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), 15613-15618.
- Rinberg, D., Koulakov, A., & Gelperin, A. (2006). Sparse odor coding in awake behaving mice. *Journal of Neuroscience*, 26(34), 8857-8865.
- Roa-Rojas, P.A., Martínez-Ruiz, A., Gutiérrez-Robledo L.M., (2017) Género y Salud en cifras: Envejecimiento y Demencias en México desde una perspectiva de género. *Secretaría de Salud*, 15 (3), 26-29.
- Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *Journal of Neuroscience*, 22(7), 2679-2689.
- Rogers, J., & Lue, L. F. (2001). Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 39(5-6), 333-340.
- Rojas-Líbano, D., & Kay, L. M. (2008). Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cognitive neurodynamics*, 2(3), 179-194.
- Rojas-Líbano, D., Frederick, D. E., Egaña, J. I., & Kay, L. M. (2014). The olfactory bulb theta rhythm follows all frequencies of diaphragmatic respiration in the freely behaving rat. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 214.
- Rose, S. A., Katz, P. A., & Samsky, J. (1972). Influence of Visual Enrichment on Infants' Visual Preferences. *Perceptual and motor skills*, 35(3), 960-962.

- Ross, J. A., Reyes, B. A., & Van Bockstaele, E. J. (2019). Amyloid beta peptides, locus coeruleus-norepinephrine system and dense core vesicles. *Brain research*, 1702, 46-53.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*. 5aed. Ed. Médica Panamericana.
- Rosselli-Austin, L., & Williams, J. (1990). Enriched neonatal odor exposure leads to increased numbers of olfactory bulb mitral and granule cells. *Developmental Brain Research*, 51(1), 135-137.
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F.,... & Caleo, M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 24(7), 1850-1856.
- Rossiter, K. J. (1996). Structure-odor relationships. *Chemical reviews*, 96(8), 3201-3240.
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G., & Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18442-18446.
- Royet, J. P., Distel, H., Hudson, R., & Gervais, R. (1998). A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain research*, 788(1-2), 35-42.
- Rubin, B. D., & Katz, L. C. (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, 23(3), 499-511.
- Rusznák, Z., Sengul, G., Paxinos, G., Kim, W. S., & Fu, Y. (2018). Odor Enrichment Increases Hippocampal Neuron Numbers in Mouse. *Experimental neurobiology*, 27(2), 94-102.
- Sachse, S., Rueckert, E., Keller, A., Okada, R., Tanaka, N. K., Ito, K., & Vosshall, L. B. (2007). Activity-dependent plasticity in an olfactory circuit. *Neuron*, 56(5), 838-850.
- Sakano, H. (2020). Developmental regulation of olfactory circuit formation in mice. *Development, growth & differentiation*, 62(4), 199-213.
- Salgado-Puga, K., & Pena-Ortega, F. (2015). Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid β protein. *Protein and peptide letters*, 22(4), 303-321.
- Salgado-Puga, K., Rodriguez-Colorado, J., Prado-Alcala, R. A., & Pena-Ortega, F. (2017). Subclinical doses of ATP-sensitive potassium channel modulators prevent alterations in memory and synaptic plasticity induced by amyloid- β . *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(1), 205-226.
- Satou, T., Hanashima, Y., Mizutani, I., & Koike, K. (2018). The effect of inhalation of essential oil from *Rosmarinus officinalis* on scopolamine-induced Alzheimer's type dementia model mice. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(3), 230-234.
- Schofield, P. W., Ebrahimi, H., Jones, A. L., Bateman, G. A., & Murray, S. R. (2012). An olfactory 'stress test' may detect preclinical Alzheimer's disease. *BMC neurology*, 12(1), 24.
- Schoppa, N. E. (2006). Synchronization of olfactory bulb mitral cells by precisely timed inhibitory inputs. *Neuron*, 49(2), 271-283.
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4), 487-498.

- Sepahi, A., Kraus, A., Casadei, E., Johnston, C. A., Galindo-Villegas, J., Kelly, C., García-Moreno, D., Muñoz, P., Mulero, V., Huertas, M., & Salinas, I. (2019). Olfactory sensory neurons mediate ultrarapid antiviral immune responses in a TrkA-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(25), 12428–12436.
- Serby, M. (1987). Olfactory deficits in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 24, 69-77.
- Shaftel, S. S., Griffin, W. S., & O'Banion, M. K. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *Journal of neuroinflammation*, 5, 7.
- Shea, S. D., & Katz, L. C. (2006). Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron*, 50(6), 937-949.
- Shea, S. D., Katz, L. C., & Mooney, R. (2008). Noradrenergic induction of odor-specific neural habituation and olfactory memories. *Journal of Neuroscience*, 28(42), 10711-10719.
- Shepherd, G. M. (1998). *The synaptic organization of the brain* (Vol. 198). G. M. Shepherd (Ed.). New York: oxford university press.
- Shipley, M. T., & Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Journal of neurobiology*, 30(1), 123-176.
- Shipley, M. T., Halloran, F. J., & de la Torre, J. (1985). Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain research*, 329(1-2), 294-299.
- Simón Mata, A., Frechilla, D., & del Río, J. (2010). Perspectivas sobre la hipótesis de la cascada del amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de neurología*, 50(11), 667-675.
- Sipos, E., Kurunczi, A., Fehér, A., Penke, Z., Fülöp, L., Kasza, A., Horváth, J., Horvát, S., Veszélka, S., Balogh, G., Kürti, L., Eros, I., Szabó-Révész, P., Párducz, A., Penke, B., & Deli, M. A. (2010). Intranasal delivery of human beta-amyloid peptide in rats: effective brain targeting. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(3), 405–413.
- Sklar, P. B., Anholt, R. R., & Snyder, S. H. (1986). The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *Journal of Biological Chemistry*, 261(33), 15538-15543.
- Sleiman, S. F., Henry, J., Al-Haddad, R., El Hayek, L., Abou Haidar, E., Stringer, T., ... & Chao, M. V. (2016). Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body β -hydroxybutyrate. *Elife*, 5, e15092.
- Slotnick, B.M., and Restrepo, D. (2005). Olfactometry with mice. In *Current Protocols in Neuroscience*, J.N. Crawley, C.R. Gerefen, M.A. Rogawski, D.R. Sibley, P. Skolnick, and S. Wray, eds. (New York: John Wiley and Sons, Inc), pp. 1–24.
- Small, D. H., & Cappai, R. (2006). Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective. *Journal of neurochemistry*, 99(3), 708-710.
- Smillie, K. J., & Cousin, M. A. (2011). The role of GSK3 in presynaptic function. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011.
- Solbu, T. T., & Holen, T. (2011). Aquaporin pathways and mucin secretion of Bowman's glands might protect the olfactory mucosa. *Chemical senses*, 37(1), 35-46.

- Son, G., Steinbusch, H. W., López-Iglesias, C., Moon, C., & Jahanshahi, A. (2021a). Severe histomorphological alterations in post-mortem olfactory glomeruli in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, e13033.
- Son, G., Yoo, S. J., Kang, S., Rasheed, A., Jung, D. H., Park, H., ... & Moon, C. (2021b). Region-specific amyloid- β accumulation in the olfactory system influences olfactory sensory neuronal dysfunction in 5xFAD mice. *Alzheimer's research & therapy*, 13(1), 1-20.
- Son, G., Jahanshahi, A., Yoo, S. J., Boonstra, J. T., Hopkins, D. A., Steinbusch, H. W., & Moon, C. (2021c). Olfactory neuropathology in Alzheimer's disease: a sign of ongoing neurodegeneration. *BMB reports*, 54(6), 295.
- Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C. C., Kimpara, A., Imura, M., Fujikawa, T., ... & Nishijima, T. (2007). BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochemical and biophysical research communications*, 358(4), 961-967.
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., ... & Park, D. C. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 7(3), 280-292.
- Spires, T. L., Grote, H. E., Varshney, N. K., Cordery, P. M., van Dellen, A., Blakemore, C., & Hannan, A. J. (2004). Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *Journal of Neuroscience*, 24(9), 2270-2276.
- Srinivasan, S., & Stevens, C. F. (2017). A quantitative description of the mouse piriform cortex. *bioRxiv*, 099002.
- Stamouli, E. C., & Politis, A. M. (2016). Pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease. *Psychiatrike= Psychiatriki*, 27(4), 264-275.
- Stettler, D. D., & Axel, R. (2009). Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron*, 63(6), 854-864.
- Struble, R. G., & Clark, H. B. (1992). Olfactory bulb lesions in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 13(4), 469-473.
- Su, F., Bai, F., & Zhang, Z. (2016). Inflammatory Cytokines and Alzheimer's Disease: A Review from the Perspective of Genetic Polymorphisms. *Neuroscience bulletin*, 32(5), 469-480.
- Sun, H., Zhang, J., Zhang, L., Liu, H., Zhu, H., & Yang, Y. (2010). Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Current neurovascular research*, 7(4), 268-280.
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2015). β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 6, 221.
- Sun, L., Wang, H., Hu, J., Han, J., Matsunami, H., & Luo, M. (2009). Guanylyl cyclase-D in the olfactory CO2 neurons is activated by bicarbonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 2041-2046.
- Ta, T. T., Dikmen, H. O., Schilling, S., Chausse, B., Lewen, A., Hollnagel, J. O., & Kann, O. (2019). Priming of microglia with IFN- γ slows neuronal gamma

- oscillations in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4637-4642.
- Takeuchi, H., Imamura, K., Ji, B., Tsukita, K., Enami, T., Takao, K., Miyakawa, T., Hasegawa, M., Sahara, N., Iwata, N., Inoue, M., Hara, H., Tabira, T., Ono, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Takahashi, R., Suhara, T., Higuchi, M., & Inoue, H. (2020). Nasal vaccine delivery attenuates brain pathology and cognitive impairment in tauopathy model mice. *NPJ vaccines*, 5(1), 28.
- Tang, Y. P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., & Tsien, J. Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, 41(6), 779-790.
- Tejera, D., & Heneka, M. (2016). Microglia in Alzheimer's disease: the good, the bad and the ugly. *Current Alzheimer Research*, 13(4), 370-380.
- Temmel, A. F., Quint, C., Schickinger-Fischer, B., Klimek, L., Stoller, E., & Hummel, T. (2002). Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 128(6), 635-641.
- Texidó, L., Martín-Satué, M., Alberdi, E., Solsona, C., & Matute, C. (2011). Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell calcium*, 49(3), 184-190.
- Tisay, K. T., Bartlett, P. F., & Key, B. (2000). Primary olfactory axons form ectopic glomeruli in mice lacking p75NTR. *Journal of Comparative Neurology*, 428(4), 656-670.
- Tiunova, A. A., Komissarova, N. V., & Anokhin, K. V. (2018). Prenatal Sensory Stimulation Induces BDNF Gene Expression in the Brain and Potentiates the Development of Species-Specific Predisposition in Newborn Chicks. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 166(2), 229-232.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. H. (2017). *Introduction to the human body*. John Wiley & Sons.
- Trang, A., & Khandhar, P. B. (2019). *Physiology, Acetylcholinesterase*. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Troy, C. M., Rabacchi, S. A., Friedman, W. J., Frappier, T. F., Brown, K., & Shelanski, M. L. (2000). Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by β -amyloid. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1386-1392.
- Ualiyeva, S., Hallen, N., Kanaoka, Y., Ledderose, C., Matsumoto, I., Junger, W. G., Barrett, N. A., & Bankova, L. G. (2020). Airway brush cells generate cysteinyl leukotrienes through the ATP sensor P2Y2. *Science immunology*, 5(43), eaax7224.
- Van Der Kant, R., & Goldstein, L. S. (2015). Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Developmental cell*, 32(4), 502-515.
- van den Bosch, K. A., Verberk, I. M., Ebenau, J. L., van der Lee, S. J., Jansen, I. E., Prins, N. D., ... & Van der Flier, W. M. (2021). BDNF-Met polymorphism and amyloid-beta in relation to cognitive decline in cognitively normal elderly: the SCIENCE project. *Neurobiology of Aging*, 108, 146-154.
- Van Hartevelt, T. J., & Kringelbach, M. L. (2012). The olfactory system. *The human nervous system*, 1219-1238.

- Van Riel, D., Verdijk, R., & Kuiken, T. (2015). The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *The Journal of pathology*, 235(2), 277-287.
- Vance, D. (1999). Considering olfactory stimulation for adults with age-related dementia. *Perceptual and motor skills*, 88(2), 398-400.
- Vance, D. E. (2003). Implications of olfactory stimulation in activities for adults with age-related dementia. *Activities, Adaptation & Aging*, 27(2), 17-25.
- Vandenbergh, J. G. (1969). Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology*, 84(3), 658-660.
- Vargas-Barroso, V., Ordaz-Sánchez, B., Peña-Ortega, F., & Larriva-Sahd, J. A. (2016). Electrophysiological evidence for a direct link between the main and accessory olfactory bulbs in the adult rat. *Frontiers in neuroscience*, 9, 518.
- Vargas-Barroso, V., Peña-Ortega, F., & Larriva-Sahd, J. A. (2017). Olfaction and Pheromones: Unconventional Sensory Influences and Bulbar Interactions. *Frontiers in neuroanatomy*, 11, 108.
- Vargas-Barroso, V., Peña-Ortega, F., & Larriva-Sahd, J. A. (2017). Olfaction and Pheromones: Unconventional Sensory Influences and Bulbar Interactions. *Frontiers in neuroanatomy*, 11, 108.
- Vaughan, D. N., & Jackson, G. D. (2014). The piriform cortex and human focal epilepsy. *Frontiers in neurology*, 5, 259.
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of neuroscience*, 20(10), 2580-2590.
- Veyrac A, Nguyen V, Marien M, Didier A, Jourdan F (2007). Noradrenergic control of odor recognition in a non-associative olfactory learning task in the mouse. *Learn Mem* 14: 847–854.
- 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.
- Vickers, J. C., Dickson, T. C., Adlard, P. A., Saunders, H. L., King, C. E., & McCormack, G. (2000). The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*, 60(2), 139-165.
- Villegas, S. (2015). Enfermedad de Alzheimer: nuevas estrategias terapéuticas. *Medicina Clínica*, 145(2), 76-83.
- Vincis, R., Gschwend, O., Bhaukaurally, K., Beroud, J., & Carleton, A. (2012). Dense representation of natural odorants in the mouse olfactory bulb. *Nature neuroscience*, 15(4), 537.
- Vintém, A. P., Henriques, A. G., da Cruz E Silva, O. A., & da Cruz E Silva, E. F. (2009). PP1 inhibition by Abeta peptide as a potential pathological mechanism in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology and teratology*, 31(2), 85–88.
- Wachowiak, M., & Cohen, L. B. (2001). Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron*, 32(4), 723-735.
- Waggener, C. T., & Coppola, D. M. (2007). Naris occlusion alters the electro-olfactogram: evidence for compensatory plasticity in the olfactory system. *Neuroscience letters*, 427(2), 112-116.

- Waggener, C. T., & Coppola, D. M. (2007). Naris occlusion alters the electro-olfactogram: evidence for compensatory plasticity in the olfactory system. *Neuroscience letters*, 427(2), 112-116.
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 2000; 75: 1155–61.
- Wang HY, Li W, Benedetti NJ, Lee DH. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 31547–53.
- Wang, D., Chen, Y., Chen, Y., Li, X., Liu, P., Yin, Z., & Li, A. (2020). Improved Separation of Odor Responses in Granule Cells of the Olfactory Bulb During Odor Discrimination Learning. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 330.
- Wang, D., Liu, P., Mao, X., Zhou, Z., Cao, T., Xu, J., ... & Li, A. (2019). Task-demand-dependent neural representation of odor information in the olfactory bulb and posterior piriform cortex. *Journal of Neuroscience*, 39(50), 10002-10018.
- Wang, H. Y., Lee, D. H., Davis, C. B., & Shank, R. P. (2000). Amyloid peptide Aβ1-42 binds selectively and with picomolar affinity to α7 nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of neurochemistry*, 75(3), 1155-1161.
- Wang, H. Y., Li, W., Benedetti, N. J., & Lee, D. H. (2003). α7 nicotinic acetylcholine receptors mediate β-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31547-31553.
- Wang, J., Gu, B. J., Masters, C. L., & Wang, Y. J. (2017). A systemic view of Alzheimer disease—insights from amyloid-β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology*, 13(10), 612.
- Wang, Y., Wang, Q., Ren, B., Guo, T., Qiang, J., Cao, H., ... & Zhu, B. (2020). “Olfactory three-needle” enhances spatial learning and memory ability in SAMP8 mice. *Behavioural Neurology*, 2020.
- Watson, C., Paxinos, G., & Puelles, L. (Eds.). (2012). *The mouse nervous system*. Academic Press.
- Wattenberg, L. W. (1991). Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3, 7, 11-trimethyl-, 6, 10-dodecatriene (nerolidol). *Carcinogenesis*, 12(1), 151-152.
- Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., & Wilson, D. A. (2010). Olfactory dysfunction correlates with amyloid-β burden in an Alzheimer's disease mouse model. *Journal of Neuroscience*, 30(2), 505-514.
- Wesson, D. W., Wilson, D. A., & Nixon, R. A. (2010). Should olfactory dysfunction be used as a biomarker of Alzheimer's disease? Expert review of neurotherapeutics, 10(5), 633-635.
- Wheeler, M. J., Dempsey, P. C., Grace, M. S., Ellis, K. A., Gardiner, P. A., Green, D. J., & Dunstan, D. W. (2017). Sedentary behavior as a risk factor for cognitive decline? A focus on the influence of glycemic control in brain health. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 3(3), 291-300.
- Williams, S. N., & Undieh, A. S. (2009). Dopamine D1-like receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroreport*, 20(6), 606.

- Woo, C. C., Hingco, E. E., Taylor, G. E., & Leon, M. (2006). Exposure to a broad range of odorants decreases cell mortality in the olfactory bulb. *Neuroreport*, 17(8), 817.
- Woodward, M. R., Amrutkar, C. V., Shah, H. C., Benedict, R. H., Rajakrishnan, S., Doody, R. S., ... & Szigeti, K. (2017). Validation of olfactory deficit as a biomarker of Alzheimer disease. *Neurology: Clinical Practice*, 7(1), 5-14.
- Wu, J., Liu, P., Chen, F., Ge, L., Lu, Y., & Li, A. (2020). Excitability of neural activity is enhanced, but neural discrimination of odors is slightly decreased, in the olfactory bulb of fasted mice. *Genes*, 11(4), 433.
- Wu, N., Rao, X., Gao, Y., Wang, J., & Xu, F. (2013). Amyloid- β deposition and olfactory dysfunction in an Alzheimer's disease model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(4), 699-712.
- Yamagishi, M., Takami, S., & Getchell, T. V. (1996). Ontogenetic expression of spot 35 protein (calbindin-D28k) in human olfactory receptor neurons and its decrease in Alzheimer's disease patients. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 105(2), 132-139.
- Yamaguchi, M., & Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9697-9702.
- Yamashita, Y., Kawai, N., Ueno, O., Matsumoto, Y., Oohashi, T., & Honda, M. (2018). Induction of prolonged natural lifespans in mice exposed to acoustic environmental enrichment. *Scientific reports*, 8(1), 7909.
- Yang, Q., Zhou, G., Noto, T., Templer, J. W., Schuele, S. U., Rosenow, J. M., ... & Zelano, C. (2022). Smell-induced gamma oscillations in human olfactory cortex are required for accurate perception of odor identity. *PLoS biology*, 20(1), e3001509.
- Yang, X., Renken, R., Hyder, F., Siddeek, M., Greer, C. A., Shepherd, G. M., & Shulman, R. G. (1998). Dynamic mapping at the laminar level of odor-elicited responses in rat olfactory bulb by functional MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7715-7720.
- Yates, S. L., Burgess, L. H., Kocsis-Angle, J., Antal, J. M., Dority, M. D., Embury, P. B., Piotrkowski, A. M., & Brunden, K. R. (2000). Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *Journal of neurochemistry*, 74(3), 1017-1025. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741017.x>
- Yao, Z. G., Hua, F., Zhang, H. Z., Li, Y. Y., & Qin, Y. J. (2017). Olfactory dysfunction in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Morphological evaluations from the nose to the brain. *Neuropathology*, 37(6), 485-494.
- Yu, S. G., Hildebrandt, L. A., & Elson, C. E. (1995). Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *The Journal of nutrition*, 125(11), 2763-2767.
- Yuan, T. F. (2008). BDNF signaling during olfactory bulb neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5139-5140.

- Zhang, X., Zhong, W., Brankač, J., Weyer, S. W., Müller, U. C., Tort, A. B., & Draguhn, A. (2016). Impaired theta-gamma coupling in APP-deficient mice. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Zhang, Q., Lu, Y., Bian, H., Guo, L., & Zhu, H. (2017). Activation of the $\alpha 7$ nicotinic receptor promotes lipopolysaccharide-induced conversion of M1 microglia to M2. *American journal of translational research*, 9(3), 971–985.
- Zhou, G., Lane, G., Cooper, S. L., Kahnt, T., & Zelano, C. (2019). Characterizing functional pathways of the human olfactory system. *Elife*, 8, e47177.
- Zou, Y. M., Da Lu, L. P. L., Zhang, H. H., & Zhou, Y. Y. (2016). Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 12, 869.
- 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.
- Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S. J., & Luskin, M. B. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 11(4), 234-245.
- Zimmerberg, B., Foote, H. E., & Van Kempen, T. A. (2009). Olfactory association learning and brain-derived neurotrophic factor in an animal model of early deprivation. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 51(4), 333-344.
- Zinyuk, L. E., Datiche, F., & Cattarelli, M. (2001). Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. *Behavioural brain research*, 124(1), 29-32.
- Zou, D. J., Chesler, A., & Firestein, S. (2009). How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nature reviews neuroscience*, 10(8), 611.
- Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*, 5(6), 311-322.
- Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2014). Huntington's disease. *Neurotrophic factors*, 357-409.

ANEXO

Efecto de la administración del P β A₁₋₄₂ sobre la activación glomerular inducida por la exposición a butirato de etilo

Con la finalidad de evaluar posibles cambios en la activación glomerular durante el enriquecimiento olfatorio y/o la administración del P β A₁₋₄₂, o su secuencia inversa, se realizó imagenología óptica intrínseca bulbar durante la estimulación con butirato de etilo a una concentración alta y baja (100% y 1% v/v, respectivamente; Figuras 34 y 35). Lo anterior, se llevó a cabo en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas después (Semana 2 y 3) de la administración de la secuencia inversa del P β A y del inicio del enriquecimiento olfatorio (Figuras 37 y 38).

Dos semanas después de la administración de la secuencia inversa del P β A y del inicio del enriquecimiento olfatorio (semana 2; Figura 37 A-B; n = 6), se observó que, durante la estimulación con butirato de etilo a una concentración alta, los animales control y enriquecidos olfatoriamente presentan una cantidad de glomérulos similar a los encontrados antes de la administración de la secuencia inversa del péptido (Figura 37 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 2.73 ± 0.55 vs. 3.80 ± 0.93 glomérulos; EO_{inverso}: 2.38 ± 0.40 vs. 3.07 ± 0.45 glomérulos; $p > 0.05$). Este fenómeno es similar en los animales enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el P β A₁₋₄₂ (Figura 37 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: EO P β A₁₋₄₂: 3.20 ± 0.42 vs. 4.00 ± 0.60 glomérulos; $p > 0.05$). Por otra parte, se observó que la estimulación con butirato de etilo a una concentración alta tiende a incrementar el número de glomérulos evocados al cabo de dos semanas de la administración del P β A₁₋₄₂, en animales control (Figura 37 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON P β A₁₋₄₂: 2.55 ± 0.47 vs. 4.33 ± 0.86 glomérulos; $p = 0.078$). Adicionalmente, la estimulación con butirato de etilo a una concentración baja (1% v/v) no muestra diferencias significativas en el número de glomérulos dos semanas después del inicio del enriquecimiento olfatorio y de la administración de la secuencia inversa del péptido en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Figura 37 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 2.92 ± 0.57 vs. $2.38 \pm$

0.65 glomérulos; EO_{inverso}: 2.33 ± 0.35 vs. 3.00 ± 0.42 glomérulos; $p > 0.05$). Un efecto similar se observa en los animales enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el P β A₁₋₄₂ (Figura 37 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: EO P β A₁₋₄₂: 4.00 ± 0.60 vs. 3.20 ± 0.42 glomérulos; $p > 0.05$). En contraste, la estimulación con butirato de etilo a una concentración baja tiende a incrementar en el número de glomérulos evocados dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ en animales control (Figura 37 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON P β A₁₋₄₂: 2.55 ± 0.47 vs. 4.33 ± 0.86 glomérulos; $p = 0.058$).

Un análisis del área de los glomérulos evocados con butirato de etilo a una concentración alta reveló estabilidad en las mismas dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales enriquecidos olfatoriamente (Figura 37 C; n = 6; Semana 1 vs. Semana 3: EO P β A₁₋₄₂: 0.041 ± 0.011 mm² vs. 0.041 ± 0.010 mm²; EO_{inverso}: 0.041 ± 0.008 mm² vs. 0.036 ± 0.009 mm²; $p > 0.05$). De la misma forma, no se observan diferencias significativas en el área de los glomérulos evocados en los animales control administrados con la secuencia inversa del péptido (Figura 37 C; n = 6; Semana 1 vs. Semana 3: CON_{inverso}: 0.053 ± 0.011 mm² vs. 0.047 ± 0.014 mm²; $p > 0.05$). En contraste, los datos indican una reducción significativa en el área glomerular dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ en animales control (Figura 37 C; n = 6; Semana 1 vs. Semana 3: CON P β A₁₋₄₂: 0.054 ± 0.009 mm² vs. 0.035 ± 0.008 mm²; $p < 0.05$).

El área de los glomérulos evocados tras la estimulación con butirato de etilo a concentración baja en la semana 1 vs. semana 3, no presentó diferencias significativas dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Semana 2 y 3; Figura 37 C; n = 6; $p > 0.05$). El área de los glomérulos evocados tras la estimulación con butirato de etilo a concentración baja en la semana 1 vs. semana 3 para los diferentes grupos experimentales fue la siguiente: Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 0.046 ± 0.010 mm² vs. 0.051 ± 0.011 mm²; EO_{inverso}: 0.057 ± 0.010 vs. 0.046 ± 0.012 glomérulos; CON P β A₁₋₄₂: 0.072 ± 0.013 vs. 0.049 ± 0.012 mm²; EO P β A₁₋₄₂: 0.044 ± 0.011 vs. 0.027 ± 0.039 mm² (Figura 37 C; n = 6).

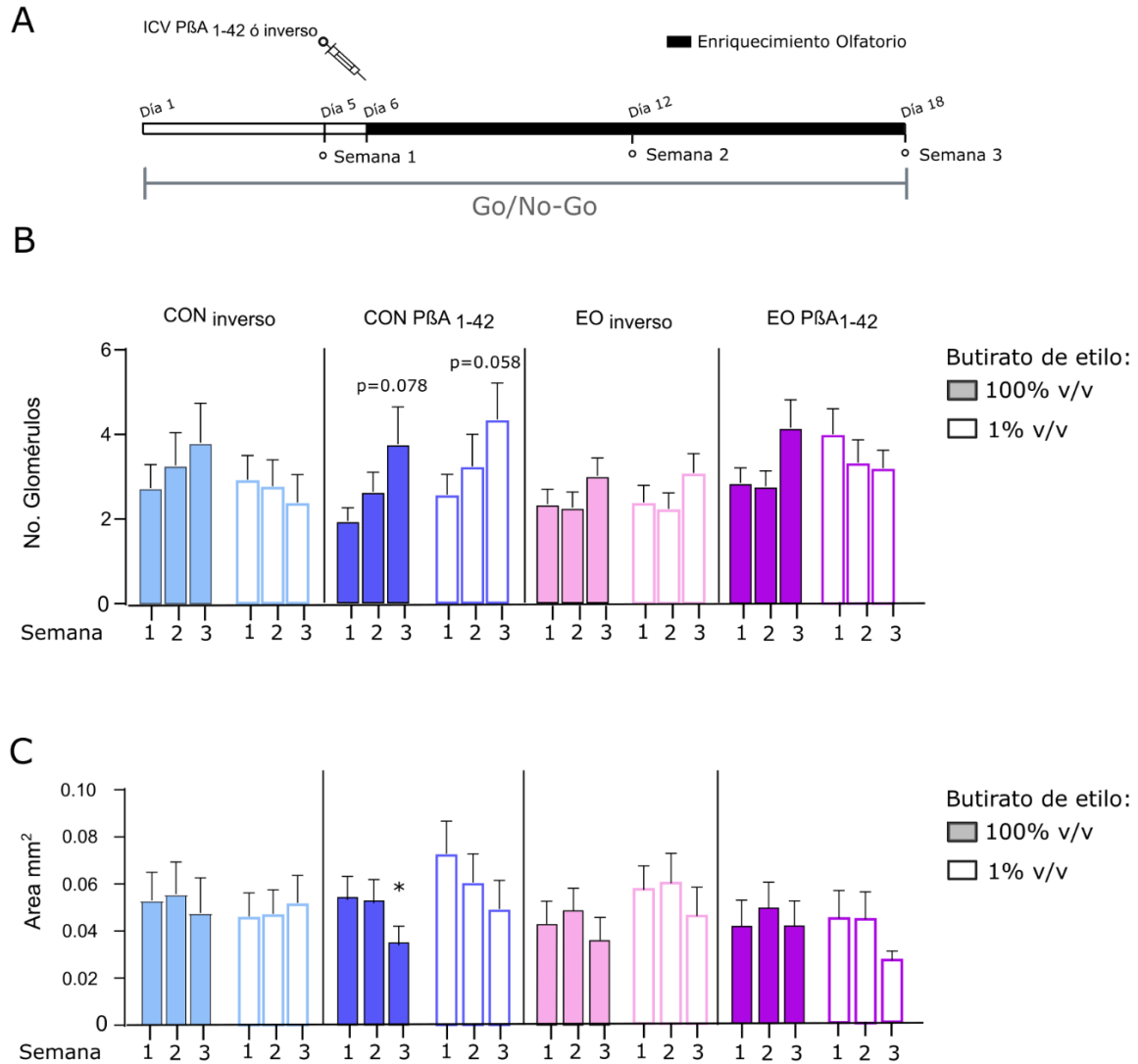


Figura 37. Cuantificación del número y el área de glomérulos activados tras la estimulación con butirato de etilo en animales control (CON) y enriquecidos olfatoriamente (EO) administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A) Diagrama del procedimiento experimental (ver material y métodos) y de los momentos en que los animales fueron evaluados mediante imagenología óptica intrínseca bulbar durante el entrenamiento en la prueba de discriminación olfatoria *Go/No-Go*: un día previo (Semana 1), una semana después (Semana 2) y dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa (inverso; Semana 3). B) Número y (C) área de los glomérulos activados por la estimulación con butirato de etilo. El aroma fue presentado a una concentración alta (100% v/v; barras en color sólido) y una baja (1% v/v; barras sin relleno). Se muestra una tendencia al incremento en el número de glomérulos, así como una disminución significativa en su área tras la estimulación con butirato de etilo en los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ que no se observa en los animales enriquecidos con aromas administrados con el P β A₁₋₄₂. * $p < 0.05$. Los datos se reportan como la media \pm EEM.

Se evaluó la cinética de la activación glomerular en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas después (Semana 2 y 3; Figura 38 A) de la administración del P β A o de su secuencia inversa y del inicio del enriquecimiento olfatorio. En primer lugar, se cuantificaron los cambios en la dinámica de activación glomerular en los animales control y enriquecidos con aromas administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa durante la estimulación con butirato de etilo a una concentración alta (100%). Para ello, se realizó una normalización con respecto de la actividad espontánea (previa al aroma; considerada como el 100%). Esta cuantificación muestra que, para cada captura y cada grupo experimental, durante las mediciones a lo largo de 3 semanas, los patrones de activación glomerular promedio permanecen estables durante el primer segundo de la adquisición de la imagenología óptica intrínseca, previo a la estimulación olfatoria (Figura 38 A-D). Así mismo, se observa que, tras la estimulación con butirato de etilo a una concentración alta (100% por 4 segundos) se produce una disminución de la reflectancia de los glomérulos activos (Figura 38 A-D; n = 6) en todos los grupos y durante las 3 semanas de captura de la imagenología óptica intrínseca bulbar.

La evaluación del cambio en la reflectancia en el último segundo de la estimulación con butirato de etilo, a una concentración alta, no muestra diferencias significativas al finalizar el protocolo de enriquecimiento olfatorio en animales control y enriquecidos, administrados con la secuencia inversa del péptido (Semana 3; Figura 38 A, C; n = 6; CON_{inverso}: $-33.03 \pm 6.56\%$; EO_{inverso}: $-40.90 \pm 5.74\%$; $p > 0.05$). De la misma forma, no se encontraron diferencias significativas en la dinámica de la activación glomerular global en los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el P β A₁₋₄₂ al finalizar el protocolo de enriquecimiento (Semana 3; Figura 38 D; n = 6; EO P β A₁₋₄₂: $-33.22 \pm 6.29\%$). En contraste, los animales control administrados con el P β A₁₋₄₂ presentan una reducción significativa en la reflectancia dos semanas después de la administración del péptido (Semana 3; Figura 38 B; n = 6; CON P β A₁₋₄₂: $-18.06 \pm 6.91\%$; $p < 0.05$).

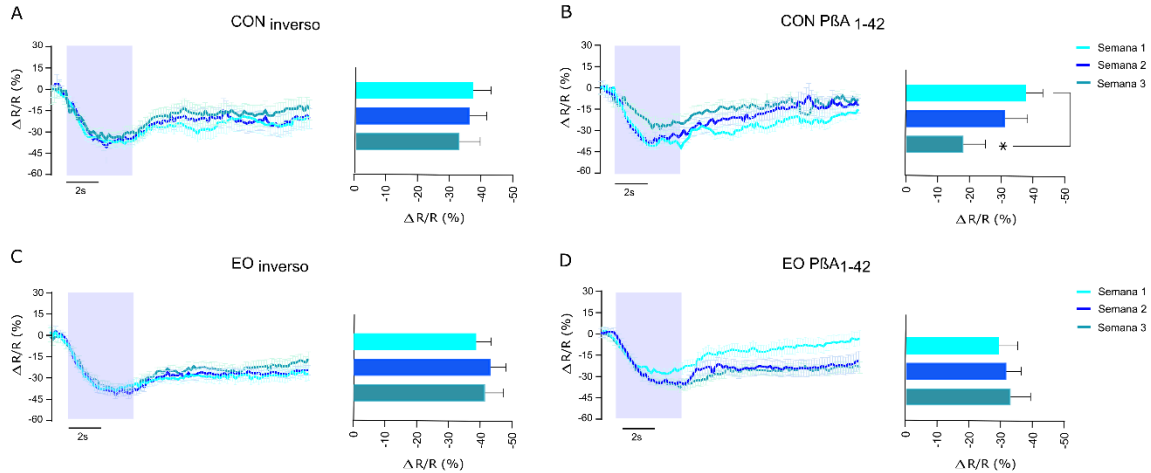


Figura 38. Curso temporal de la activación glomerular tras la estimulación con butirato de etilo a una concentración alta (100%) en animales control (CON) y enriquecidos olfatoriamente (EO) administrados con el PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A-D) Dinámica de activación glomerular antes (semana 1) y dos semanas después (semana 2 y 3) de la administración del PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales control y enriquecidos olfatoriamente (izquierda). Para cada caso, se muestra el porcentaje de cambio promedio en el tiempo de todos los glomérulos evocados tras la estimulación con butirato de etilo a una concentración alta (100% v/v, recuadro en azul para todos los casos) con respecto de la actividad espontánea (considerada como el 100%). Así mismo, se grafica la disminución de la reflectancia durante el último segundo de la estimulación con butirato de etilo (100% v/v; derecha) durante las tres semanas de captura. * $p < 0.05$. Los datos se reportan como la media \pm EEM.

Efecto de la administración del PβA₁₋₄₂ sobre la activación glomerular inducida por la exposición a limoneno (+)

Con la finalidad de evaluar posibles cambios en la activación glomerular durante el enriquecimiento olfatorio y/o la administración del PβA₁₋₄₂, o su secuencia inversa, se realizó imagenología óptica intrínseca bulbar durante la estimulación con limoneno (+) a una concentración alta y baja (100% y 1% v/v, respectivamente; Figuras 39 y 40). Lo anterior, se llevó a cabo en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas después (Semana 2 y 3) de la administración de la secuencia inversa del PβA y del inicio del enriquecimiento olfatorio (Figuras 39 y 40).

Dos semanas después de la administración de la secuencia inversa del PβA y del inicio del enriquecimiento olfatorio (semana 2; Figura 39 A-B; $n = 6$), se observó que, durante la estimulación con limoneno (+) a una concentración alta, los animales

control y enriquecidos olfatoriamente presentan una cantidad de glomérulos similar a los encontrados antes de la administración de la secuencia inversa del péptido (Figura 39 A-B; n = 6; Semana 1 vs semana 3: CON_{inverso}: 5.92 ± 1.11 vs. 4.25 ± 0.63 glomérulos; EO_{inverso}: 4.33 ± 0.93 vs. 4.75 ± 1.00 glomérulos; $p > 0.05$). Este fenómeno es similar en los animales control y enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el P β A₁₋₄₂ (Figura 39 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON P β A₁₋₄₂: 5.45 ± 0.71 vs. 5.36 ± 0.62 glomérulos; EO P β A₁₋₄₂: 5.62 ± 0.61 vs. 5.25 ± 0.82 glomérulos; $p > 0.05$). Adicionalmente, la estimulación con limoneno (+) a una concentración baja (1% v/v) no muestra diferencias significativas en el número de glomérulos dos semanas después del inicio del enriquecimiento olfatorio y de la administración de la secuencia inversa del péptido en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Figura 39 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 4.76 ± 0.84 vs. 4.42 ± 0.98 glomérulos; EO_{inverso}: 4.33 ± 0.93 vs. 4.75 ± 1.00 glomérulos; $p > 0.05$). Un efecto similar se observa en los animales control y enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el P β A₁₋₄₂ (Figura 39 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON P β A₁₋₄₂: 4.57 ± 0.67 vs. 4.47 ± 0.71 glomérulos; EO P β A₁₋₄₂: 4.75 ± 0.73 vs. 5.10 ± 1.11 glomérulos; $p > 0.05$).

Un análisis del área de los glomérulos evocados con limoneno (+) a una concentración alta y baja reveló estabilidad en las mismas dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Semana 2 y 3; Figura 39 C; n = 6; $p > 0.05$). El área de los glomérulos evocados tras la estimulación con limoneno (+) a concentración alta en la semana 1 vs. semana 3, para los diferentes grupos experimentales fue la siguiente: CON_{inverso}: 0.028 ± 0.008 mm² vs. 0.027 ± 0.008 mm²; EO_{inverso}: 0.021 ± 0.004 mm² vs. 0.017 ± 0.005 mm²; CON P β A₁₋₄₂: 0.022 ± 0.004 mm² vs. 0.029 ± 0.008 mm²; EO P β A₁₋₄₂: 0.018 ± 0.003 mm² vs. 0.016 ± 0.002 mm² (Figura 39 C; n = 6). El área de los glomérulos evocados tras la estimulación con limoneno (+) a concentración baja en la semana 1 vs. semana 3, para los diferentes grupos experimentales fue la siguiente: Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 0.039 ± 0.009 mm² vs. 0.043 ± 0.009 mm²; EO_{inverso}: 0.027 ± 0.007 vs. 0.039 ± 0.014 glomérulos;

CON P β A₁₋₄₂: 0.025 ± 0.005 vs. 0.042 ± 0.009 mm²; EO P β A₁₋₄₂: 0.045 ± 0.009 vs. 0.055 ± 0.012 mm² (Figura 39 C; n = 6).

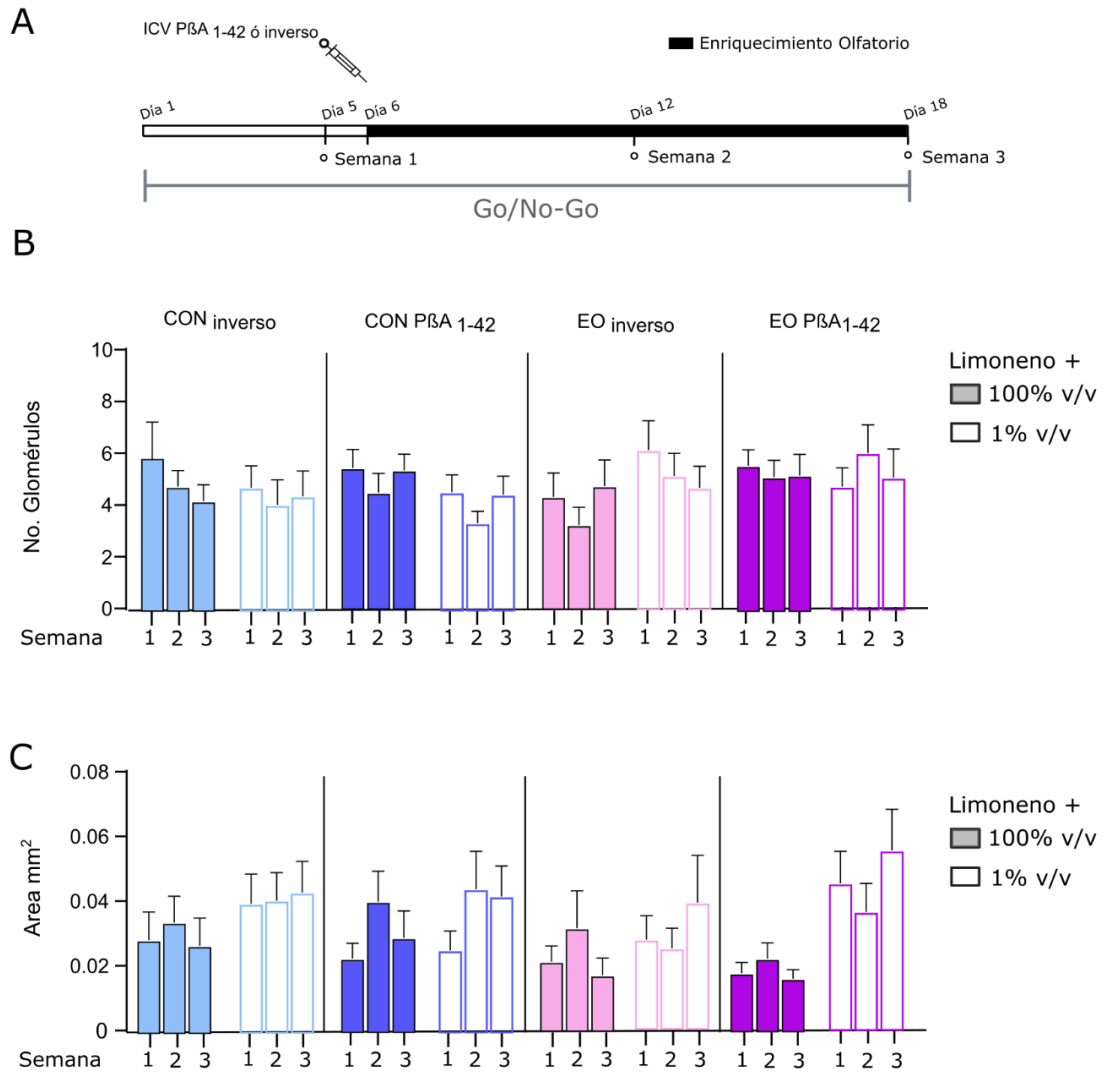


Figura 39. Cuantificación del número y el área de glomérulos activados tras la estimulación con limoneno (+) en animales control (CON) y enriquecidos olfatoriamente (EO) administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A) Diagrama del procedimiento experimental (ver material y métodos) y de los momentos en que los animales fueron evaluados mediante imagenología óptica intrínseca bulbar durante el entrenamiento en la prueba de discriminación olfatoria Go/No-Go: un día previo (Semana 1), una semana después (Semana 2) y dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa (inverso; Semana 3). B) Número y (C) área de los glomérulos activados por la estimulación con limoneno (+). El aroma fue presentado a una concentración alta (100% v/v; barras en color sólido) y una baja (1% v/v; barras sin relleno). Los datos se reportan como la media \pm EEM.

Se evaluó la cinética de la activación glomerular en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas después (Semana 2 y 3; Figura 40 A) de la administración del PβA o de su secuencia inversa y del inicio del enriquecimiento olfatorio. En primer lugar, se cuantificaron los cambios en la dinámica de activación glomerular en los animales control y enriquecidos con aromas administrados con el PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa durante la estimulación con limoneno (+) a una concentración alta (100%). Para ello, se realizó una normalización con respecto de la actividad espontánea (previa al aroma; considerada como el 100%). Esta cuantificación muestra que, para cada captura y cada grupo experimental, durante las 3 semanas de adquisición de imágenes, los patrones de activación glomerular promedio permanecen estables durante el primer segundo de la adquisición de la imagenología óptica intrínseca, previo a la estimulación olfatoria (Figura 40 A-D). Así mismo, se observa que, tras la estimulación con limoneno (+) a una concentración alta (100% por 4 segundos) se produce una disminución de la reflectancia de los glomérulos activos (Figura 40 A-D; n=6) en todos los grupos y durante las 3 semanas de captura de la imagenología óptica intrínseca bulbar.

La evaluación del cambio en la reflectancia en el último segundo de la estimulación con limoneno (+), a una concentración alta, no muestra diferencias significativas al finalizar el protocolo de enriquecimiento olfatorio en animales control y enriquecidos administrados con la secuencia inversa del péptido (Semana 3; Figura 40 A, C; n = 6; CON_{inverso}: $-16.65 \pm 5.32\%$; EO_{inverso}: $-10.46 \pm 4.03\%$; $p > 0.05$). De la misma forma, no se encontraron diferencias significativas en la dinámica de la activación glomerular global en los animales enriquecidos olfatoriamente administrados con el PβA₁₋₄₂ al finalizar el protocolo de enriquecimiento (Semana 3; Figura 40 D; n = 6; EO PβA₁₋₄₂: $-7.31 \pm 3.88\%$). En contraste, los animales control administrados con el PβA₁₋₄₂ presentan una reducción significativa en la reflectancia dos semanas después de la administración del péptido (Semana 3; Figura 40 B; n = 6; CON PβA₁₋₄₂: $-0.30 \pm 2.22\%$).

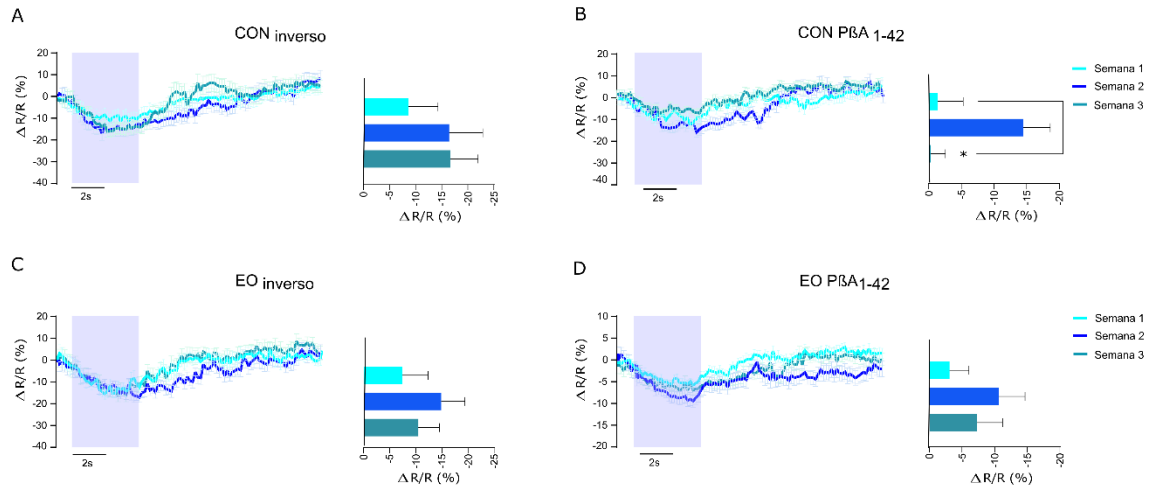


Figura 40. Curso temporal de la activación glomerular tras la estimulación con limoneno (+) a una concentración alta (100%) en animales control (CON) y enriquecidos olfatoriamente (EO) administrados con el PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A-D) Dinámica de activación glomerular antes (semana 1) y dos semanas después (semana 2 y 3) de la administración del PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales control y enriquecidos olfatoriamente (izquierda). Para cada caso, se muestra el porcentaje de cambio promedio en el tiempo de todos los glomérulos evocados tras la estimulación con limoneno (+) a una concentración alta (100% v/v, recuadro en azul para todos los casos) con respecto de la actividad espontánea (considerada como el 100%). Así mismo, se grafica la disminución de la reflectancia durante el último segundo de la estimulación con limoneno (+) (100% v/v; derecha) durante las tres semanas de captura. * p<0.05. Los datos se reportan como la media ± EEM.

Efecto de la administración del PβA₁₋₄₂ sobre la activación glomerular inducida por la exposición a limoneno (-)

Con la finalidad de evaluar posibles cambios en la activación glomerular durante el enriquecimiento olfatorio y/o la administración del PβA₁₋₄₂, o su secuencia inversa, se realizó imagenología óptica intrínseca bulbar durante la estimulación con limoneno (-) a una concentración alta y baja (100% y 1% v/v, respectivamente; Figuras 41 y 42). Lo anterior, se llevó a cabo en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas después (Semana 2 y 3) de la administración de la secuencia inversa del PβA y del inicio del enriquecimiento olfatorio.

Dos semanas después de la administración de la secuencia inversa del PβA y del inicio del enriquecimiento olfatorio (semana 2; Figura 41 A-B; n = 6), se observó que, durante la estimulación con limoneno (-) a una concentración alta, los animales

control y enriquecidos olfatoriamente presentan una cantidad de glomérulos similar a los encontrados antes de la administración de la secuencia inversa del péptido (Figura 41 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 5.66 ± 1.12 vs. 4.33 ± 0.62 glomérulos; EO_{inverso}: 6.69 ± 1.40 vs. 6.84 ± 1.14 glomérulos; $p > 0.05$). Este fenómeno es similar en los animales control y enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el P β A₁₋₄₂ (Figura 41 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON P β A₁₋₄₂: 4.50 ± 0.75 vs. 4.00 ± 0.58 glomérulos; EO P β A₁₋₄₂: 7.33 ± 1.44 vs. 5.37 ± 1.04 glomérulos; $p > 0.05$).

Adicionalmente, la estimulación con limoneno (-) a una concentración baja (1% v/v) no muestra diferencias significativas en el número de glomérulos dos semanas después del inicio del enriquecimiento olfatorio y de la administración de la secuencia inversa del péptido en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Figura 41 A-B A; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 4.53 ± 1.23 vs. 4.23 ± 0.85 glomérulos; EO_{inverso}: 6.15 ± 1.06 vs. 8.38 ± 1.13 glomérulos; $p > 0.05$). Un efecto similar se observa en los animales control y enriquecidos olfatoriamente al cabo de dos semanas de la administración con el P β A₁₋₄₂ (Figura 41 A-B; n = 6; Semana 1 vs. semana 3: CON P β A₁₋₄₂: 4.68 ± 0.69 vs. 6.25 ± 1.32 glomérulos; EO P β A₁₋₄₂: 5.73 ± 1.25 vs. 4.13 ± 0.51 glomérulos; $p > 0.05$).

Un análisis del área de los glomérulos evocados con limoneno (-) a una concentración alta y baja reveló estabilidad en la misma dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales control y enriquecidos olfatoriamente (Semana 2 y 3; Figura 38 C; n = 6; $p > 0.05$). El área de los glomérulos evocados tras la estimulación con limoneno (-) a concentración alta en la semana 1 vs. semana 3, para los diferentes grupos experimentales fue la siguiente: CON_{inverso}: 0.023 ± 0.006 mm² vs. 0.025 ± 0.006 mm²; EO_{inverso}: 0.013 ± 0.032 mm² vs. 0.019 ± 0.007 mm²; CON P β A₁₋₄₂: 0.037 ± 0.011 mm² vs. 0.031 ± 0.008 mm²; EO P β A₁₋₄₂: 0.047 ± 0.015 mm² vs. 0.029 ± 0.010 mm² (Figura 41 C; n = 6). El área de los glomérulos evocados tras la estimulación con limoneno (-) a concentración baja en la semana 1 vs semana 3, para los diferentes grupos experimentales fue la siguiente: Semana 1 vs. semana 3: CON_{inverso}: 0.054 ± 0.019

mm² vs. 0.035 ± 0.012 mm²; EO_{inverso}: 0.020 ± 0.008 vs. 0.015 ± 0.004 glomérulos; CON P β A₁₋₄₂: 0.025 ± 0.009 vs. 0.028 ± 0.009 mm²; EO P β A₁₋₄₂: 0.033 ± 0.011 vs. 0.018 ± 0.004 mm² (Figura 41 C; n = 6).

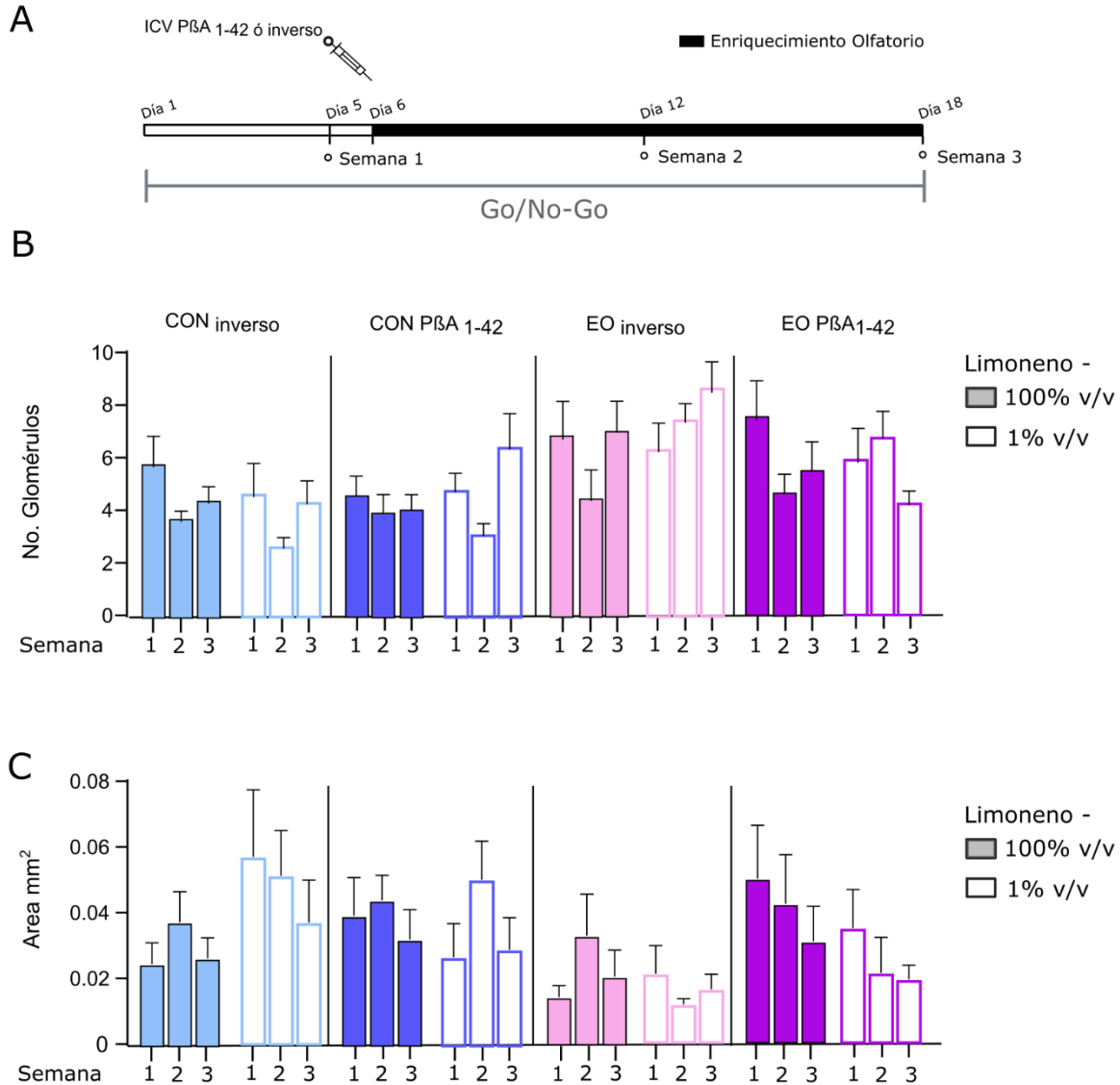


Figura 41. Cuantificación del número y el área de glomérulos activados tras la estimulación con limoneno (-) en animales control (CON) y enriquecidos olfatoriamente (EO) administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A) Diagrama del procedimiento experimental (ver material y métodos) y de los momentos en que los animales fueron evaluados mediante imagenología óptica intrínseca bulbar durante el entrenamiento en la prueba de discriminación olfatoria *Go/No-Go*: un día previo (Semana 1), una semana después (Semana 2) y dos semanas después de la administración del P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa (inverso; Semana 3). B) Número y (C) área de los glomérulos activados por la estimulación con limoneno (-). El aroma fue presentado a una concentración alta (100% v/v; barras en color sólido) y una baja (1% v/v; barras sin relleno). Los datos se reportan como la media \pm EEM.

Se evaluó la cinética de la activación glomerular en un periodo de 3 semanas, que corresponden a la condición previa (Semana 1) y dos semanas después (Semana 2 y 3; Figura 42 A) de la administración del P β A o de su secuencia inversa y del inicio del enriquecimiento olfatorio. En primer lugar, se cuantificaron los cambios en la dinámica de activación glomerular en los animales control y enriquecidos con aromas administrados con el P β A₁₋₄₂ o su secuencia inversa durante la estimulación con limoneno (-) a una concentración alta (100%). Para ello, se realizó una normalización con respecto de la actividad espontánea (previa al aroma; considerada como el 100%). Esta cuantificación muestra que, para cada captura y cada grupo experimental, durante las 3 semanas de adquisición de imágenes, los patrones de activación glomerular promedio permanecen estables durante el primer segundo de la adquisición de la imagenología óptica intrínseca, previo a la estimulación olfatoria (Figura 42 A-D). Así mismo, se observa que, tras la estimulación con limoneno (-) a una concentración alta (100% por 4 segundos) se produce una disminución de la reflectancia de los glomérulos activos (Figura 42 A-D; n = 6) en todos los grupos y durante las 3 semanas de captura de la imagenología óptica intrínseca bulbar.

La evaluación del cambio en la reflectancia en el último segundo de la estimulación con limoneno (-), a una concentración alta, no muestra diferencias significativas al finalizar el protocolo de enriquecimiento olfatorio en animales control y enriquecidos, administrados con la secuencia inversa del péptido (Semana 3; Figura 42 A, C; n = 6; CON_{inverso}: $-11.17 \pm 7.78\%$; EO_{inverso}: $-7.15 \pm 3.48\%$; $p > 0.05$). De la misma forma, no se encontraron diferencias significativas en la dinámica de la activación glomerular global en los animales control y enriquecidos olfatoriamente administrados con el P β A₁₋₄₂ al finalizar el protocolo de enriquecimiento (Semana 3; Figura 42 B, D; n = 6; CON P β A₁₋₄₂: $-1.09 \pm 3.55\%$; EO P β A₁₋₄₂: $-1.64 \pm 5.30\%$).

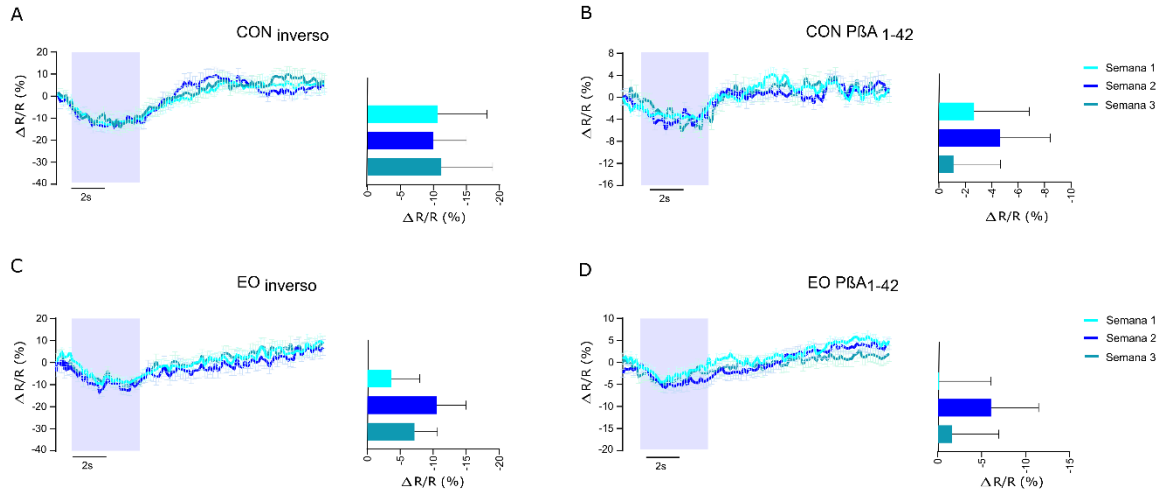


Figura 42. Curso temporal de la activación glomerular tras la estimulación con limoneno (-) a una concentración alta (100%) en animales control (CON) y enriquecidos olfatoriamente (EO) administrados con el PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa. A-D) Dinámica de activación glomerular antes (semana 1) y dos semanas después (semana 2 y 3) de la administración del PβA₁₋₄₂ o su secuencia inversa en animales control y enriquecidos olfatoriamente (izquierda). Para cada caso, se muestra el porcentaje de cambio promedio en el tiempo de todos los glomérulos evocados tras la estimulación con limoneno (-) a una concentración alta (100% v/v, recuadro en azul para todos los casos) con respecto de la actividad espontánea (considerada como el 100%). Así mismo, se grafica la disminución de la reflectancia durante el último segundo de la estimulación con limoneno (-) (100% v/v; derecha) durante las tres semanas de captura. Los datos se reportan como la media \pm EEM.

PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL DOCTORADO

- **Hernández-Soto, R.**, Pimentel-Farfan, A. K., Adan-Castro, E., Clapp, C., & Peña-Ortega, F. (2022). Main olfactory bulb reconfiguration by prolonged passive olfactory experience correlates with increased brain-derived neurotrophic factor and improved innate olfaction. *The European journal of neuroscience*, 55(5), 1141–1161.
- Martínez-García, I., **Hernández-Soto, R.**, Villasana-Salazar, B., Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2021). Alterations in Piriform and Bulbar Activity/Excitability/Coupling Upon Amyloid- β Administration in vivo Related to Olfactory Dysfunction. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 82(s1), S19–S35.
- **Hernández-Soto, R.**, Villasana-Salazar, B., Pinedo-Vargas, L., & Peña-Ortega, F. (2021). Chronic intermittent hypoxia alters main olfactory bulb activity and olfaction. *Experimental neurology*, 340, 113653.
- Villasana-Salazar, B., **Hernández-Soto, R.**, Guerrero-Gómez, M. E., Ordaz, B., Manrique-Maldonado, G., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2020). Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability in vitro. *Epilepsy research*, 166, 106375.
- **Hernández-Soto, R.**, Rojas-García, K. D., & Peña-Ortega, F. (2019). Sudden Intrabulbar Amyloid Increase Simultaneously Disrupts Olfactory Bulb Oscillations and Odor Detection. *Neural plasticity*, 2019, 3424906.

Main olfactory bulb reconfiguration by prolonged passive olfactory experience correlates with increased brain-derived neurotrophic factor and improved innate olfaction

Rebeca Hernández-Soto¹  | Ana Karen Pimentel-Farfan¹  | Elva Adan-Castro² | Carmen Clapp² | Fernando Peña-Ortega¹ 

¹Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla, Querétaro, Mexico

²Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla, Querétaro, Mexico

Correspondence

Fernando Peña-Ortega. Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro 76230, QRO, Mexico.
Email: jfpena@unam.mx

Funding information

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: AG200521; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: A1-S-7540

Edited by: Antoine Adamantidis

Abstract

The main olfactory bulb (MOB) is highly plastic and constantly reconfiguring its function and structure depending on sensory experience. Despite the extensive evidence of anatomical, functional and behavioural changes in the olfactory system induced by highly variable olfactory experiences, it is still unknown whether prolonged passive odour experience could reconfigure the MOB at its input and network activity levels and whether these changes impact innate olfaction. Here, by measuring odour-induced glomerular activation, MOB network activity and innate olfactory behaviours, we described a profound MOB reconfiguration induced by prolonged passive olfactory experience in adult animals that impacts MOB input integration at the glomerular layer including an increase in the activated glomerular area and signal intensity, which is combined with a refinement in the number of activated glomeruli and less-overlapped glomerular maps. We also found that prolonged passive olfactory experience dramatically changes MOB population activity in the presence and absence of odours, which is reflected as a decrease in slow oscillations (<12 Hz) and an increase in fast oscillations (>12 Hz). All these functional changes in awake and anaesthetized mice correlate with an increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and with improved innate olfactory responses such as habituation/dishabituation and innate preference/avoidance. Our study shows that prolonged passive olfactory experience in adult animals produces a dramatic reconfiguration of the MOB network, possibly driven by BDNF, that improves innate olfactory responses.

Abbreviations: AA, amyl acetate; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; ED, euclidean distance; FFT, fast Fourier transform; IOS, intrinsic optical signal; LFP, local field potential; MOB, main olfactory bulb; MWM, molecular weight marker; PDMS, polydimethylsiloxane; ROI, region of interest; TMT, 2,4,5-trimethylthiazole.

KEYWORDS

BDNF, innate behavior, intrinsic optical signal, local field potential, olfactory bulb, olfactory experience

1 | INTRODUCTION

Some volatile odours elicit specific innate behaviours associated with survival (Cho et al., 2011; Lazarini et al., 2014; Lin et al., 2006; Saito et al., 2017; Witt et al., 2009), whereas others produce non-innate responses related to their physiological, social and ecological value (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019; Inoue et al., 2021; Mandairon et al., 2018). The detection, discrimination, attraction and/or avoidance to volatile odours is triggered by their recognition and processing through the main olfactory system that, in the central nervous system, first recruits the main olfactory bulb (MOB) (Cho et al., 2011). The MOB is highly plastic (Bonzano et al., 2014; Buonviso et al., 1998; Buonviso & Chaput, 2000; Liu et al., 2016; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, & Linster, 2006; Mandairon, Stack, & Linster, 2006; Rochefort et al., 2002; Todrank et al., 2011) and constantly reconfiguring its function and structure depending on sensory experience throughout life (Buonviso & Chaput, 2000; Kerr & Belluscio, 2006). There are extensive examples of anatomical, functional and behavioural changes in the olfactory system induced by highly variable olfactory experiences (Bonzano et al., 2014; Buonviso et al., 1998; Buonviso & Chaput, 2000; Liu et al., 2016; Mandairon, Stack, & Linster, 2006; Rochefort et al., 2002; Todrank et al., 2011) that, however, do not integrate the reconfiguring processes triggered in the MOB with its population function and with its behavioural consequences. For instance, the exposure to a single odour, just 20 min a day for less than a week, modifies MOB excitability (Buonviso & Chaput, 2000). Moreover, short-term exposure to a single odour causes a drastic decrease in the responsiveness of mitral/tufted cells to familiar and novel odours (Buonviso et al., 1998; Buonviso & Chaput, 2000). A more complex sensory stimulation, consisting of chronic and passive olfactory stimulation (Bonzano et al., 2014; Mandairon, Stack, & Linster, 2006; Martončíková et al., 2011), also known as olfactory enrichment (Martončíková et al., 2011), increases bulbar and hippocampal neurogenesis (Bonzano et al., 2014; Martončíková et al., 2011; Rusznák et al., 2018), while promoting cell survival in the MOB and cortex (Shapiro et al., 2007; Woo et al., 2006). Furthermore, variable olfactory experiences increase survival of different interneuronal populations in the granular and glomerular MOB layers (Bonzano

et al., 2014; Woo et al., 1987). Short-term odour exposure (3 days) increases the dendritic projections of the mitral/tufted cells to their neighbouring glomeruli inducing an increase in olfactory glomeruli size (Liu et al., 2016), whereas longer odour exposure increases glomeruli number and size in neonates (Liu et al., 2016; Todrank et al., 2011). All these changes are related to improved olfactory detection and long-term olfactory memory (Rochefort et al., 2002), as well as improved odour discrimination (Mandairon et al., 2018; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, & Linster, 2006; Mandairon, Stack, & Linster, 2006). However, until now, it is unknown whether a long-term, repetitive, passive and variable odour stimulation changes innate odour responses, MOB input processing and its network activity. These are the questions evaluated in this study. By measuring glomerular activation, MOB network activity and olfactory innate behaviours, we found that prolonged passive olfactory experience (Martončíková et al., 2011; Rochefort et al., 2002) increases odour-evoked MOB glomeruli size, specificity and intensity, while decreasing their number. This prolonged passive olfactory experience also decreased MOB slow (<12 Hz) network activity and increased fast oscillations (>12 Hz), all of which correlated with improved discrimination of diluted odours as well as increased innate odour avoidance/preference.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Ethics statement

The experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology at UNAM and were performed in accordance with the guidelines of the Official Mexican Standard for the Use and Care of Laboratory Animals (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) and the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH publication 80-23, Bethesda, MD, USA, 1996).

2.2 | Subjects

Adult CD-1 mice ($n = 28$; 8 weeks old; 30–35 g) were directly obtained from the breeding colony of the Institute of Neurobiology-UNAM animal facility (defined in

this study as non-implanted animals). Mice were housed in groups of 3 animals in transparent acrylic cages shielded with a grill and a vent filter. Animals were maintained in a *vivarium* with controlled temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), and food and water *ad libitum*, under a normal 12-h light–12-h dark cycle (lights on at 7:00 AM). An additional group of 6 animals were previously surgically implanted with a head-plate to allow their recording/imaging while awake under head fixed conditions (Miller et al., 2014). These mice were anaesthetized with sevoflurane (initially 2% v/v, in dehumidified air, for induction and reduced to 1% v/v for the rest of surgery). Once deeply anaesthetized, animals were fixed to a stereotaxic frame, and their temperature was maintained with a heating pad. The skin was removed, and the exposed skull was sterilized with antiseptic solution (Microdacyn, Sanfer[®], CDMX, México). The skull above the MOB (approximately 2×1 mm) was thinned with a scalpel to create a transparent imaging and recording window (Steinzeig et al., 2017). This window was covered with a polydimethylsiloxane silicon film (PDMS; Sylgard 184 Dow Corning, USA; Heo et al., 2016) and attached to this surface with cyanoacrylate (Krazy KolaLoka[®], Edo. Méx., México). The PDMS films were prepared by mixing

the base elastomer and the curing agent in a ratio of 10:1 (v/v) and degassed within a vacuum pump. The PDMS films were left to solidify within a sterilized cell culture plate at 80°C for 1–2 h. Then, PDMS films were sterilized by autoclaving and exposure to ultraviolet (UV) light before use (Heo et al., 2016). Once the PDMS film was fixed to the thinned skull, a stainless-steel head-plate was attached to the skull with two stainless steel screws and dental cement (NicTone MDC Dental[®], CDMX, México). During this surgery, we also implanted one stainless steel screw in the following coordinate with respect to Bregma: ML: 0 mm; AP: -6 mm; DV: 1 mm, which was connected to a pin header, and covered with dental cement. This screw was later used as reference during electrophysiological recordings (Hernández-Soto et al., 2019). At the end of surgery, mice were injected with meloxicam (5 mg/kg; Exel Cetus[®], Guanajuato, México) and transferred to a recovery cage with a heating pad at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, until their complete recovery. At the end of the recovery period, the animals returned to their housing cage where water and food were provided *ad libitum* for 3 days. During this period, mice were daily administrated with antibiotic (Fluvicin 0.5 mg/kg; Pfizer, CDMX, México) and meloxicam (5 mg/kg; Exel Cetus[®], Guanajuato, México). After the recovery period, mice were daily habituated to the head-fixed conditions and the experimenter for 3 days.

TABLE 1 Odourants used for the olfactory enrichment protocol

American peppermint essential oil
Amyl-acetate
Basil essential oil
Cinnamon leaves essential oil
Citral essential oil
Clove leaves essential oil
Eucalyptus essential oil
Green tree essential oil
Heptaldehyde
Lavender essential oil
Lemon essential oil
Octyl-aldehyde
Peppermint essential oil
Pine tree essential oil
Spanish Romero essential oil
Spanish Salvia essential oil
Sweet almond oil
Tangerine essential oil
Thyme essential oil
White grapefruit essential oil
Wintergreen essential oil

2.3 | Passive olfactory exposure

We used a passive olfactory exposure protocol previously described (Martončíková et al., 2011; Rochefort et al., 2002). Briefly, non-implanted and implanted mice were exposed for 21 days to 21 different natural and synthetic odourants (Table 1; Cosmopolita S. A de C. V, CDMX, México), randomly chosen. Each day, a pierced plastic bottle containing a swab soaked with 100 μl of an undiluted odour, was located on the home cage's top grill surrounded by the food pellets and left there for 1 h. This procedure was performed twice (with the same day's odour) during the light phase of the cycle with a time gap of 3 h. In some exceptional occasions, this period extended to a maximal of 5 h. Control animals were subjected to the same procedure but with an empty pierced bottle.

2.4 | Electrophysiological recordings

One to seven days after the passive olfactory exposure protocol ended, and 1–3 days after the olfactory tests, the local field potential (LFP) of either the left of the right

MOB was randomly recorded either in head-fixed conditions or under anaesthesia.

Non-implanted animals were deeply anaesthetized with urethane (2 g/kg, i.p.) and positioned on a stereotaxic frame, whereas the implanted awake animals were also positioned, using the head-plate, on a stereotaxic frame to which they were previously familiarized with. To perform the electrophysiological recording, the PDMS film was removed. In all cases, a borosilicate electrode (1–2 M Ω), filled with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (composition in mM: 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃ and 30 D-glucose, pH 7.4) was positioned into the MOB granular layer (relative to Bregma AP: +4.8, \pm ML: 0.7, DV: –1.7; Franklin & Paxinos, 2007) to record its LFP (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2021). The respiratory rhythm was monitored with a piezoelectric sensor attached to the thorax (Hernández-Soto et al., 2021). After recording basal MOB-LFP for 30 min, a cotton swab soaked with 5 μ l amyl acetate (100% v/v) or lemon essential oil (100% v/v) was positioned near (approximately 2 cm) the animal's nose for 10 s. This procedure was repeated sequentially (first amyl acetate and then lemon essential oil) 3 more times, with 3-min inter-stimulus intervals. The signals were amplified (0.3–0.3 kHz; 7P511L, Grass Instruments Co.) and digitized at 1 kHz (MiniDigi 1B, Axon Instruments, CA, USA) with AxoScope (version 10.7, Molecular Devices, CA, USA). The recordings were analysed using Clampfit (v.10.7, Molecular Devices, CA, USA). Power spectrum analysis was performed on 10 randomly selected segments (10 s long), by means of the fast Fourier transform (FFT) algorithm (4096 frequency points, Hamming windows). To assess power spectra components, relative power was calculated in the following frequency bands: theta (1–12 Hz), beta (12–30 Hz) and gamma (30–120 Hz), as the percentage of power that such band represented from the broadband (1–120 Hz). Relative power spectrograms were plotted using NeuroExplorer (version 5.129, Nex Technologies, USA).

2.5 | Buried food test

The day after the passive olfactory exposure protocol was done, or up to 3 days later, odour detection was assessed using the buried food test in otherwise non-tested and non-implanted animals (Alvarado-Martínez et al., 2013). Before testing, animals were habituated to a new cage, with the same characteristics as their home cage (acrylic cage: 24 \times 18 \times 25 cm) and clean sawdust, for 30 min. After habituation, a chocolate chip (50 mg; TRIKI-TRAKES[®], CDMX, México) was randomly placed at one of the corners, hidden 2 cm under the sawdust. The time

that animals took to reach the chocolate (latency) was quantified. The maximum test time was 600 s (Alvarado-Martínez et al., 2013).

2.6 | Habituation/dishabituation test

The olfactory habituation–dishabituation test was performed as previously described (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2021). Briefly, non-implanted and implanted mice were habituated to the experimental cage, identical to their home cage and with new sawdust, for 30 min. Then, a square filter paper (2 \times 2 cm) soaked with 5 μ l of distilled water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was placed on the cage's top grill for 3 min for the animal to explore it. This procedure was repeated once, 1 min later. Then, in non-implanted animals, in the third exposure, the filter paper was soaked, randomly, with 5 μ l of either vinegar (100% v/v; Herdez[®], Edo. Méx., México) or vanilla extract (100% v/v; Herdez[®], Edo. Méx., México) and left for the animal to explore it. The exposure with the chosen odour was repeated twice, completing a block of three stimulations with the same odour, with 1-min inter-stimulus intervals. From the sixth through the eighth stimulations, the other odour was presented with the same exposure time and inter-stimulus interval. We quantified animal's exploration when its nose came within 2 cm of the filter paper. We measured this exploration during the 3-min presentations. This exact procedure was repeated using the same odours but at lower concentration (1% v/v), 1 week later in both experimental groups: the non-implanted and implanted animals. In all cases, any given exploration time was normalized to the first presentation of each stimulus (set as 1). The habituation phase of the test evaluates the reduction in exploration upon repeated presentation of the same odour, whereas the dishabituation reflects the discrimination between a known odour from a novel one as an increase in exploration (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2021). A cross-habituation index (Hernández-Soto et al., 2021; Wesson et al., 2010) was calculated by subtracting the last normalized exploration time of any given odour (third exposure) to the normalized exploration of the subsequent novel odour trial (first exposure).

2.7 | Innate olfactory aversion or preference test

We tested the animal's innate response to the presence of attractive or aversive odours in otherwise non-behaviourally tested animals (Cho et al., 2011; Lazarini

et al., 2014; Lin et al., 2006; Saito et al., 2017; Witt et al., 2009). For the innate odour aversion, we used 2,4,5-trimethylthiazole (TMT; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), which is a volatile odourant present in fox faeces (Cho et al., 2011; Lazarini et al., 2014). For the innate odour attraction, we used peanut oil (Kaporo[®], Guadalajara, México; Lin et al., 2006; Witt et al., 2009; Saito et al., 2017). For this test, non-implanted animals were placed in a new clean acrylic box (47 × 25 × 21 cm) without sawdust, which was divided into 3 imaginary equal sections (15.6 × 25 × 21 cm). Subsequently, 2 filter paper squares (2 × 2 cm) were placed in the centre of each lateral section. Initially, both filter papers were soaked with 5 µl of mineral oil, as vehicle (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Animals were allowed to explore them for 3 min. After this habituation, both filter papers were replaced, 5 min later, with new ones soaked with the following substances: one with mineral oil and another one soaked either with TMT 10% v/v (aversion test) or with peanut oil 50% v/v (attraction test). All behavioural tests were videotaped and analysed offline. The time that the animal spent in each section was quantified. The preference index was calculated as the difference between the time that the animal spent in compartment #3 when it contained either TMT or peanut oil, and the time spent in compartment #3 during the familiarization trial; a positive value indicates preference and a negative one indicates avoidance (Lazarini et al., 2014).

2.8 | Intrinsic optical signal imaging

To visualize the activity of the dorsal surface of the MOB, aiming its glomerular layer, we performed intrinsic optical imaging of the left or right MOB surface, randomly selected, either in awake head-fixed conditions or under anaesthesia with urethane. The implanted animals, which already had an imaging window over their MOB, were positioned, using the head-plate, on a stereotaxic frame to which they were previously familiarized with. On the other hand, non-implanted animals were deeply anaesthetized with urethane (2 g/kg, i.p.) and positioned on a stereotaxic frame, we removed a 2 × 1 mm skull piece leaving the dura intact, humidified the area with aCSF and shielded it with a cover glass. In all cases, intrinsic optical signals were acquired using the Imager 3001F System (Optical Imaging Ltd, Rehovot, Israel). The surface blood vessel pattern was visualized by illuminating the MOB surface with a 530-nm wavelength green light to obtain anatomical references to later locate the olfactory glomeruli activated during stimulation. Images were taken at the MOB surface with a 156 × 252 pixel

resolution. Because the visualized region comprised an area of 2 × 1 mm, each pixel contained 50 µm². Intrinsic optical signals were obtained by illuminating the MOB with a 630-nm wavelength red light, and the focus was adjusted to approximately 200 µm below the MOB surface. Images (200 per trial; 50 Hz) were collected for 4 s with 20-ms exposure time. A 4-s video was collected in the absence of odours, and another 4 s video was collected throughout odour stimulation. Each odour stimulation was separated by a 3 min inter-stimulus interval. Cinnamon (Cosmopolita S. A de C. V, CDMX, México) or amyl acetate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, respectively) was deposited in independent plastic tubes, in their pure liquid form, and the tube was located in front of the animal's nostrils (within 1 cm) for 4 s. Either cinnamon or amyl acetate was presented several times (between 3 and 10 times), depending on the variability of the evoked activation pattern, always with a 3 min inter-stimulus interval. The presentations that did not evoke a negligible change in reflectance were discarded. Videos were stored in a personal computer using Vdaq (version 2.2, Optical Imaging Ltd, Rehovot, Israel) and analysed offline with Win Mix (Optical Imaging Ltd, Rehovot, Israel). The change in each pixel reflectance ($\Delta R/R$) during the video was computed as follows: $\Delta R/R = (R1 - R0)/R0$, where $R0$ is the average pixel reflectance during the pre-stimulus period and $R1$ is the pixel reflectance during the odour presence (4 s long each). From the averaged images, the automatic identification of active glomeruli and their area in mm² (Figure 2) were analysed with Win Mix software (version 1.9, Optical Imaging Ltd, Rehovot, Israel) and ImageJ (ImageJ v1.51k) as described by Grishagin (2015), with some modifications. Each averaged RGB image was transformed to an 8-bit format (0 = black to 255 = white). To analyse the area and number of glomeruli, based on the changes in reflectance during odour presentation, we used the function 'analyze particles' in Image J. A threshold of 1.5 standard deviations from the mean of the pixel/signal distribution was set to obtain a binary image with those pixels that exceeded this value. Then, a pixel group greater than or equal to 10 pixels ($\geq 500 \mu\text{m}^2$) was considered a glomerulus. We also analysed the time course of the reflectance change for each glomerulus, with 1 frame resolution, with the function 'multi-measure', in Image J, and averaged the reflectance of the pixels grouped as a glomerulus. The first 500 ms were used to normalize baseline reflectance (set as 100%), and the change throughout odour stimulation was quantified as % of change. The change in reflectance used for comparison between groups comprised the last 50 frames of the odour presentation (last second). The cumulative frequency of glomerular area in enriched and control

animals was plotted in GraphPad Prism (version 8.0.0, San Diego, CA, USA). We compared the similarity of the odour maps evoked by exposure to amyl acetate and cinnamon by measuring the Euclidean distance (ED) between all glomeruli identified in one odour map (i.e., amyl acetate) and those identified in the other odour map (i.e., cinnamon). To do so, each glomerulus centroid was identified in ImageJ and their coordinates identified. The ED between all glomeruli centroids was calculated with a customized routine in MATLAB (MathWorks, Inc), using the function *pdist2* and averaged for each animal stimulated with both odours.

2.9 | Western blot

BDNF levels were evaluated by western blot (Isla et al., 2016). To do so, olfactory bulbs were homogenized in lysis buffer (5 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM sodium acid pyrophosphate, 250 mM sucrose, 1% Igepal Ca-630, pH 7.5) with protease inhibitors (4693116001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Lysates were centrifuged ($13,523 \times g$ for 10 min at 4°C) and 50 μg of supernatant protein processed by reducing SDS-PAGE (15% polyacrylamide gels), blotted and probed overnight at 4°C with a 1:500 dilution of an anti-BDNF monoclonal antibody (ab205067; Abcam plc) and a 1:1000 dilution of anti- β -tubulin polyclonal antibodies (ab6046; Abcam plc). Secondary goat anti-mouse (1:5000; ab7069; Abcam plc) or goat anti-rabbit (111-055-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) antibodies conjugated to alkaline phosphatase were used. Detection was performed using the alkaline phosphatase conjugate substrate kit (170-6432; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Quantity One 1-D software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to evaluate BDNF optical density values.

2.10 | Data analysis and statistics

BDNF, intrinsic optical signals and buried food test parameters obtained from non-implanted animals were evaluated using the unpaired *t* test, due to the normal distribution of the data. For the electrophysiological recordings, only the data obtained from the subjects with the electrode located in the granular layer were included in the analysis.

Due to the normal distribution of the data obtained in non-implanted animals, the analyses were performed using the unpaired *t* tests. In contrast, in implanted animals, the differences were analysed using with Mann-

Whitney *U* tests. A Pearson's correlation was performed between respiratory rate and the relative theta power (Hernández-Soto et al., 2021). Behaviour parameters were analysed using analysis of variance (ANOVA) followed by a *t* test. In all cases, data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM), and the significance threshold was set at $p < 0.05$. Graph Pad Prism software (version 8.0.0, San Diego, CA, USA) was used for plotting and statistical analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Prolonged passive olfactory exposure increases body weight and BDNF levels in the mouse MOB

Both animal groups started with the same body weight (control = 32.92 ± 0.49 g; enriched = 33.50 ± 0.51 g; $n = 12$ in both groups), but prolonged passive olfactory-exposed animals weighted more at the end of the protocol (40.42 ± 0.77 g; $n = 12$; $p < 0.05$) than control animals (37.42 ± 0.49 g; $n = 12$; $p < 0.05$). Because BDNF levels associate with a variety of plastic changes in the MOB (Kim et al., 2019; McDole et al., 2015; McLean et al., 2001), we measured BDNF after prolonged passive olfactory exposure. Western blot analysis of MOB extracts, normalized by β -tubulin, showed that BDNF was elevated ($p = 0.038$) in prolonged passive olfactory exposed animals relative to control animals (21.45 ± 1.85 vs. 15.39 ± 1.68 optical density; arbitrary units, respectively) (Figure 1a,b).

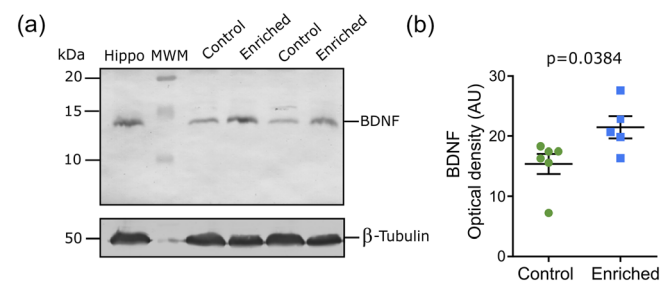


FIGURE 1 Prolonged passive olfactory exposure associates with increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in main olfactory bulb (MOB). (a) Western blot shows the presence of BDNF (~ 14 kDa) in MOB extracts from non-exposed (control) and prolonged passive olfactory exposed (enriched) animals. The hippocampus (hippo) extract from a naïve animal is included as a positive BDNF containing sample. β -Tubulin (~ 50 kDa) is used as a protein loading control. Numbers on the left indicate the position of molecular weight markers (MWM) in kDa. (b) Quantification of BDNF optical density values in arbitrary units (AU). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and individual values are also indicated

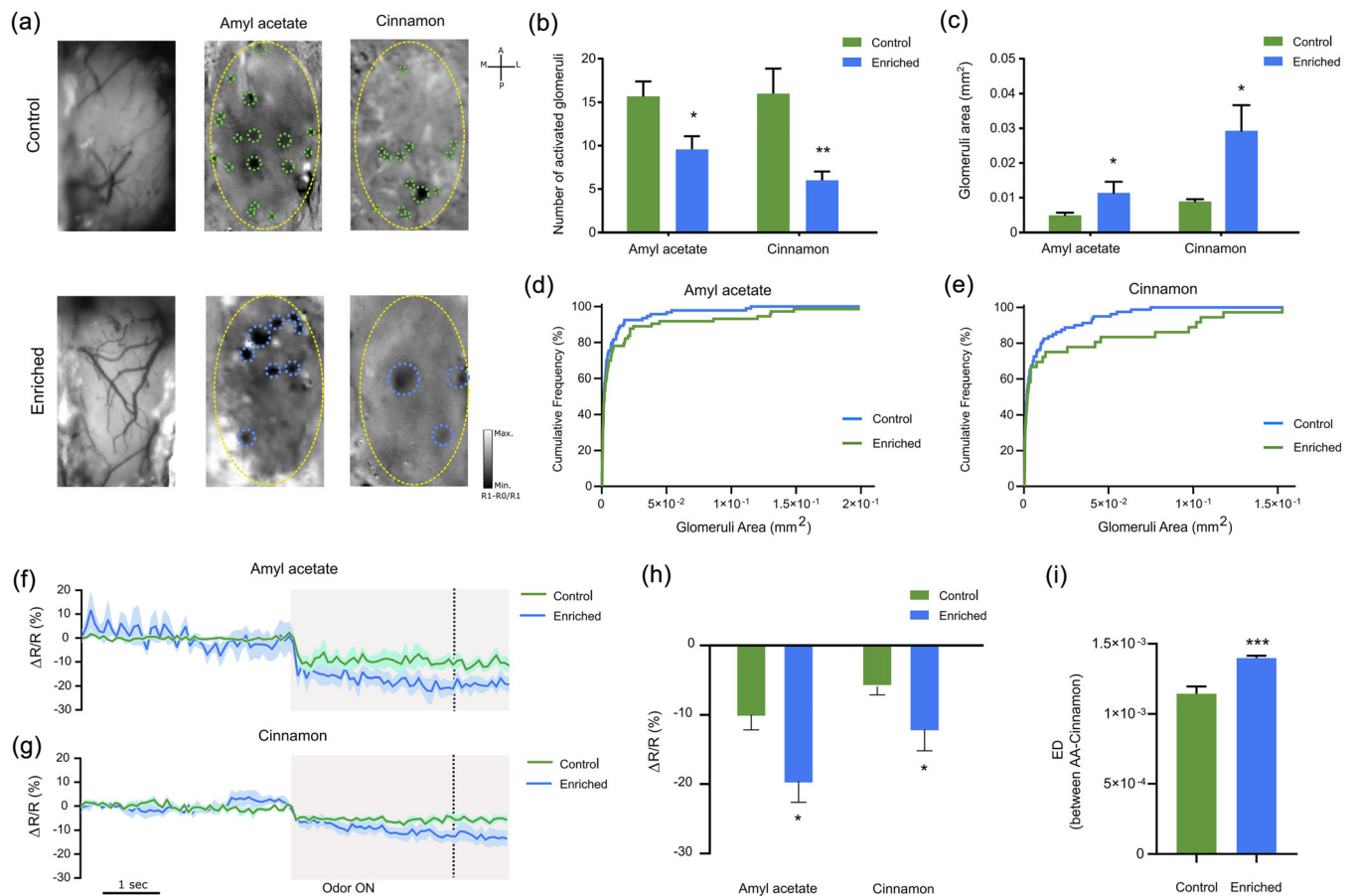


FIGURE 2 Prolonged passive olfactory exposure reconfigures odour-evoked glomerular maps in anaesthetized animals. (a) Blood vessel pattern of the dorsal main olfactory bulb (MOB; left) and its intrinsic optical signals (i.e., glomerular maps; middle and right) evoked by amyl acetate (99%; middle) and cinnamon scent (99%; right), in control (upper images) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched) animals (bottom images). Yellow and green/blue dotted lines indicate regions of interest (ROIs) placed over the MOB surface and activated glomerulus, respectively. (b) Quantification of the total numbers of activated glomeruli. (c) Glomerular area. (d) Cumulative distributions of glomerular area evoked by amyl acetate. (e) Cumulative distributions of glomerular area evoked by cinnamon. (f) Time courses of glomerular activation by amyl acetate. (g) Time courses of glomerular activation by cinnamon. Solid lines represent the mean, and the shadow represents the standard error of the mean (SEM). (h) Averaged reflectance change at the steady state of stimulation (last second, dotted line) with amyl acetate and cinnamon is quantified for the control animals (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) animals. (i) Averaged Euclidean distances (EDs) between all glomeruli activated by amyl acetate (AA) and cinnamon, in the same animal, for the control (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) groups. Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2 | Prolonged passive olfactory exposure decreases the number of odour-evoked glomeruli and augments their area, intensity and selectivity

To evaluate the effects of prolonged passive olfactory exposure on glomerular activation patterns on the MOB dorsal surface, we monitored glomerular recruitment by odour exposure using IOS imaging in anaesthetized animals (Figure 2) and in awake animals (Figure 3). During odour stimulation, we found discrete areas with circular shape ($\geq 500 \mu\text{m}^2$), which likely correspond to MOB

glomeruli, in both prolonged passive olfactory-exposed animals and control animals (Figures 2a and 3a; Rubin & Katz, 1999). However, significantly fewer (9.57 ± 1.52 glomeruli; $n = 7$; Figure 2b) glomeruli were evoked upon stimulation with amyl acetate in prolonged passive olfactory exposed animals than in control animals under anaesthesia (15.67 ± 1.71 glomeruli; $n = 6$; $p < 0.05$; Figure 2b). Similarly, when animals were stimulated with cinnamon essence, the number of evoked glomeruli was significantly lower in prolonged passive olfactory-exposed animals (6.00 ± 1.03 glomeruli; $n = 6$; Figure 2b) than in control animals under anaesthesia (16.00 ± 2.86

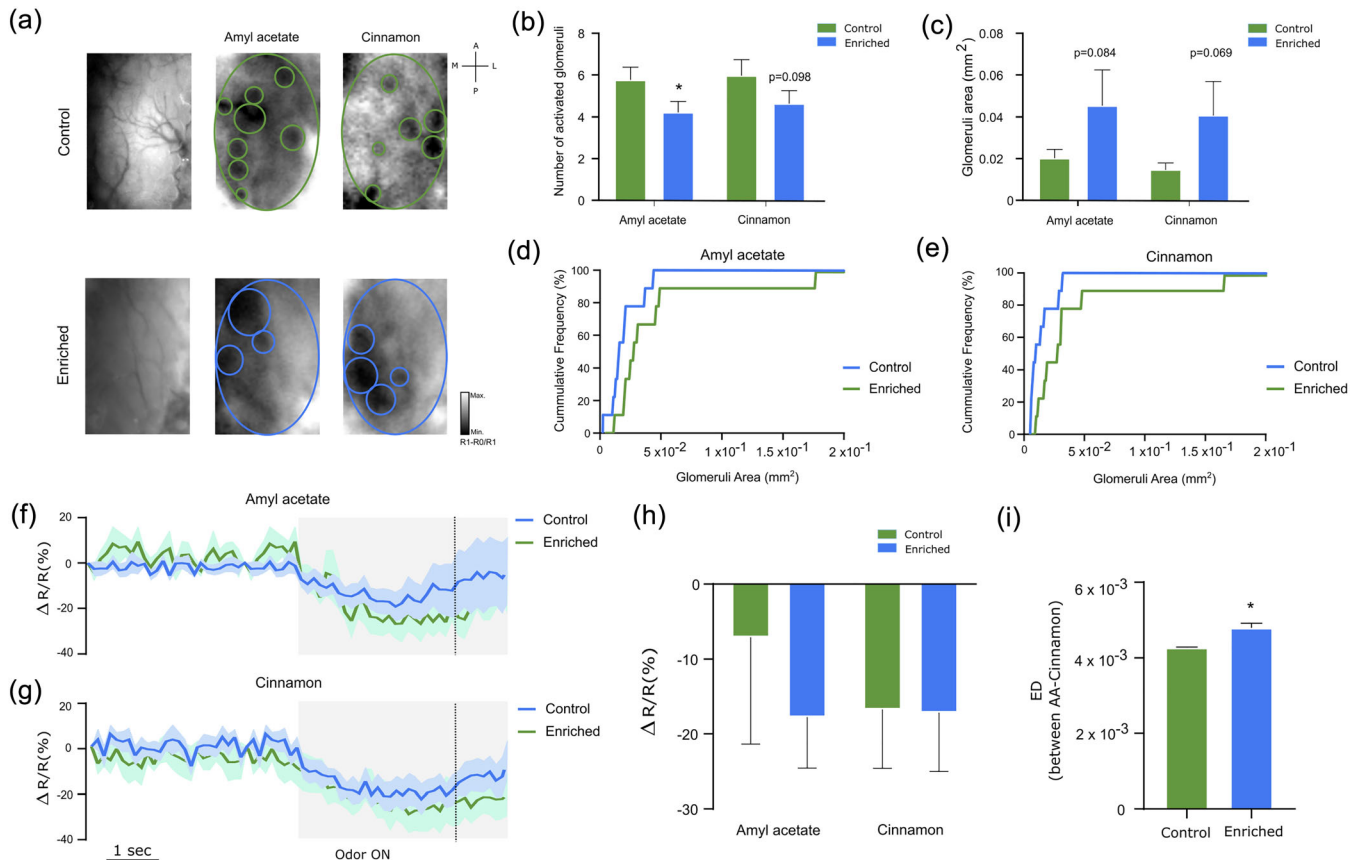


FIGURE 3 Prolonged passive olfactory exposure slightly reconfigures odour-evoked glomerular maps in awake animals. (a) Blood vessel pattern of the dorsal main olfactory bulb (MOB; left) and its intrinsic optical signals (i.e., glomerular maps; middle and right) evoked by amyl acetate (99%; middle) and cinnamon scent (99%; right), in control (upper images) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched) animals (bottom images). Green and blue lines indicate regions of interest (ROIs) placed over the MOB surface and activated glomerulus, respectively. (b) Quantification of the total numbers of activated glomeruli. (c) Glomerular area. (d) Cumulative distributions of glomerular area evoked by amyl acetate. (e) Cumulative distributions of glomerular area evoked by cinnamon. (f) Time courses of glomerular activation by amyl acetate. (g) Time courses of glomerular activation by cinnamon. Solid lines represent the mean, and the shadow represents the standard error of the mean (SEM). (h) Averaged reflectance change at the steady state of stimulation (last second, dotted line) with amyl acetate and cinnamon is quantified for the control animals (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) animals. (i) Averaged Euclidean distances (EDs) between all glomeruli activated by amyl acetate (AA) and cinnamon, in the same animal, for the control (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) groups. Data are presented as mean \pm SEM.

* $p < 0.05$

glomeruli; $n = 5$; $p < 0.05$; Figure 2b). When examining the average area of the activated glomeruli, we found that prolonged passive olfactory-exposed animals exhibited larger glomeruli activated by amyl acetate ($1.13 \pm 0.32 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 7$; Figure 2c) than control animals under anaesthesia ($0.49 \pm 0.07 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 6$; $p < 0.05$; Figure 2c). Similarly, prolonged passive olfactory-exposed animals exhibited larger glomeruli ($2.93 \pm 0.73 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 6$; Figure 2c) than control animals ($0.89 \pm 0.06 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$; $n = 5$; $p < 0.05$; Figure 2c) when stimulated with cinnamon essence under anaesthesia. The cumulative distributions of the area of glomeruli recruited during the stimulation with amyl acetate or cinnamon in prolonged passive olfactory-

exposed animals (Figure 2d,e; $n = 7$) were shifted to the right of the distributions of control animals (Figure 2d,e; $n = 6$).

The quantification of glomerular activation intensity (revealed as a reduction in reflectance) induced by amyl acetate showed stronger glomerular stimulation in prolonged passive olfactory-exposed animals ($-20.04 \pm 2.99\%$ reflectance; $n = 6$; Figure 2f,h) than in control animals under anaesthesia ($-10.39 \pm 2.17\%$ reflectance; $n = 4$; $p < 0.05$; Figure 2f,h). Additionally, glomerular activation intensity induced by cinnamon was stronger in prolonged passive olfactory-exposed animals ($-12.47 \pm 3.11\%$ reflectance; $n = 5$; Figure 2g,h) than control animals under anaesthesia ($-5.93 \pm 1.20\%$

reflectance; $n = 5$; $p < 0.05$; Figure 2g,h). Differences between the spatial distributions of the odourant-evoked glomerular response maps were quantified by measuring the EDs between glomeruli. By evaluating the pairwise ED for amyl acetate- and cinnamon-evoked glomerular maps (see Section 2), we found that odour maps were more dissimilar in prolonged passive olfactory-exposed animals ($1.39 \pm 0.008 \times 10^{-3}$ ED; $n = 4$; Figure 2i) that in control animals under anaesthesia ($1.14 \pm 0.031 \times 10^{-3}$ ED; $n = 3$; $p < 0.05$; Figure 2i).

In awake animals, significantly fewer (4.22 ± 0.52 glomeruli; $n = 3$; Figure 3b) glomeruli were evoked upon stimulation with amyl acetate in prolonged passive olfactory-exposed animals than in control awake animals (5.78 ± 0.60 glomeruli; $n = 3$; $p < 0.05$; Figure 3b). When animals were stimulated with cinnamon essence, the number of evoked glomeruli tended to be lower in prolonged passive olfactory-exposed animals (4.67 ± 0.62 glomeruli; $n = 3$; $p = 0.098$; Figure 3b) than in control awake animals (6.00 ± 0.76 glomeruli; $n = 3$; Figure 3b). When examining the average area of the activated glomeruli, we found that prolonged passive olfactory-exposed animals tend to exhibit larger glomeruli activated by amyl acetate ($4.54 \pm 1.69 \times 10^{-2}$ mm²; $n = 3$; Figure 3c) than control awake animals ($2.02 \pm 0.42 \times 10^{-2}$ mm²; $n = 3$; $p = 0.084$; Figure 3c). Similarly, prolonged passive olfactory-exposed animals tend to exhibit larger glomeruli ($4.02 \pm 1.62 \times 10^{-2}$ mm²; $n = 3$; Figure 3c) than control awake animals ($1.44 \pm 0.32 \times 10^{-2}$ mm²; $n = 3$; $p = 0.069$; Figure 3c) when stimulated with cinnamon. The cumulative distributions of the area of glomeruli recruited during the stimulation with amyl acetate (Figure 3d; $n = 3$) or cinnamon (Figure 3e; $n = 3$) in prolonged passive olfactory-exposed animals were shifted to the right of the distributions of control animals (Figure 3d,e; $n = 3$).

The quantification of glomerular activation intensity (revealed as a reduction in reflectance) induced by amyl acetate was similar in prolonged passive olfactory-exposed animals ($-17.76 \pm 6.83\%$ reflectance; $n = 3$; Figure 3f,h) and in control awake animals ($-7.10 \pm 14.27\%$ reflectance; $n = 3$; $p > 0.05$; Figure 3f, h). Likewise, glomerular activation intensity induced by cinnamon was similar in prolonged passive olfactory-exposed animals ($-17.17 \pm 7.87\%$ reflectance; $n = 3$; Figure 3g,h) and in control awake animals ($-16.73 \pm 7.88\%$ of reflectance; $n = 3$; $p > 0.05$; Figure 3g,h). Evaluation of pairwise EDs for amyl acetate- and cinnamon-evoked glomerular maps (see Section 2) shows that odour maps were more dissimilar in prolonged passive olfactory-exposed animals ($4.80 \pm 0.11 \times 10^{-3}$ ED; $n = 3$; $p < 0.05$; Figure 3i) that

in control awake animals ($4.27 \pm 0.01 \times 10^{-3}$ ED; $n = 3$; Figure 3i).

3.3 | Prolonged passive olfactory exposure hastens MOB population activity in the absence and presence of odours

The MOB extracellular field potential of anaesthetized CD-1 mice, in the absence or presence of odours, was dominated by slow oscillations in the theta frequency range (1–12 Hz) mixed with less potent beta (12–30 Hz) and gamma frequency components (30–120 Hz; Figure 4). This pattern is shared by both prolonged passive olfactory-exposed animals and control urethane anaesthetized animals (Figure 4). However, the proportion of the fast frequency component increased after prolonged passive olfactory exposure, whereas the proportion of the slower component decreased (Figure 4). Under basal conditions, in the absence of odours, the proportion of theta band power in prolonged passive olfactory-exposed animals was smaller ($44.99 \pm 7.91\%$; $n = 6$; Figure 4a) than in control anaesthetized animals ($76.11 \pm 4.08\%$; $p < 0.05$; $n = 10$; Figure 4a). In contrast, the proportion of power in the beta ($30.19 \pm 6.37\%$; Figure 4a) and gamma ($27.48 \pm 7.14\%$; $n = 6$; Figure 4a) frequency bands in prolonged passive olfactory-exposed animals was significantly bigger than in control anaesthetized animals ($14.29 \pm 2.75\%$ and $12.25 \pm 2.23\%$, respectively; $p < 0.05$; $n = 10$; Figure 4a).

In the presence of a monomolecular odour (amyl acetate), the proportion of theta band power in prolonged passive olfactory-exposed animals was also smaller ($73.69 \pm 7.06\%$; $n = 6$; Figure 4b) than in control anaesthetized animals ($91.53 \pm 1.41\%$; $p < 0.05$; $n = 10$; Figure 4b). In contrast, the proportion of power in the beta ($16.59 \pm 4.74\%$; Figure 4b) and gamma ($10.90 \pm 3.70\%$; $n = 6$; Figure 4b) frequency bands in prolonged passive olfactory-exposed animals was significantly bigger than in control anaesthetized animals ($5.68 \pm 1.03\%$ and $3.81 \pm 0.77\%$, respectively; $p < 0.05$; $n = 10$; Figure 4b).

In the presence of a complex odour (lemon essential oil; Vincis et al., 2012; Darjazi, 2013; Al-Jabri & Hossain, 2014), the proportion of theta band power in prolonged passive olfactory-exposed animals was also smaller ($64.25 \pm 7.90\%$; $n = 6$; Figure 4c) than in control anaesthetized animals ($87.64 \pm 2.49\%$; $p < 0.05$; $n = 10$; Figure 4c). In contrast, the proportion of power in the beta ($23.14 \pm 5.28\%$; Figure 4c) and gamma ($15.30 \pm 4.65\%$; $n = 6$; Figure 4c) frequency bands in prolonged passive olfactory-exposed animals was significantly bigger than in control anaesthetized animals

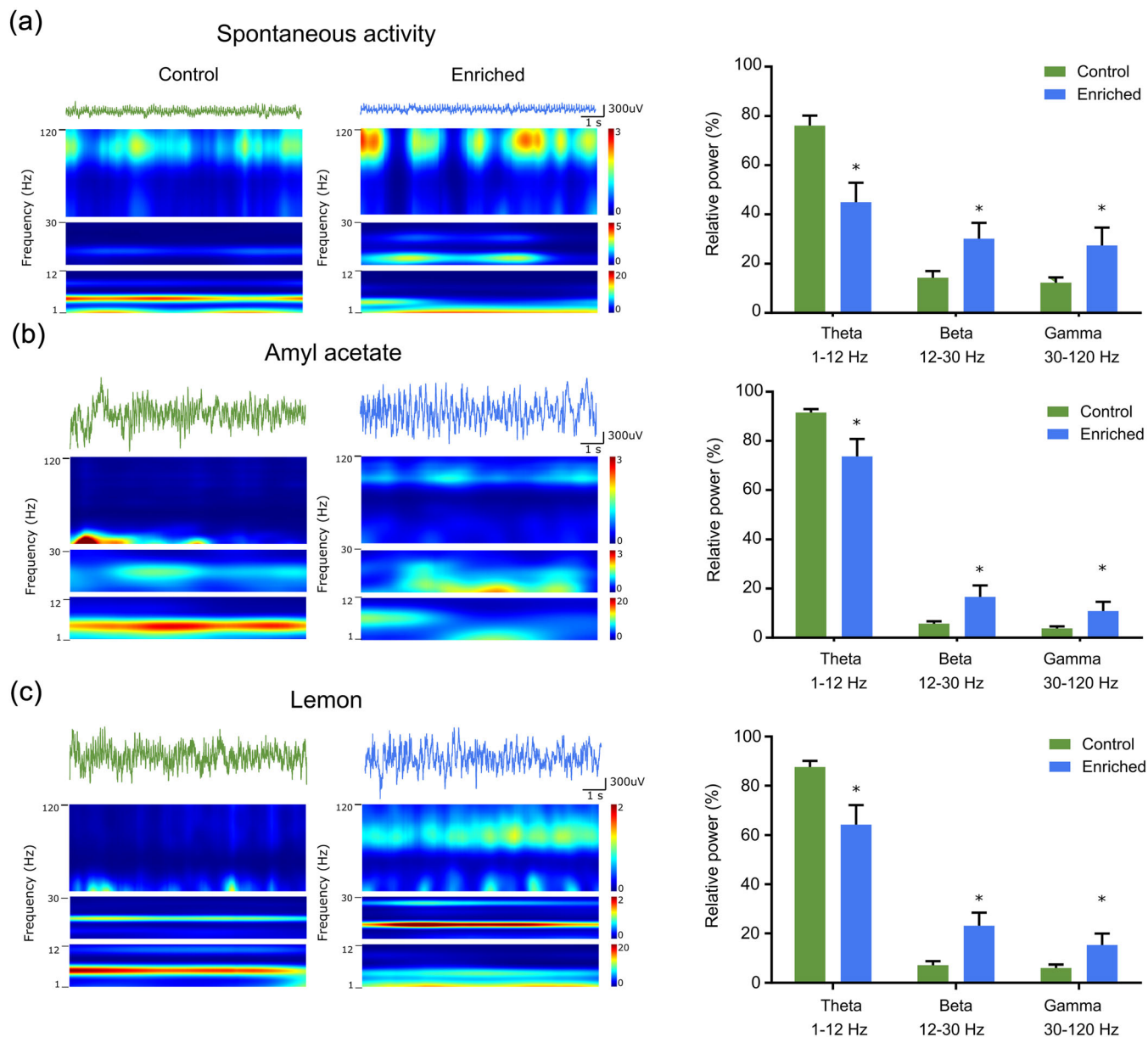


FIGURE 4 Modifications in main olfactory bulb (MOB) population activity induced by prolonged passive olfactory exposure in anaesthetized animals. MOB local field potential recordings and their corresponding spectrograms in control animals (left) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; middle) animals, during spontaneous conditions (a) and in the presence of amyl acetate (b) and lemon essential oil (c). Colour scales represent the spectrogram relative power, in all cases. The graphs on the right show the quantifications of relative power in three different frequency bands: theta (1–12 Hz), beta (12–30 Hz) and gamma (30–120 Hz) for the control animals (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) animals. Note a reduction in the theta frequency band and an increase in beta and gamma frequency bands in enriched animals. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$

($7.07 \pm 1.62\%$ and $6.05 \pm 1.34\%$, respectively; $p < 0.05$; $n = 10$; Figure 4c).

Considering that breathing strongly modulates MOB theta rhythm (Rojas-Libano et al., 2014; Wu et al., 2020; Figure 5a), we evaluated whether the change in MOB theta activity was related to a change in the respiratory rhythm and found that the respiratory rate is not altered in prolonged passive olfactory-exposed animals (3.76 ± 0.36 Hz; $n = 6$; Figure 5b) compared with control

anaesthetized animals (3.32 ± 0.36 Hz; $n = 10$; $p > 0.05$; Figure 5b). Furthermore, we found that the respiratory rate is not correlated with the theta relative power in any of the experimental groups ($r^2 = -0.29$; $p > 0.05$; Figure 5c).

The MOB extracellular field potential of implanted awake CD-1 mice, in the absence or presence of odours, was also dominated by slow oscillations in the theta frequency range (1–12 Hz) mixed with less potent beta

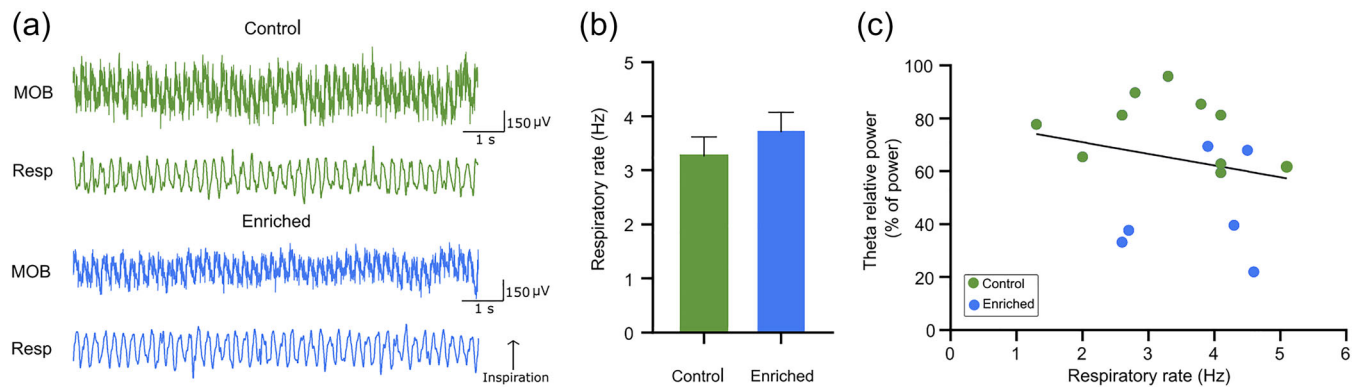


FIGURE 5 Breathing frequency is not altered after prolonged passive olfactory exposure and does not correlate with the relative power of main olfactory bulb (MOB) theta activity in anaesthetized animals. (a) Representative traces of simultaneous recordings of the MOB spontaneous local field potential (top) and rhythmic thoracic movements (Resp; bottom) in control (upper traces) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; lower traces) animals. (b) Quantification of the respiratory rate in both groups. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). (c) Lack of correlation between respiratory rate and theta relative power during MOB spontaneous activity ($p > 0.05$)

(12–30 Hz) and gamma frequency components (30–120 Hz; Figure 6). This pattern was shared by both prolonged passive olfactory-exposed animals and control awake animals (Figure 6). However, the proportion of the fast frequency component increased after prolonged passive olfactory exposure, whereas the proportion of the slower component decreased (Figure 6). Under basal conditions, in the absence of odours, the proportion of theta band power in prolonged passive olfactory-exposed animals was smaller ($88.73 \pm 0.75\%$; $n = 3$; Figure 6a) than in control awake animals ($95.55 \pm 0.90\%$; $p < 0.05$; $n = 3$; Figure 6a). In contrast, the proportion of power in the beta ($7.23 \pm 0.86\%$; Figure 6a) and gamma ($4.03 \pm 0.16\%$; $n = 3$; Figure 6a) frequency bands in prolonged passive olfactory-exposed animals was significantly bigger than in control awake animals ($2.83 \pm 0.34\%$ and $1.61 \pm 0.57\%$, respectively; $p < 0.05$; $n = 3$; Figure 6a).

In the presence of amyl acetate, the proportion of theta band power in prolonged passive olfactory-exposed animals was also smaller ($88.10 \pm 1.69\%$; $n = 3$; Figure 6b) than in control awake animals ($94.49 \pm 2.51\%$; $p < 0.05$; $n = 3$; Figure 6b). In contrast, the proportion of power in the beta ($9.12 \pm 1.77\%$; Figure 6b) and gamma ($2.78 \pm 0.08\%$; $n = 3$; Figure 6b) frequency bands in prolonged passive olfactory-exposed animals was also significantly bigger than in control awake animals ($4.99 \pm 2.29\%$ and $0.52 \pm 0.22\%$, respectively; $p < 0.05$; $n = 3$; Figure 6b).

In the presence of lemon essential oil, the proportion of theta band power in prolonged passive olfactory-exposed animals was also smaller ($85.83 \pm 2.15\%$; $n = 3$; Figure 6c) than in control awake animals ($93.17 \pm 0.40\%$; $p < 0.05$; $n = 3$; Figure 6c). In contrast, the proportion of

power in the beta ($9.90 \pm 1.99\%$; Figure 6c) and gamma ($4.27 \pm 0.76\%$; $n = 3$; Figure 6c) frequency bands in prolonged passive olfactory-exposed animals was also significantly bigger than in control awake animals ($5.46 \pm 0.63\%$ and $1.37 \pm 0.28\%$, respectively; $p < 0.05$; $n = 3$; Figure 6c).

3.4 | Prolonged passive olfactory exposure enhances odour detection and discrimination under challenging conditions

To evaluate the impact of prolonged passive olfactory exposure on different aspects of olfaction, we initially performed the buried food test (Machado et al., 2018; Rattazzi et al., 2015; Yang & Crawley, 2009) that measures the animal's ability to locate a piece of food and its innate tendency towards foraging (Machado et al., 2018; Rattazzi et al., 2015; Yang & Crawley, 2009). We found that the latency to find the hidden food was similar between prolonged passive olfactory-exposed animals (36.17 ± 11.70 s; $n = 6$; Figure 7a) and control non-implanted animals (34.28 ± 11.83 s; $n = 7$; $p > 0.05$; Figure 7a). Next, we evaluated the animal's ability to habituate to a repetitive odour presentation and discriminate between odours with the habituation/dishabituation test (Arbuckle et al., 2015; Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Nittenson et al., 2019; Takahashi & Tsuboi, 2017). When this test was performed with concentrated odours (100% v/v; Figure 7b,d–f), we observed a typical habituation/dishabituation performance in both groups with identical exploratory times ($n = 10$ in both groups; $p > 0.05$; Figure 7d–f). Prolonged passive olfactory-

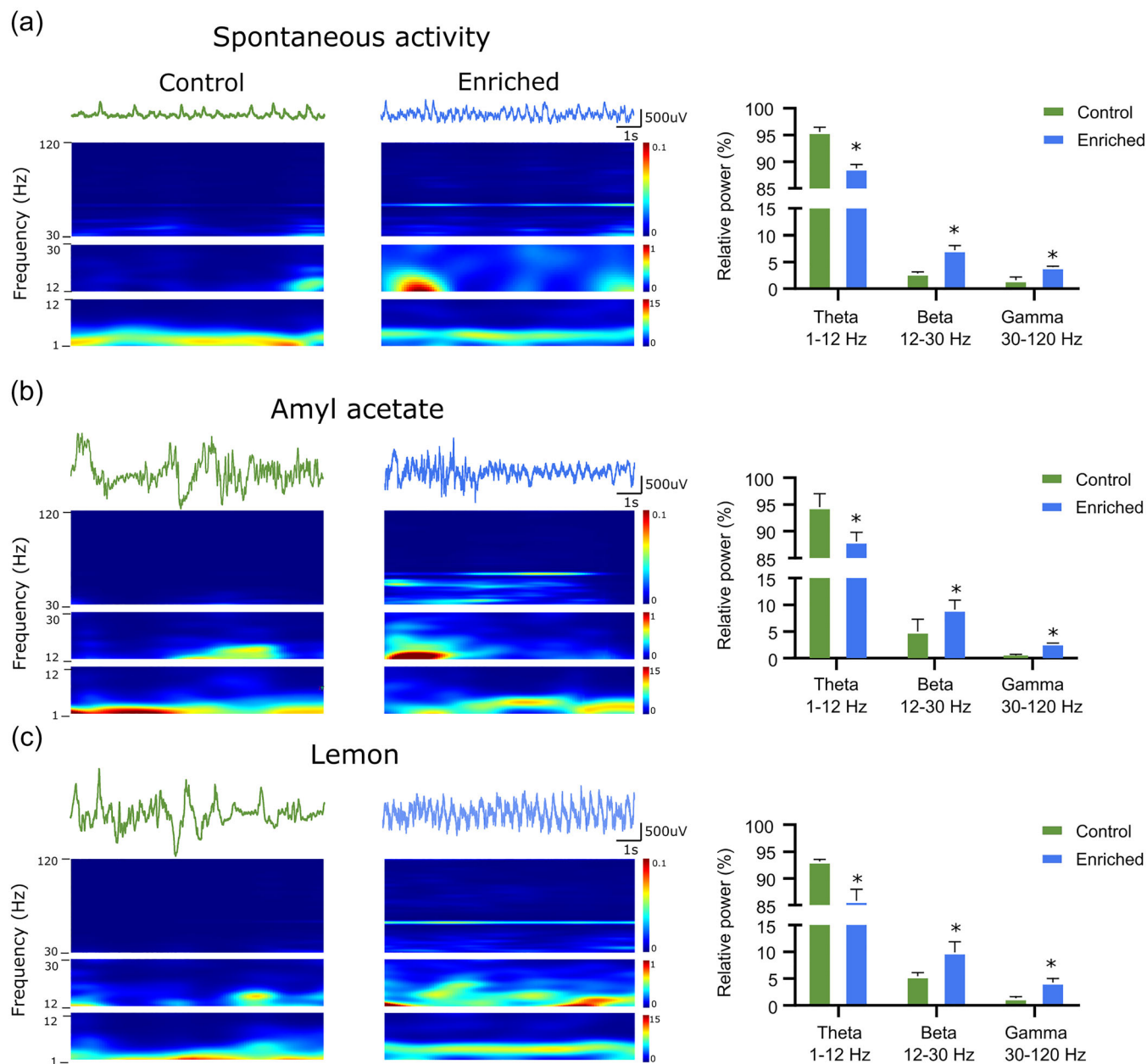


FIGURE 6 Modifications in MOB population activity induced by prolonged passive olfactory exposure in awake animals. Main olfactory bulb (MOB) local field potential recordings and their corresponding spectrograms in control animals (left) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; middle) animals, during spontaneous conditions (a) and in the presence of amyl acetate (b) and lemon essential oil (c). Colour scales represent the spectrogram relative power, in all cases. The graphs on the right show the quantifications of relative power in three different frequency bands: theta (1–12 Hz), beta (12–30 Hz) and gamma (30–120 Hz) for the control animals (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) animals. Note a reduction in the theta frequency band and an increase in beta and gamma frequency bands in enriched animals. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$

exposed animals reduced their exploratory time to $11.68 \pm 3.23\%$ when concentrated vinegar (100% v/v; Figure 7b,e) was presented for the third time and $11.71 \pm 5.41\%$ when concentrated vanilla essence was presented for the third time (100% v/v; Figure 7b,e), which is similar to the habituation exhibited by control non-implanted animals that reduced their exploratory

time to $13.85 \pm 5.89\%$ ($n = 10$; $p > 0.05$; Figure 7b,d) when concentrated vinegar (100% v/v) was presented for the third time and $11.23 \pm 3.53\%$ when concentrated vanilla essence was presented for the third time (100% v/v; Figure 7b,d). After habituation, we evaluated odour discrimination through the dishabituation phenomenon, which is reflected as an increase in exploration when a

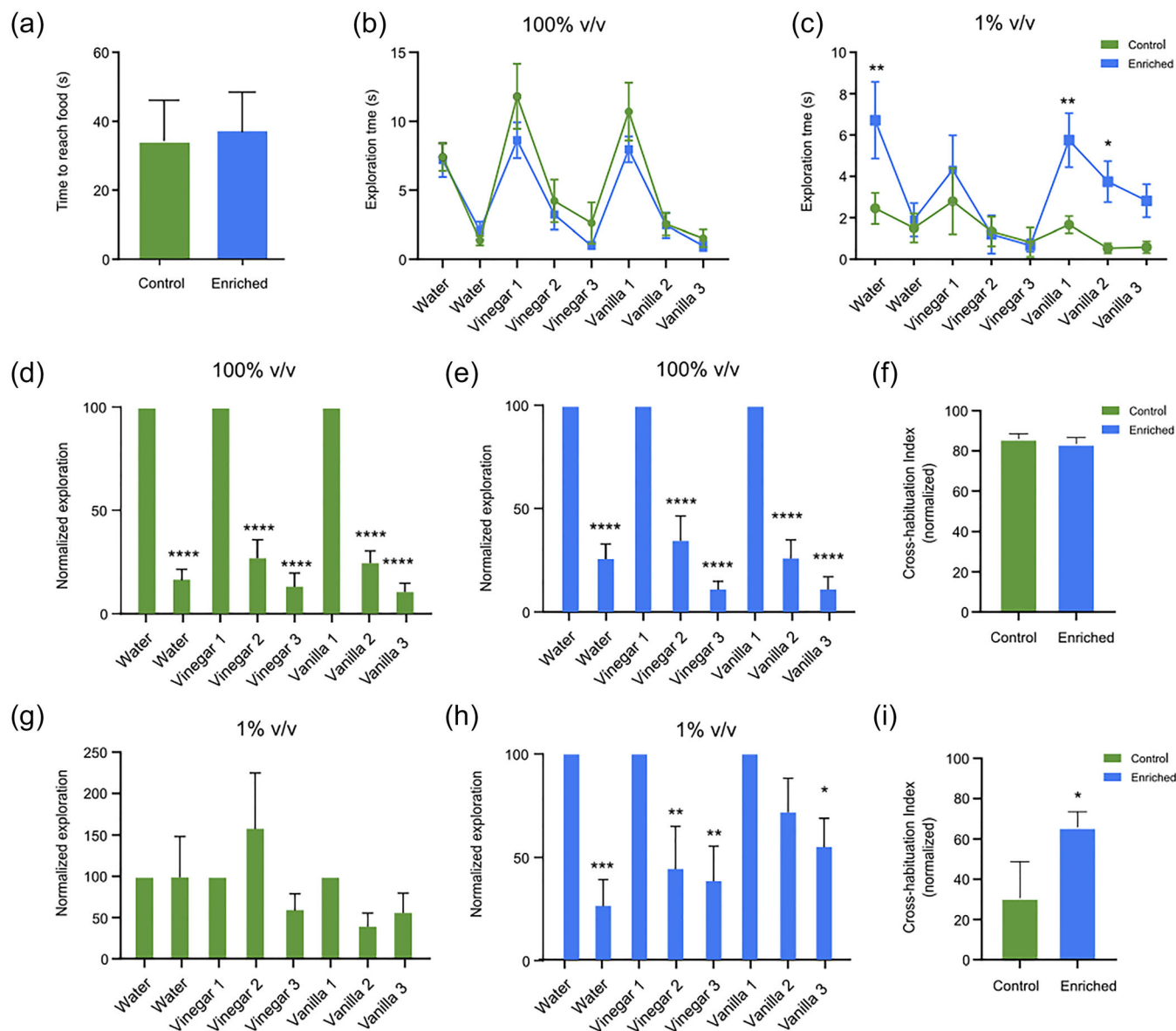


FIGURE 7 Prolonged passive olfactory exposure improves habituation/dishabituation of odours at low concentration in non-implanted animals. (a) Quantification of the latency to reach the buried food for the control animals (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) animals. (b,c) Mean exploration time to the repetitive presentation of distilled water and two odours (vinegar or vanilla) at high (100%) and low (1% v/v, diluted in distilled water) concentrations in control and enriched animals. The reduction in exploration upon repetitive presentation of the same odour reflects habituation, whereas the increase in exploration upon the presentation of a new odour reflects the dishabituation. The same habituation/dishabituation tests were quantified as normalized exploratory time (first stimulus of each block set as 100%) for the same control animals (d,g) and enriched animals (e,h), at low and high concentrations. The normalized cross-habituation indexes for both groups and odour concentration are also graphed (f,i). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

new odourant is presented (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). To quantify this phenomenon, we measured the 'cross-habituation index' (Wesson et al., 2010) calculated by subtracting the last exploration time of any given odour (third exposure) to the exploration of the subsequent novel odour trial (first exposure) (Hernández-Soto et al., 2021). Odour discrimination of concentrated odours was similar in both groups because their cross-

habituation index was not significantly different between prolonged passive olfactory-exposed animals and control non-implanted animals (83.40 ± 3.20 and 85.87 ± 2.63 , respectively; $n = 6$ in both groups; $p > 0.05$; Figure 7f).

To increase the sensory challenge during the habituation/dishabituation test, we repeated it while odour concentration was reduced to 1% v/v (Figure 7c,g-i). By doing so, we observed that prolonged passive olfactory-

exposed animals significantly increased their exploration time when vanilla essence was presented for the first (5.75 ± 1.31 s; $n = 6$; $p < 0.05$; Figure 7c) and second time (3.75 ± 0.99 s; $n = 6$; $p < 0.05$; Figure 7c) compared with the control non-implanted animals (1.66 ± 0.41 and 0.53 ± 0.24 s, respectively; Figure 7c), which indicates that prolonged passive olfactory-exposed animals detected the diluted odour. When the exploration was normalized, prolonged passive olfactory-exposed animals clearly exhibited odour habituation because their exploratory time was reduced to $38.82 \pm 16.22\%$ when diluted vinegar (1% v/v; $p < 0.05$; Figure 7c,h) was presented for the third time and $55.40 \pm 13.02\%$ when diluted vanilla essence was presented for the third time (1% v/v; $p < 0.05$; Figure 7c,h). In contrast, control non-implanted animals did not show a clear habituation to repetitive odour exposure to diluted vinegar ($60.39 \pm 18.50\%$ in its third exposure; $n = 6$; $p > 0.05$; Figure 7c,g) or diluted vanilla essence ($57.48 \pm 22.30\%$ in its third exposure; $n = 6$; $p > 0.05$; Figure 7c,g). Moreover, we also found a difference in odour discrimination between groups, because the cross-habituation index of the prolonged passive olfactory-exposed animals (66.76 ± 7.68) was significantly higher than that of control non-implanted animals (30.51 ± 18.25 , respectively; $n = 6$; $p < 0.05$; Figure 7i).

We also evaluated the ability of implanted animals to habituate to a repetitive odour presentation and discriminate between odours with the habituation/dishabituation test using low odour concentration (1% v/v; Figure 8). By doing so, we observed that prolonged passive olfactory-exposed animals significantly increased their exploration time when vanilla essence was presented for the first time (7.88 ± 2.52 s; $n = 3$; $p < 0.05$; Figure 8a) compared with the control implanted animals (0.19 ± 0.19 s; $n = 3$; Figure 8a), which indicates that prolonged passive olfactory-exposed animals detected this diluted odour more efficiently. When the exploration was normalized, prolonged passive olfactory-exposed animals clearly exhibited odour habituation because their exploratory time was reduced to $29.01 \pm 2.61\%$ when diluted vinegar (1% v/v; $p < 0.05$; Figure 8a,c) was presented for the third time and to $16.09 \pm 11.76\%$ when diluted vanilla essence was presented for the third time (1% v/v; $p < 0.05$; Figure 8a,c). In contrast, control implanted animals did not show a clear habituation to repetitive odour exposure to diluted vinegar ($1103.00 \pm 933.80\%$ in its third exposure; $n = 3$; $p > 0.05$; Figure 8a,b) or diluted vanilla essence ($107.60 \pm 7.60\%$ in its third exposure; $n = 3$; $p > 0.05$; Figure 8a,b). Moreover, we also found a difference in odour discrimination between groups, because the cross-habituation index of the prolonged passive olfactory-exposed animals (79.55 ± 5.07) was

significantly higher than that of control implanted animals (-315.80 ± 319.94 , respectively; $n = 3$; $p < 0.05$; Figure 8d).

3.5 | Prolonged passive olfactory exposure promotes innate olfactory behaviour

Peanut oil and TMT elicit strong innate attraction and avoidance, respectively (Lin et al., 2006; Saito et al., 2017; Witt et al., 2009). To further analyse if the reconfiguration of MOB activity induced by prolonged passive olfactory exposure influences innate olfactory behaviours, we evaluated the innate responses to both odours. During the habituation to the rectangular test cage, in the absence of odours, animals of both groups showed equal preference for the lateral compartments over the central one (Figure 9a,d). We did not observe any significant differences in the time spent in the three compartments in which the test box was imaginarily divided ($p > 0.05$; $n = 6$ in both groups; Figure 9a,b). However, when peanut oil (50% v/v) was in one lateral compartment we observed that prolonged passive olfactory-exposed animals spent significantly more time in such compartment (131.00 ± 6.74 s) than control non-implanted animals (88.67 ± 18.35 s; $p < 0.05$; $n = 6$; Figure 9a,b). To better describe the innate response to odours, we measured the preference index (see Section 2). A negative value indicates avoidance, and a positive value indicates preference (Lazarini et al., 2014). Thus, peanut oil led to a positive preference index that was significantly higher in prolonged passive olfactory-exposed animals (57.40 ± 17.67 ; $n = 5$; Figure 9c) than control non-implanted animals (16.40 ± 16.86 ; $p < 0.05$; $n = 5$; Figure 9c). We also evaluated the innate avoidance to TMT (10%) and found that prolonged passive olfactory-exposed animals spent significantly more time in the opposite compartment (125.33 ± 11.90 s, $n = 12$; Figure 9d,e) than control animals (85.67 ± 13.39 s; $p < 0.05$; $n = 12$; Figure 9d,e). Consequently, animals exhibited a negative preference index that was significantly higher in prolonged passive olfactory-exposed animals (-56 ± 11.60 ; $n = 12$; Figure 9f) than control non-implanted animals (-14.50 ± 21.73 s; $p < 0.05$; $n = 12$; Figure 9f).

4 | DISCUSSION

In the present study, we described a profound MOB reconfiguration induced by prolonged passive olfactory experience that can be observed, with slight differences,

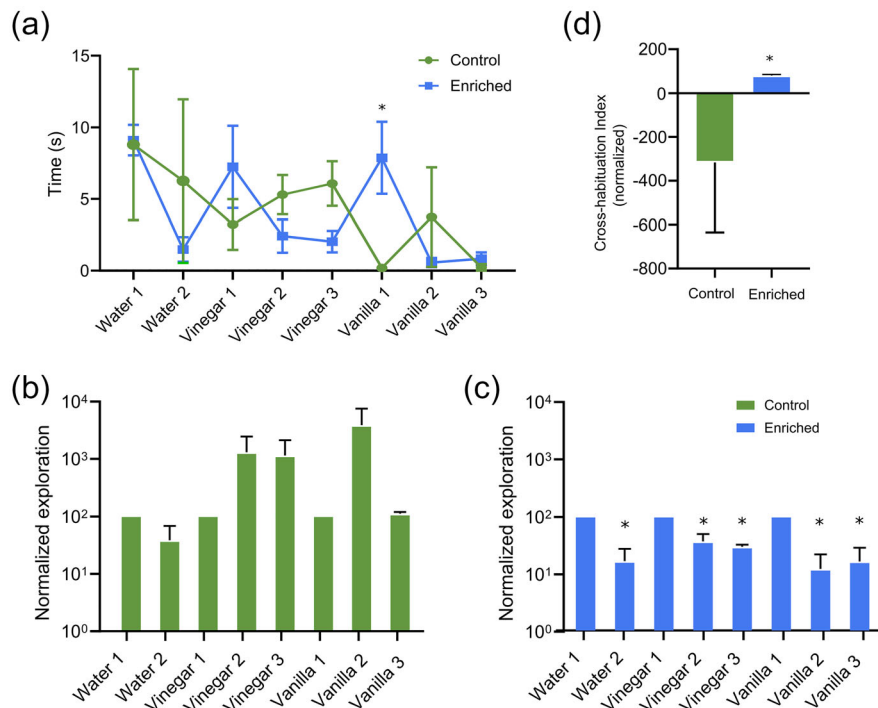


FIGURE 8 Prolonged passive olfactory exposure improves habituation/dishabituation of odours at low concentration in implanted animals. (a) Mean exploration time to the repetitive presentation of distilled water and two odours (vinegar or vanilla) at low concentration (1% v/v, diluted in distilled water) in control and enriched animals. The reduction in exploration upon repetitive presentation of the same odour reflects habituation, whereas the increase in exploration upon the presentation of a new odour reflects the dishabituation. The same habituation/dishabituation tests were quantified as normalized exploratory time (first stimulus of each block set as 100%) for the same control animals (b) and enriched animals (c). The normalized cross-habituation indexes for both groups and odour concentration are also graphed (d). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$

in awake and anaesthetized animals. This reconfiguration impacts MOB input integration at the glomerular layer and MOB population activity (recorded at the granular layer), which correlates with BDNF accumulation. It also improves innate olfactory responses revealed under challenging conditions (low odour concentration).

The prolonged passive olfactory experience used in this study drastically changed the glomerular activation pattern that included an increase in the activated glomerular area and signal intensity, combined with a refinement in the number of activated glomeruli and less-overlapping (i.e., more specific) glomerular maps. Similar increments in glomerular volume after sensory experience have been extensively reported for various odour-exposure protocols in vertebrates and invertebrates (Arenas et al., 2009; Liu et al., 2016; Valle-Leija et al., 2012) and have been associated with increased numbers of mitral and tufted cells (Liu et al., 2016; Rosselli-Austin & Williams, 1990), glomerular interneurons (Bonzano et al., 2016; Bovetti et al., 2009; Busto et al., 2009; Degano et al., 2014; Sachse et al., 2007; Woo et al., 2006), arriving olfactory sensory neuron (OSN)

terminals (Cadiou et al., 2014; Degano et al., 2014; Monjaraz-Fuentes et al., 2017), synapse density (Brown et al., 2004, 2002) and synaptic markers (Inoue et al., 2021). Further research is needed to determine which of these changes are involved in the increased activated glomerular area under our experimental conditions.

As observed in this study, there seems to be a close relationship between the changes in glomerular size induced by olfactory experience and changes in their response intensity (Arenas et al., 2009; Ross & Fletcher, 2018). Here, we found that the increase in glomerular area induced by prolonged passive olfactory experience correlates with a rise in the intensity of the glomerular response (Figure 2). The increase in glomerular intensity upon olfactory experience has been previously reported (Dewaele et al., 2018; Inoue et al., 2021; Sachse et al., 2007; Woo et al., 2007) and might be related to the increase in the amount of arriving terminal axons from OSNs (Cadiou et al., 2014; Degano et al., 2014; Monjaraz-Fuentes et al., 2017) and/or a more efficient OSN transduction signal (Cadiou et al., 2014). Moreover, the increase in glomerular responses after olfactory

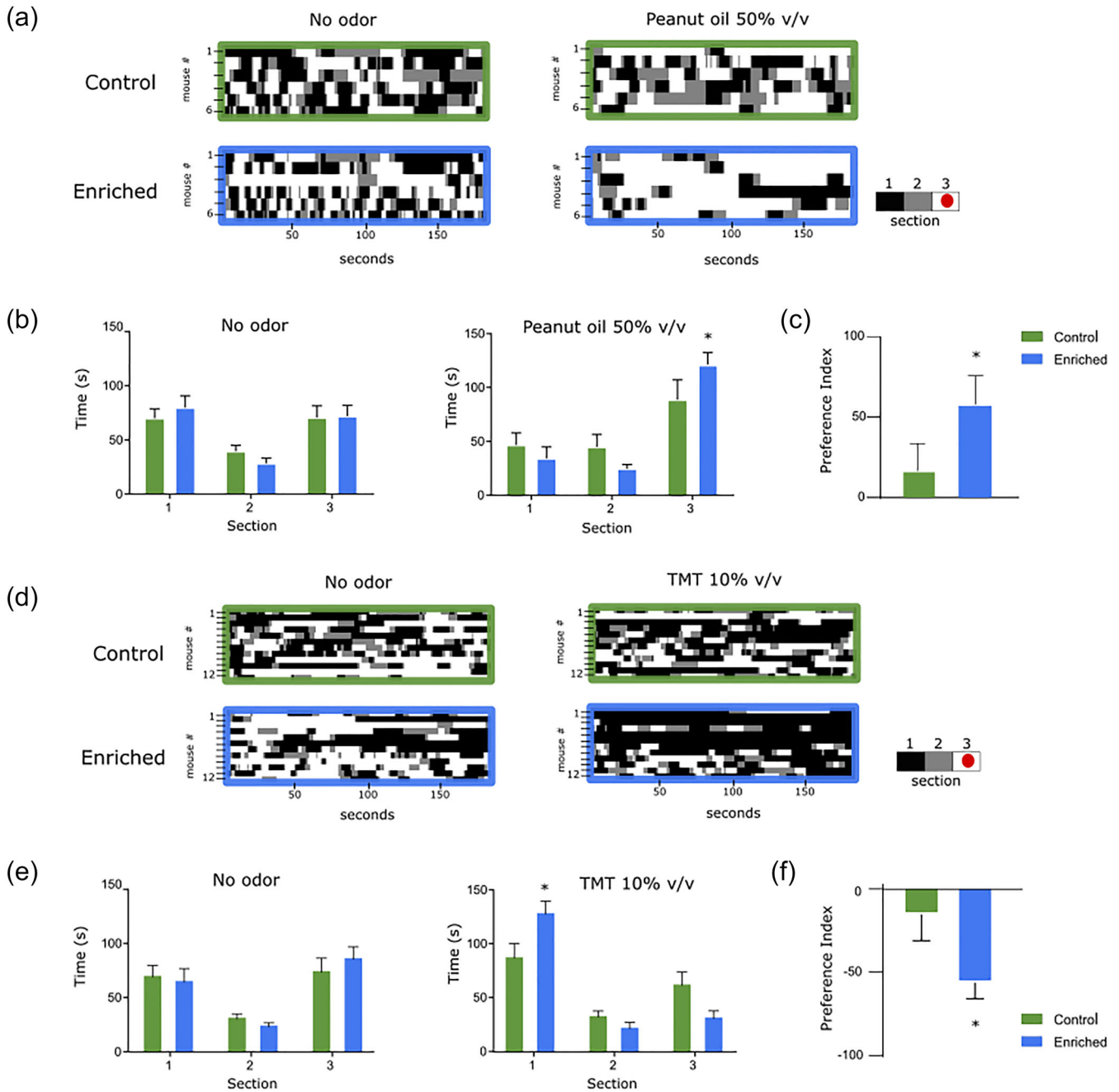


FIGURE 9 Prolonged passive olfactory exposure increases innate olfactory preference and aversion in nonimplanted animals. Raster plots of animal occupancy in each of the three sections of the test box are shown (a,d). The scent (peanut oil 50% v/v [a] or 2,4,5-trimethylthiazole (TMT) 10% v/v [d]) was placed one section (#3) of the test box, as indicated by the red dot in the coloured box on the right. The exploration of each lateral section is also graphed: Left: odourless section; right: section with the attractive or repulsive odours (peanut oil 50% or TMT 10% v/v, respectively) (b,e). The preference index for the attractive (c) and repulsive (f) odours is also graphed for the control animals (green) and prolonged passive olfactory-exposed (enriched; blue) animals. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$

experience can be also due to enhanced responses of glomerular interneurons (Sachse et al., 2007; Mandairon et al., 2008, 2018; Zhou et al., 2016; Geramita & Urban, 2016; Arenkiel et al., 2011; Degano et al., 2014) or more stable synaptic interactions within glomeruli

(Livneh & Mizrahi, 2011). Interestingly, the increase in glomerular interneuron activity would not only enhance glomerular signals but also increase lateral inhibition (Geramita & Urban, 2016; Mandairon et al., 2018; Zhou et al., 2016), which could contribute to the refined and

sparser representation of odours upon olfactory experience (Geramita & Urban, 2016; Mandairon et al., 2018). It has yet to be determined which of these changes participate in the increased glomerular intensity under our experimental conditions.

Here, we found that after prolonged passive olfactory experience in adults, the glomerular maps recruit fewer glomeruli and that are less overlapped between odours. Similarly, previous reports have shown that home-cage ventilation conditions or odour experience can reduce the number of activated glomeruli (Degano et al., 2014; Kerr & Belluscio, 2006; Oliva et al., 2008), and odour experience can accelerate the refinement of the glomerular maps (Degano et al., 2014; Kerr & Belluscio, 2006; Marks et al., 2006), reducing the number of activated glomeruli and increasing the specificity of the glomerular maps (Degano et al., 2014; Kerr & Belluscio, 2006; Marks et al., 2006). This reconfiguration, perhaps occurring during passive odour experience (Arenkiel et al., 2011; Degano et al., 2014; Geramita & Urban, 2016; Mandairon et al., 2008, 2018; Sachse et al., 2007; Zhou et al., 2016), could improve odour discrimination by inducing sparser representations (Geramita & Urban, 2016; Mandairon et al., 2018; Zhou et al., 2016) and less-overlapped functional maps (Mandairon et al., 2018; Mandairon, Stack, & Linster, 2006; Woo et al., 2007), ultimately contributing to improve odour detection and discrimination (Mandairon et al., 2018; Moreno et al., 2009).

Another major change found in this study is that prolonged passive olfactory experience dramatically changes MOB population activity in the presence and absence of odours, which is reflected as a decrease in slow oscillations (<12 Hz) and an increase in fast oscillations (>12 Hz). This shift in the MOB oscillatory pattern, induced by prolonged passive olfactory experience, is contrary to the one observed in some pathological conditions (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2021), which is characterized by 'slowed' MOB population activity (i.e., increase in slow oscillations and decrease in fast ones; Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2021) and is induced in the MOB by either chronic intermittent hypoxia (Hernández-Soto et al., 2021) or amyloid beta (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). Thus, it is likely that the change in MOB activity observed in this study could be reflecting the induction of a neuroprotective state after prolonged passive olfactory experience.

The reduction of slow frequency oscillations after prolonged passive olfactory experience could be related to a decrease in the rhythmic inputs arriving from the olfactory epithelium (Barbour et al., 2008) or the diminished responsiveness of mitral cells to such inputs (Buonviso et al., 1998; Buonviso & Chaput, 2000; Chaudhury

et al., 2010; Kato et al., 2012). The increase in interneuron activity, mostly in the granular layer (Arenkiel et al., 2011; Moreno et al., 2009), could be the basis of the increase in MOB fast rhythms (Boyd et al., 2012), mainly in the gamma range (>30 Hz) induced by repetitive stimulation (Arenkiel et al., 2011; Geramita & Urban, 2016; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, & Linster, 2006; Moreno et al., 2009; Zhou et al., 2016). The increase in beta activity (12–30 Hz) after sensory experience could be influenced by changes in the centrifugal modulation from the piriform cortex (Boyd et al., 2012), a structure that has been scarcely studied after prolonged olfactory experience (Fleming et al., 2019; Jacobson et al., 2018). Interestingly, daily home-cage odour exposure produces an equivalent increase in beta activity in the piriform cortex and improves odour discrimination as active odour training does (Fleming et al., 2019). This finding may indicate that the increase in MOB beta activity and the improvement in olfactory discrimination observed in this study could be similar to those observed during active olfactory learning (Fleming et al., 2019). These possibilities need to be thoroughly explored during the prolonged passive odour experience protocol used in this study.

Most of the plastic changes described so far might be influenced by BDNF overproduction (Degano et al., 2014; McLean et al., 2001; Oliva et al., 2008). As also shown in neonates (Degano et al., 2014), olfactory exposure increases the levels of BDNF after prolonged passive odour experience in adults (Kim et al., 2019). BDNF expression in the olfactory bulb is known to be activity-dependent (Biju et al., 2008; McLean et al., 2001; Yuan, 2008), modulates glomerular architecture (Bergami et al., 2013; Cao et al., 2007) and participates in olfactory refinement, synaptic specialization and reconfiguration of glomerular maps (Degano et al., 2014; Tisay et al., 2000), to the extent that these plastic changes can be abolished by decreasing BDNF levels (Degano et al., 2014; Oliva et al., 2008). So far, we have just shown a correlation between an increase in BDNF levels and MOB reconfiguration, and the specific roles of BDNF on this complex phenomenon need to be deciphered.

Finally, our results indicate that passive olfactory experience increases innate olfactory behaviours such as habituation/dishabituation and innate preference/avoidance. It has been previously shown that prolonged odour experience increases habituation/dishabituation (Inoue et al., 2021; Mandairon et al., 2018), even under challenging conditions (i.e., discrimination between enantiomers; Mandairon et al., 2018). We also found that prolonged passive olfactory experience increases olfaction under challenging conditions; namely, the discrimination of odours at low concentrations. These improvements in

innate olfaction induced by olfactory experience correlate with increased glomerular volume and sensitivity, as well as with increased synaptic markers (Inoue et al., 2021). These are likely mechanisms involved in the reconfiguration described in this study and that need to be thoroughly explored in the future.

5 | CONCLUSION

Our holistic study found that prolonged passive olfactory experience in adult animals produces a dramatic reconfiguration of the MOB network, possibly driven by BDNF, which improves innate olfactory responses through cellular and network mechanisms that are yet to be revealed.

ACKNOWLEDGEMENTS

Rebeca Hernández-Soto, Ana Karen Pimentel-Farfan and Elva Adan-Castro are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships (No. 612139, 463747 and 588869 respectively) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. The authors would like to thank Dr. Benito Ordaz, Dra. María Antonieta Carbajo Mata and Dra. Alejandra Castilla León for their technical support, as well as Jessica González-Norris and Anaïd Antaramian for the editorial comments. This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Grant: AG200521), UNAM, Mexico and Conacyt (Grant: A1-S-7540).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Hernández-Soto R and Peña-Ortega F conceived the study and wrote the manuscript. Hernández-Soto R performed the electrophysiological recordings, intrinsic optical signal imaging and analysis. Pimentel-Farfan AK and Hernández-Soto R performed behavioural tests. Adan-Castro E and Clapp C performed and analysed the western blot analysis and provided the data interpretation. All authors contributed to the revision of the manuscript.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/ejn.15610>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All raw data are available upon request.

ORCID

Rebeca Hernández-Soto  <https://orcid.org/0000-0002-8253-8781>

Ana Karen Pimentel-Farfan  <https://orcid.org/0000-0002-1257-9262>

Fernando Peña-Ortega  <https://orcid.org/0000-0002-0348-4392>

REFERENCES

- Al-Jabri, N. N., & Hossain, M. A. (2014). Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.10.011>
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS ONE*, 8(9), e75745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075745>
- Arbuckle, E. P., Smith, G. D., Gomez, M. C., & Lugo, J. N. (2015). Testing for odor discrimination and habituation in mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 99, e52615. <https://doi.org/10.3791/52615>
- Arenas, A., Giurfa, M., Farina, W. M., & Sandoz, J. C. (2009). Early olfactory experience modifies neural activity in the antennal lobe of a social insect at the adult stage. *The European Journal of Neuroscience*, 30(8), 1498–1508. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06940.x>
- Arenkiel, B. R., Hasegawa, H., Yi, J. J., Larsen, R. S., Wallace, M. L., Philpot, B. D., Wang, F., & Ehlers, M. D. (2011). Activity-induced remodeling of olfactory bulb microcircuits revealed by monosynaptic tracing. *PLoS ONE*, 6(12), e29423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029423>
- Barbour, J., Neuhaus, E. M., Piechura, H., Stoepel, N., Mashukova, A., Brunert, D., Sitek, B., Stühler, K., Meyer, H. E., Hatt, H., & Warscheid, B. (2008). New insight into stimulus-induced plasticity of the olfactory epithelium in *Mus musculus* by quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 7(4), 1594–1605. <https://doi.org/10.1021/pr7005796>
- Bergami, M., Vignoli, B., Motori, E., Pifferi, S., Zuccaro, E., Menini, A., & Canossa, M. (2013). TrkB signaling directs the incorporation of newly generated periglomerular cells in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(28), 11464–11478. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4812-12.2013>
- Biju, K. C., Mast, T. G., & Fadool, D. A. (2008). Olfactory sensory deprivation increases the number of proBDNF-immunoreactive mitral cells in the olfactory bulb of mice. *Neuroscience Letters*, 447(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.050>
- Bonzano, S., Bovetti, S., Fasolo, A., Peretto, P., & de Marchis, S. (2014). Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*, 40(10), 3450–3457. <https://doi.org/10.1111/ejn.12724>
- Bonzano, S., Bovetti, S., Gendusa, C., Peretto, P., & de Marchis, S. (2016). Adult born olfactory bulb dopaminergic interneurons: Molecular determinants and experience-dependent plasticity.

- Frontiers in Neuroscience*, 10, 189. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00189>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006359>
- Boyd, A. M., Sturgill, J. F., Poo, C., & Isaacson, J. S. (2012). Cortical feedback control of olfactory bulb circuits. *Neuron*, 76(6), 1161–1174. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.020>
- Brown, S. M., Napper, R. M., & Mercer, A. R. (2004). Foraging experience, glomerulus volume, and synapse number: A stereological study of the honey bee antennal lobe. *Journal of Neurobiology*, 60(1), 40–50. <https://doi.org/10.1002/neu.20002>
- Brown, S. M., Napper, R. M., Thompson, C. M., & Mercer, A. R. (2002). Stereological analysis reveals striking differences in the structural plasticity of two readily identifiable glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honeybee. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(19), 8514–8522. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08514.2002>
- Buonviso, N., & Chaput, M. (2000). Olfactory experience decreases responsiveness of the olfactory bulb in the adult rat. *Neuroscience*, 95(2), 325–332. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00450-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00450-9)
- Buonviso, N., Gervais, R., Chalansonnet, M., & Chaput, M. (1998). Short-lasting exposure to one odour decreases general reactivity in the olfactory bulb of adult rats. *The European Journal of Neuroscience*, 10(7), 2472–2475. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00266.x>
- Busto, G. U., Elie, J. E., Kermen, F., Garcia, S., Sacquet, J., Jourdan, F., Marcel, D., Mandairon, N., & Didier, A. (2009). Expression of Zif268 in the granule cell layer of the adult mouse olfactory bulb is modulated by experience. *The European Journal of Neuroscience*, 29(7), 1431–1439. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06689.x>
- Cadiou, H., Aoudé, I., Tazir, B., Molinas, A., Fenech, C., Meunier, N., & Grosmaître, X. (2014). Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(14), 4857–4870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0688-13.2014>
- Cao, L., Dhillia, A., Mukai, J., Blazeski, R., Lodovichi, C., Mason, C. A., & Gogos, J. A. (2007). Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition in vivo. *Current Biology: CB*, 17(11), 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.040>
- Chaudhury, D., Manella, L., Arellanos, A., Escanilla, O., Cleland, T. A., & Linster, C. (2010). Olfactory bulb habituation to odor stimuli. *Behavioral Neuroscience*, 124(4), 490–499. <https://doi.org/10.1037/a0020293>
- Cho, J. H., Prince, J. E., Cutforth, T., & Cloutier, J. F. (2011). The pattern of glomerular map formation defines responsiveness to aversive odorants in mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(21), 7920–7926. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2460-10.2011>
- Cornejo-Montes-de-Oca, J. M., Hernández-Soto, R., Isla, A. G., Morado-Urbina, C. E., & Peña-Ortega, F. (2018). Tolfenamic acid prevents amyloid β -induced olfactory bulb dysfunction in vivo. *Current Alzheimer Research*, 15(8), 731–742. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180223091233>
- Darjazi, B. B. (2013). Comparison of peel oil components of grapefruit and lime (*Citrus* sp.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(12), 840.
- Degano, A. L., Park, M. J., Penati, J., Li, Q., & Ronnett, G. V. (2014). MeCP2 is required for activity-dependent refinement of olfactory circuits. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 59, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.01.005>
- Dewaele, A., Persuy, M. A., Badonnel, K., Meunier, N., Durieux, D., Castille, J., Favreau-Peigné, A., & Baly, C. (2018). Chronic perinatal odour exposure with heptaldehyde affects odour sensitivity and olfactory system homeostasis in preweaning mice. *Behavioural Brain Research*, 347, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.026>
- Fleming, G., Wright, B. A., & Wilson, D. A. (2019). The value of homework: Exposure to odors in the home cage enhances odor-discrimination learning in mice. *Chemical Senses*, 44(2), 135–143. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy083>
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (3rd ed.). Academic.
- Geramita, M., & Urban, N. N. (2016). Postnatal odor exposure increases the strength of Interglomerular lateral inhibition onto olfactory bulb tufted cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(49), 12321–12327. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1991-16.2016>
- Grishagin, I. V. (2015). Automatic cell counting with ImageJ. *Analytical Biochemistry*, 473, 63–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.007>
- Heo, C., Park, H., Kim, Y. T., Baeg, E., Kim, Y. H., Kim, S. G., & Suh, M. (2016). A soft, transparent, freely accessible cranial window for chronic imaging and electrophysiology. *Scientific Reports*, 6, 27818. <https://doi.org/10.1038/srep27818>
- Hernández-Soto, R., Rojas-García, K. D., & Peña-Ortega, F. (2019). Sudden Intrabulbar amyloid increase simultaneously disrupts olfactory bulb oscillations and odor detection. *Neural Plasticity*, 2019, 3424906. <https://doi.org/10.1155/2019/3424906>
- Hernández-Soto, R., Villasana-Salazar, B., Pinedo-Vargas, L., & Peña-Ortega, F. (2021). Chronic intermittent hypoxia alters main olfactory bulb activity and olfaction. *Experimental Neurology*, 340, 113653. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113653>
- Inoue, N., Nishizumi, H., Ooyama, R., Mogi, K., Nishimori, K., Kikusui, T., & Sakano, H. (2021). The olfactory critical period is determined by activity-dependent Sema7A/PlxnC1 signaling within glomeruli. *eLife*, 10, e65078. <https://doi.org/10.7554/eLife.65078>
- Isla, A. G., Vázquez-Cuevas, F. G., & Peña-Ortega, F. (2016). Exercise prevents amyloid- β -induced hippocampal network disruption by inhibiting GSK3 β activation. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 52(1), 333–343. <https://doi.org/10.3233/JAD-150352>
- Jacobson, G. A., Rupperecht, P., & Friedrich, R. W. (2018). Experience-dependent plasticity of odor representations in the telencephalon of zebrafish. *Current Biology: CB*, 28(1), 1–14.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.007>
- Kato, H. K., Chu, M. W., Isaacson, J. S., & Komiyama, T. (2012). Dynamic sensory representations in the olfactory bulb:

- Modulation by wakefulness and experience. *Neuron*, 76(5), 962–975. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.037>
- Kerr, M. A., & Belluscio, L. (2006). Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 9(4), 484–486. <https://doi.org/10.1038/nn1673>
- Kim, B. Y., Park, J. Y., Kim, E. J., Kim, B. G., Kim, S. W., & Kim, S. W. (2019). The neuroplastic effect of olfactory training to the recovery of olfactory system in mouse model. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 9(7), 715–723. <https://doi.org/10.1002/alr.22320>
- Lazarini, F., Gabellec, M. M., Moigneu, C., de Chaumont, F., Olivio-Marin, J. C., & Lledo, P. M. (2014). Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(43), 14430–14442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5366-13.2014>
- Lin, D., Shea, S. D., & Katz, L. C. (2006). Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron*, 50(6), 937–949. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.021>
- Liu, A., Savva, S., & Urban, N. N. (2016). Early odorant exposure increases the number of mitral and tufted cells associated with a single Glomerulus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(46), 11646–11653. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-16.2016>
- Livneh, Y., & Mizrahi, A. (2011). Experience-dependent plasticity of mature adult-born neurons. *Nature Neuroscience*, 15(1), 26–28. <https://doi.org/10.1038/nn.2980>
- Machado, C. F., Reis-Silva, T. M., Lyra, C. S., Felicio, L. F., & Malnic, B. (2018). Buried food-seeking test for the assessment of olfactory detection in mice. *Bio-Protocol*, 8(12), e2897. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2897>
- Mandairon, N., Didier, A., & Linster, C. (2008). Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.02.008>
- Mandairon, N., Kuczewski, N., Kermen, F., Forest, J., Midroit, M., Richard, M., Thevenet, M., Sacquet, J., Linster, C., & Didier, A. (2018). Opposite regulation of inhibition by adult-born granule cells during implicit versus explicit olfactory learning. *eLife*, 7, e34976. <https://doi.org/10.7554/eLife.34976>
- Mandairon, N., Stack, C., Kiselycznyk, C., & Linster, C. (2006). Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behavioral Neuroscience*, 120(1), 173–179. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.1.173>
- Mandairon, N., Stack, C., & Linster, C. (2006). Olfactory enrichment improves the recognition of individual components in mixtures. *Physiology & Behavior*, 89(3), 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.07.013>
- Marks, C. A., Cheng, K., Cummings, D. M., & Belluscio, L. (2006). Activity-dependent plasticity in the olfactory intrabulbar map. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(44), 11257–11266. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2805-06.2006>
- 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(3), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.01.002>
- McDole, B., Isgor, C., Pare, C., & Guthrie, K. (2015). BDNF over-expression increases olfactory bulb granule cell dendritic spine density in vivo. *Neuroscience*, 304, 146–160. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.056>
- McLean, J. H., Darby-King, A., & Bonnell, W. S. (2001). Neonatal olfactory sensory deprivation decreases BDNF in the olfactory bulb of the rat. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 128(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(01\)00144-4](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(01)00144-4)
- Miller, J. E., Ayzenshtat, I., Carrillo-Reid, L., & Yuste, R. (2014). Visual stimuli recruit intrinsically generated cortical ensembles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38), E4053–E4061. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406077111>
- Monjaraz-Fuentes, F., Millán-Adalco, D., Palomero-Rivero, M., Hudson, R., & Drucker-Colín, R. (2017). Recovery of glomerular morphology in the olfactory bulb of young mice after disruption caused by continuous odorant exposure. *Brain Research*, 1670, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.030>
- Moreno, M. M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., & Mandairon, N. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17980–17985. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907063106>
- Nitenson, A. S., Nieves, G. M., Poeta, D. L., Bahar, R., Rachofsky, C., Mandairon, N., & Bath, K. G. (2019). Acetylcholine regulates olfactory perceptual learning through effects on adult neurogenesis. *Science*, 322, 544–556. <https://doi.org/10.1126/science.1259116>
- Oliva, A. M., Jones, K. R., & Restrepo, D. (2008). Sensory-dependent asymmetry for a urine-responsive olfactory bulb glomerulus. *The Journal of Comparative Neurology*, 510(5), 475–483. <https://doi.org/10.1002/cne.21800>
- Rattazzi, L., Cariboni, A., Poojara, R., Shoenfeld, Y., & D'Acquisto, F. (2015). Impaired sense of smell and altered olfactory system in RAG-1(-/-) immunodeficient mice. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 318. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00318>
- Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), 2679–2689. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02679.2002>
- Rojas-Libano, D., Frederick, D. E., Egaña, J. I., & Kay, L. M. (2014). The olfactory bulb theta rhythm follows all frequencies of diaphragmatic respiration in the freely behaving rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 214. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00214>
- Ross, J. M., & Fletcher, M. L. (2018). Learning-dependent and -independent enhancement of mitral/tufted cell glomerular odor responses following olfactory fear conditioning in awake mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(20), 4623–4640. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3559-17.2018>

- Rosselli-Austin, L., & Williams, J. (1990). Enriched neonatal odor exposure leads to increased numbers of olfactory bulb mitral and granule cells. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 51(1), 135–137. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90267-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90267-3)
- Rubin, B. D., & Katz, L. C. (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, 23(3), 499–511. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80803-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80803-x)
- Rusznák, Z., Sengul, G., Paxinos, G., Kim, W. S., & Fu, Y. (2018). Odor enrichment increases hippocampal neuron numbers in mouse. *Experimental Neurobiology*, 27(2), 94–102. <https://doi.org/10.5607/en.2018.27.2.94>
- Sachse, S., Rueckert, E., Keller, A., Okada, R., Tanaka, N. K., Ito, K., & Vosshall, L. B. (2007). Activity-dependent plasticity in an olfactory circuit. *Neuron*, 56(5), 838–850. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.035>
- Saito, H., Nishizumi, H., Suzuki, S., Matsumoto, H., Ieki, N., Abe, T., Kiyonari, H., Morita, M., Yokota, H., Hirayama, N., Yamazaki, T., Kikusui, T., Mori, K., & Sakano, H. (2017). Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. *Nature Communications*, 8, 16011. <https://doi.org/10.1038/ncomms16011>
- Shapiro, L. A., Ng, K. L., Zhou, Q. Y., & Ribak, C. E. (2007). Olfactory enrichment enhances the survival of newly born cortical neurons in adult mice. *Neuroreport*, 18(10), 981–985. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3281532bc1>
- Steinzeig, A., Molotkov, D., & Castrén, E. (2017). Chronic imaging through "transparent skull" in mice. *PLoS ONE*, 12(8), e0181788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181788>
- Takahashi, H., & Tsuboi, A. (2017). Olfactory habituation-dishabituation test (mouse). *Bio-Protocol*, 7(5), e2154. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2154>
- Tisay, K. T., Bartlett, P. F., & Key, B. (2000). Primary olfactory axons form ectopic glomeruli in mice lacking p75NTR. *The Journal of Comparative Neurology*, 428(4), 656–670. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001225\)428:4<656::aid-cne6>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001225)428:4<656::aid-cne6>3.0.co;2-7)
- 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 Biological Sciences*, 278(1714), 1949–1955. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2314>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035358>
- Vincis, R., Gschwend, O., Bhaukaurally, K., Beroud, J., & Carleton, A. (2012). Dense representation of natural odorants in the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 15(4), 537–539. <https://doi.org/10.1038/nn.3057>
- Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., & Wilson, D. A. (2010). Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(2), 505–514. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4622-09.2010>
- Witt, R. M., Galligan, M. M., Despinoy, J. R., & Segal, R. (2009). Olfactory behavioral testing in the adult mouse. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 23, 949. <https://doi.org/10.3791/949>
- Woo, C. C., Coopersmith, R., & Leon, M. (1987). Localized changes in olfactory bulb morphology associated with early olfactory learning. *The Journal of Comparative Neurology*, 263(1), 113–125. <https://doi.org/10.1002/cne.902630110>
- Woo, C. C., Hingco, E. E., Johnson, B. A., & Leon, M. (2007). Broad activation of the glomerular layer enhances subsequent olfactory responses. *Chemical Senses*, 32(1), 51–55. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjl035>
- Woo, C. C., Hingco, E. E., Taylor, G. E., & Leon, M. (2006). Exposure to a broad range of odorants decreases cell mortality in the olfactory bulb. *Neuroreport*, 17(8), 817–821. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000215780.84226.2d>
- Wu, J., Liu, P., Chen, F., Ge, L., Lu, Y., & Li, A. (2020). Excitability of neural activity is enhanced, but neural discrimination of odors is slightly decreased, in the olfactory bulb of fasted mice. *Genes*, 11(4), 433. <https://doi.org/10.3390/genes11040433>
- Yang, M., & Crawley, J. N. (2009). Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current Protocols in Neuroscience*, 48(1), 8.24.1–8.24.12. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>
- Yuan, T. F. (2008). BDNF signaling during olfactory bulb neurogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(20), 5139–5140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1327-08.2008>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00010>

How to cite this article: Hernández-Soto, R., Pimentel-Farfan, A. K., Adan-Castro, E., Clapp, C., & Peña-Ortega, F. (2022). Main olfactory bulb reconfiguration by prolonged passive olfactory experience correlates with increased brain-derived neurotrophic factor and improved innate olfaction. *European Journal of Neuroscience*, 1–21. <https://doi.org/10.1111/ejn.15610>

Alterations in Piriform and Bulbar Activity/Excitability/Coupling Upon Amyloid- β Administration *in vivo* Related to Olfactory Dysfunction

Ignacio Martínez-García, Rebeca Hernández-Soto, Benjamín Villasana-Salazar, Benito Ordaz and Fernando Peña-Ortega*

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla, México

Accepted 16 December 2020

Pre-press 14 January 2021

Abstract.

Background: Deficits in odor detection and discrimination are premature symptoms of Alzheimer's disease (AD) that correlate with pathological signs in the olfactory bulb (OB) and piriform cortex (PCx). Similar olfactory dysfunction has been characterized in AD transgenic mice that overproduce amyloid- β peptide (A β), which can be prevented by reducing A β levels by immunological and pharmacological means, suggesting that olfactory dysfunction depends on A β accumulation and A β -driven alterations in the OB and/or PCx, as well as on their activation. However, this possibility needs further exploration.

Objective: To characterize the effects of A β on OB and PCx excitability/coupling and on olfaction.

Methods: A β oligomerized solution (containing oligomers, monomers, and protofibrils) or its vehicle were intracerebroventricularly injected two weeks before OB and PCx excitability and synchrony were evaluated through field recordings *in vivo* and in brain slices. Synaptic transmission from the OB to the PCx was also evaluated in slices. Olfaction was assessed through the habituation/dishabituation test.

Results: A β did not affect lateral olfactory tract transmission into the PCx but reduced odor habituation and cross-habituation. This olfactory dysfunction was related to a reduction of PCx and OB network activity power *in vivo*. Moreover, the coherence between PCx–OB activities was also reduced by A β . Finally, A β treatment exacerbated the 4-aminopyridine-induced excitation in the PCx in slices.

Conclusion: Our results show that A β -induced olfactory dysfunction involves a complex set of pathological changes at different levels of the olfactory pathway including alterations in PCx excitability and its coupling with the OB. These pathological changes might contribute to hyposmia in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, coherence, hyperexcitability, local field potential, main olfactory bulb, olfactory function, piriform cortex

INTRODUCTION

Olfactory processing relies on a recurrent network pathway that relays first in the olfactory bulb (OB) and then in the piriform cortex (PCx) [1–3]. Disruption of either of these circuits impairs odor perception [1–3], which is an early sign of Alzheimer's disease

*Correspondence to: Fernando Peña-Ortega, PhD. Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, QRO, 76230, México. E-mail: jfpena@unam.mx.

(AD) [4, 5]. Olfactory dysfunction in AD precedes cognitive impairments [5–7] and includes deficits in odor detection and discrimination, possibly due to alterations in different olfactory circuits [7–11]. Similar olfactory dysfunctions observed in AD transgenic mice that overproduce amyloid- β peptide (A β) [12–15] correlate with neuroanatomical changes in the OB and PCx [16–20].

Histopathological markers of AD are observed throughout the olfactory pathway [21–23]. Neurofibrillary tangles [21, 24] and A β deposits observed in the OB and PCx [23, 24] correlate with clinical symptoms in AD patients [22]. A similar scenario, but with some variability, can be found in AD transgenic mice that overproduce A β [19, 25–28]. For instance, A β deposition in the OB and PCx has been observed in Tg2576 transgenic mice [28, 29] and APP/PS1 double transgenic mice [16, 30]. Alternatively, triple transgenic mice (3xTg-AD) exhibit A β accumulation in the PCx but not in the OB [31], while PLB4 transgenic mice exhibit A β oligomer accumulation in the PCx, with no signs of plaque deposition [32]. Despite the differences in A β presence, these AD transgenic mice exhibit olfactory dysfunctions [26, 28–32].

Olfactory dysfunction in AD transgenic mice that overproduce A β can be prevented by reducing A β levels or neutralizing A β through pharmacological means [28, 33] or immunization [34, 35], respectively, suggesting that olfactory dysfunction in AD transgenic mice depends on A β accumulation [28, 34–36]. To further support the notion that A β is responsible for olfactory dysfunction in AD, we have shown that direct intrabulbar microinjection of A β oligomers [37–39] induces a reduction in odor detection [37, 39], a function that mostly relies on the OB [40–42]. Interestingly, A β oligomers also reduce odor habituation and discrimination [38, 39], which rely on both PCx activity and PCx–OB recurrent interactions [40–42].

Odor habituation and discrimination are affected in AD patients [43] and AD transgenic mice that overproduce A β [29, 33–36], which correlates with 1) A β accumulation in the PCx [29, 33, 35, 36], 2) functional imaging alterations in the PCx [43, 44] and 3) hyper- and hypoexcitability in the PCx of AD transgenic mice that overproduce A β [28]. Thus, it is likely that A β could directly affect PCx excitability and/or its interaction with the OB. To test this possibility, we evaluated the effects of A β on PCx activity (simultaneously recorded with the OB), PCx–OB interactions and on their excitability. We found that A β intracerebroventricular administration

reduces odor habituation and discrimination while reducing PCx and OB network activity and their coherence. We also found that A β exacerbates the PCx response to the pro-convulsant 4-aminopyridine (4-AP) [45–47].

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology at UNAM and were performed in accordance with the guidelines of the Official Mexican Norm for the Use and Care of Laboratory Animals (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) and the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH publication 80–23, Bethesda, MD, USA, 1996).

Subjects

Adult CD1 mice (8 weeks old; 30–35 g) were obtained from the breeding colony of the animal facility at the Institute of Neurobiology, UNAM. The mice were housed in groups of 3–4 animals in transparent acrylic cages and maintained in a *vivarium* with controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), as well as with food and water *ad libitum*. Animals were kept under a normal 12 h light–12 h dark cycle.

A β preparation

A β_{1-42} was obtained from American Peptide (Sunnyvale, CA). Oligomerization was performed as previously described [39, 48]. Briefly, solid A β_{1-42} peptide was dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) at a final peptide concentration of 1 mM and incubated for 60 min at room temperature. HFIP was evaporated overnight, and DMSO was added to prepare a 5 mM solution. Such solution was then diluted with F12 medium to reach a final concentration of 100 μM . This solution was incubated at 5°C for 24 h and then centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 10 min. The supernatant was collected and maintained at 4°C until used for experiments. The composition of the oligomerized A β_{1-42} solution used for this study was corroborated with standard electrophoresis followed by silver staining, which exhibits the presence of A β oligomers, monomers, and protofibrils (Fig. 1C; inset) [39, 48]. For this study, we administered A β into the cerebrospinal fluid (CSF) at a dose of 500 pmoles [49]. We

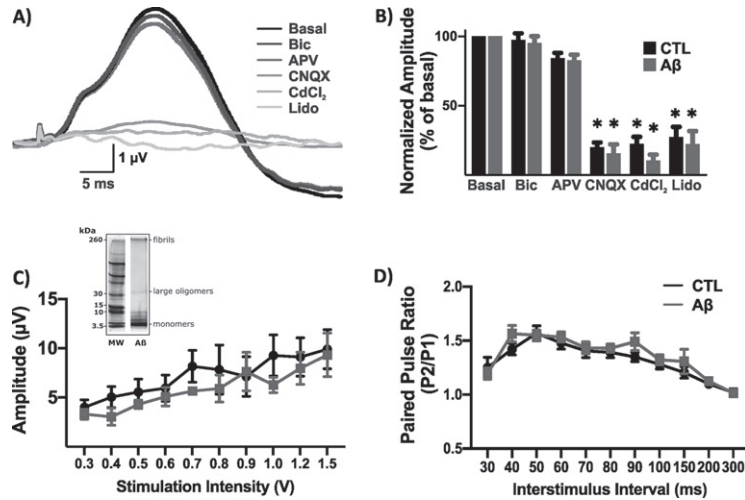


Fig. 1. Synaptic transmission from the OB to the PCx *ex vivo* is not affected by intracerebral A β injection. A) Representative fEPSPs recorded in the PCx layer II evoked by LOT stimulation (in OB-PCx slices) under basal conditions and in the presence of synaptic blockers as follows: bicuculline (Bic) 50 μ M, APV 100 μ M, CNQX 6 μ M, CdCl₂ 200 μ M, and lidocaine 1 mM (Lido). B) Quantification of the remnant of the normalized fEPSP amplitude (basal set as 100%) after the sequential application of synaptic blockers in slices obtained from control animals (injected with F12 medium; CTL; black) and from A β -injected animals (gray). * p < 0.05 denotes a significant difference versus basal. C) Stimulus-response curves of the EPSPs recorded in slices obtained from CTL and A β -injected animals (same color code). Inset: Silver-stained gel of the electrophoretic pattern of the A β oligomerized solution (right lane; monomers, dimers, trimers/tetramers, and heptamers/octamers are the main oligomeric forms) along with a molecular-weight (MW) size marker (left lane). D) Paired pulse ratio (P2/P1) as a function of the interstimulus interval (ISI) in slices obtained from CTL and A β -injected animals (same color code). No differences were observed between the groups in any of the stimulation intensities or interstimulus intervals used.

chose this dose based on three previous experimental observations. First, we showed that 200 pmoles of A β induces olfactory dysfunction when applied directly into the OB [37, 39]. Secondly, we already know that, when applied into the CSF, increasing A β dose by 2.5-fold produces similar effects than those induced by its local application [50, 51]. Moreover, intraventricular injection of A β 500 pmoles is enough to induce olfactory dysfunction in mice, by reaching different circuits, while a lower dose did not induce alterations [49].

A β administration, electrode implantation, and recording *in vivo*

Animals were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg) (*i.p.*). Mice were also administered (*s.c.*) saline solution (0.9%) (15 ml/Kg). After verifying anesthesia depth (absence of tail pinch and pedal reflexes), animals were affixed to a stereotaxic frame (Stoelting Co. IL). A β (500 pmoles) or its vehicle (F12 medium) was intracerebroventricularly microinjected at the following coordinates: AP = -0.2, L = \pm 1, V = 2.5 [52]. A stainless-steel needle connected to a Hamilton microsyringe (10 μ l) (Hamilton Company) by

plastic tubing was used for the microinjection. An infusion volume of 5 μ l at 0.5 μ l/min was controlled by a microinfusion pump (WPI 220i). After the infusion, the needle remained inside the ventricle for at least 5 min to ensure proper diffusion of the injected content. A subgroup of injected animals was sutured, treated with an analgesic (meloxicam; 2 mg/kg; *i.m.*), and allowed to recover from the surgical procedure for 2 weeks before any behavioral or electrophysiological evaluation. After microinjection of either A β or its vehicle, a subgroup of injected animals was implanted with recording electrodes, as follows, to perform electrophysiological evaluations *in vivo* while awake. A bipolar electrode, made of two parallel strands of stainless steel (California Fine Wire), insulated except for their tip, was implanted into the PCx at the following coordinates: AP = 1.94, L = \pm 2.1, V = 4.8 [52]. A second bipolar electrode, with identical characteristics, was implanted into the OB at the following coordinates: AP = 4.8, L = \pm 0.7, V = 1.6 [52]. These electrodes were attached to a male connector pin for subsequent connection to the electrophysiological recording system. Two stainless steel screws were threaded into the cranium over the cerebellum (coordinates AP = -10.0, L = \pm 3.0 and V = 1.0) to ground the signal and support the

implanted electrodes. The arrangement of electrodes, screws and connector was fixed to the skull with dental acrylic (MDC Dental-NicTone R3V). Animals were treated with an analgesic (meloxicam; 2 mg/kg; i.m.) and allowed to recover from the surgical procedure for 2 weeks before any further experimental manipulation.

Electrophysiological recordings in vivo

Two weeks after A β or F12 medium was administered, the local field potential (LFP) was simultaneously measured in the OB and PCx while animals were freely moving. These animals were introduced into a new cage, with identical characteristics as their home cage but with clean sawdust, located inside a Faraday cage. LFPs were recorded for 30 min while animals remained at rest in this new cage. The signals were amplified, filtered (high-pass, 0.1 Hz; low-pass, 0.75 kHz; Grass Instruments) and digitized at 10 kHz (Digidata, Molecular Devices).

OB-PCx slice preparation

Two weeks after either A β or F12 medium was administered, the non-implanted animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with cold modified artificial cerebrospinal fluid (aCSF), containing 238 mM sucrose, 3 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4 and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). The brain was extracted and dissected in ice-cold normal aCSF containing 119 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4 and bubbled with carbogen. OB-PCx slices were obtained as previously described [53]. Briefly, one hemisphere was mounted on a plastic block, with the characteristics described by McGinley and Westbrook [53], to obtain a single parasagittal 400 μ m thick slice preserving the connectivity between the ventral anterior PCx and the OB through the lateral olfactory tract (LOT). The slices were allowed to recover in bubbled aCSF at room temperature for at least 60 min before any experimental manipulation.

Electrophysiological recordings in vitro

For LFP recordings, brain slices were transferred to a chamber that was continuously perfused with oxygenated aCSF maintained at 30–32°C. LFP was recorded with borosilicate electrodes (1 M Ω) filled

with aCSF and positioned on anterior PCx layer II and the OB granular cell layer [37]. LFP was recorded for 20 min to obtain the basal network activity in both structures. Thereafter, 4-AP (100 μ M) [47, 54] was added to the bath and its effects were evaluated for 45 min. Finally, 1 mM lidocaine was applied to block neural activity and confirm the viability of each slice [55]. The signals were amplified, filtered (high-pass, 0.1 Hz; low-pass, 0.75 kHz; Grass Instruments) and digitized at 10 kHz (Digidata, Molecular Devices).

Synaptic transmission between the OB and PCx, and its short-term plasticity, was evaluated by recording the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) using the paired pulse protocol *in vitro* [55, 56], in slices obtained from A β and F12 medium microinjected animals. In the same OB-PCx slices, a concentric bipolar platinum electrode (75 μ m diameter at the tip) was placed on the LOT, near its origin in the OB, while evoked fEPSPs were recorded in PCx layer II upon LOT voltage square pulse (100 μ s, 0.1 Hz) stimulation. Any given stimulation was repeated 5 times and the averaged fEPSP was included in each data set. The stimulus intensity was increased from 0.3 to 1.5 V (by 0.1 V steps) to evaluate the input/output (I/O) relationship in this synaptic connection [55, 56]. With the stimulus intensity adjusted to induce an fEPSP with 30–50% of the maximal amplitude, paired pulses were applied with an interstimulus interval (ISI) between 30 ms and 300 ms to evaluate the short-term plasticity of this synaptic connection [55, 56]. The paired pulse ratio (PPR) was calculated as follows: P2/P1, where P2 is the amplitude of the second fEPSP and P1 is the amplitude of the first one [55, 56]. After recording the fEPSP under basal conditions, at 30–50% of the maximal amplitude, several drugs were bath applied to evaluate the synaptic components of the fEPSP. To reveal a contribution of GABA_A-dependent transmission to the fEPSP, we bath applied its antagonist bicuculline (Bic 50 μ M; Sigma-Aldrich) [57, 58] and measured its effect for 10 min. Then, to evaluate the contribution of NMDA glutamate receptors to the fEPSP, we bath applied their antagonist APV (100 μ M; Sigma-Aldrich) [59, 60] and measured its effect for 10 min. To evaluate the contribution of non-NMDA glutamate receptors to the fEPSP, we bath applied their antagonist CNQX (6 μ M; Sigma-Aldrich) [61, 62] and measured its effect for 10 min. In an independent set of experiments, performed in OB-PCx slices obtained from naïve animals, the same set of fEPSPs and evaluations were recorded under control conditions as well as 60 min after the continuous presence of A β (30 nM)

in the recording bath. At the end of all evaluations, CdCl₂ (200 μ M) and lidocaine (1 mM) were sequentially added to the bath to block synaptic transmission and neural activity, respectively [63]. The signals were amplified, filtered (high-pass, 0.1 Hz; low-pass, 0.75 kHz; Grass Instruments) and digitized at 10 kHz (Digidata, Molecular Devices).

Habituation/dishabituation test

Odor habituation and discrimination were evaluated through the habituation-dishabituation test, as described previously [38]. Briefly, mice were habituated to the experimental cage for 30 min. Next, a swab attached to a removable holder was presented at the side of the cage for 3 min. The tip of the swab was impregnated with either water (5 μ l) or an odor (acetic acid or vanilla; 5 μ l). This procedure was repeated several times with 1 min intervals. In the first two exposures the swab contained water. In the third trial the swab randomly contained either acetic acid (100% v/v; Herdez Company) or vanilla odor (100 % v/v; Herdez Company). The odor selected for the third trial was repeated in the fourth and fifth trials (always with 1 min intervals between trials), constituting an odor block. At the end of the first odor block, in the sixth trial, the other odor was presented. The odor selected for the sixth trial was repeated in the seventh and eighth trials (second odor block). To quantify the exploration time of each stimulus, exploration was considered when the mouse's nose remained sniffing within 2 cm of swab. The habituation phase of the test evaluates the reduction in time that mice spend smelling on each repeated stimulus with the same odor, whereas the dishabituation phase of the test evaluates whether the mice were able to spontaneously recognize a novel odorant stimulus by spending more time smelling the swab that contains it [38].

Data analysis and statistics

Data distribution was assessed with the Shapiro-Wilk normality test. When the assumptions for parametric testing were not reached, non-parametric tests were used. Electrophysiological recordings were analyzed off-line. The amplitude of the fEPSP was measured from the end of the stimulus artifact to the fEPSP peak with Clampfit software (v.10.7, Molecular Devices). For the pharmacological experiments, the amplitude of the fEPSP recorded under basal conditions was set as 100% and the amplitude of

the subsequent fEPSP in the presence of any drug was measured as % of basal. For statistical comparisons of these pharmacological experiments, an ANOVA test followed by Dunnett's correction was performed. For the comparisons of the I/O curves or the PPR curves of both experimental groups (F12 medium versus A β) we used a two-way ANOVA test. To compare the effects of A β bath application on fEPSP amplitude or PPR, we used a *t*-test for independent groups.

For the spontaneous network activity, a power spectrum analysis was performed using the Rapid Fourier Transform Algorithm with a Hamming window using Clampfit. Ten segments (10 s long) were analyzed and averaged. The power of the broad-frequency band (1–55 Hz) of each individual experiment under basal conditions (i.e., activity before 4-AP application) was set as 100% and the activity in the presence of 4-AP 100 μ M was quantified as % of basal. Then, a Mann-Whitney U test was performed to compare the power before and after 4-AP application. Spontaneous population spikes induced by 4-AP were detected manually and their amplitude and frequency were measured with Clampfit. The power of population spikes was also normalized to basal condition (defined as the 100%) and analyzed using a Mann-Whitney U test. The *in vivo* LFP power spectra were segmented into the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz). Aside from raw power, relative power was calculated as the percentage contributed by each frequency to the total power in the broad-frequency band (1–55 Hz). These data were analyzed with the Mann-Whitney U test. The coherence between the activities of the OB and the PCx was measured using the function “mscohere” in MATLAB software (R2020a). Coherence was averaged in the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz). Coherence was analyzed with an ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons.

Behavioral parameters were analyzed using a two-way ANOVA followed by Fisher's LSD *post-hoc* test to evaluate the habituation between the first odor stimulus and the last stimulus of each odor block and the cross-habituation comparing the third odor stimulus of a block with the first stimulus of the second block. The cross-habituation index was also calculated by subtracting the normalized exploratory time of the last stimulus of an odor block to the normalized investigatory time of the next odor block [33]. These cross-habituation values were compared using a Mann-Whitney U test. GraphPad Prism

(version 8.0) software was used for graphs and statistical analysis. Data are presented as the mean \pm EEM. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Synaptic transmission between the OB and the PCx is not affected by injection of A β in vivo

Stimulation of the LOT in OB-PCx slices evoked a typical glutamatergic fEPSP in PCx layer II (Fig. 1A), which was mediated by non-NMDA receptors, but not by NMDA receptors, and with no contribution of GABAergic transmission (Fig. 1A, B). This fEPSP was blocked by bath application of the non-NMDA glutamate receptor CNQX 6 μ M ($p < 0.05$, $n = 5$; Fig. 1A, B), but was not altered by the previous sequential application of the GABA_A antagonist bicuculline 50 μ M ($p = 0.9$, $n = 5$; Fig. 1A, B) and the NMDA glutamate receptor antagonist APV 100 μ M ($p = 0.9$, $n = 5$; Fig. 1A, B). As expected, the fEPSP was blocked by the bath application of both CdCl₂ 200 μ M and lidocaine 1 mM ($p < 0.05$, $n = 5$; Fig. 1A, B). As mentioned, CNQX 6 μ M caused a significant decrease in the fEPSP amplitude of $79 \pm 7\%$ in the control group (injected with F12 medium) and $84 \pm 7\%$ in the group injected with A β ($p < 0.05$, $n = 5$; Fig. 1B). These reductions in fEPSP amplitude induced by CNQX were not different between groups ($p > 0.05$, $n = 5$; Fig. 1B). No significant differences were observed between groups in the presence of any of the other transmission blocker tested ($p > 0.05$, $n = 5$; Fig. 1B). The A β group was previously injected intracerebroventricularly with an oligomerized solution containing oligomers, monomers and protofibrils (Fig. 1C; inset) [39, 48].

In order to evaluate the consequences of A β exposure *in vivo* on synaptic transmission in the OB-PCx connection *ex vivo* (in slices), the I/O relationships were evaluated in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium) and A β -injected animals (Fig. 1C). We found no significant differences in the I/O relationships between groups ($p = 0.9$, $n = 9$; Fig. 1C). In order to evaluate the effects of A β exposure *in vivo* on short-term plasticity of the OB-PCx connection *ex vivo*, the PPR as a function of inter-stimulus interval (ISI) relationships were evaluated in slices obtained from control animals (injected with F12 medium) and A β -injected animals (Fig. 1D). We found no significant differences in the PPR/ISI relationships between groups ($p = 0.8$, $n = 9$; Fig. 1D).

Synaptic transmission between the OB and the PCx is not affected by acute application of A β in vitro

Considering that A β microinjection *in vivo* did not affect synaptic transmission between the OB and the PCx two weeks after its application, we evaluated the sensitivity of this connection to the bath application of A β *in vitro*. In OB-PCx slices obtained from naïve animals, the amplitude of the fEPSP recorded in the PCx layer-II exhibited an amplitude of $6.7 \pm 0.7 \mu$ V (Fig. 2A, C) and a PPR of 1.5 ± 0.07 (Fig. 2A, B) which remained unaltered 1 h after the continuous presence of A β 30 nM, since the fEPSP maintained an amplitude of $6.8 \pm 0.7 \mu$ V ($101 \pm 4\%$ of basal; $p > 0.7$, $n = 7$; Fig. 2A-D) and a PPR of 1.5 ± 0.09 ($p > 0.9$, $n = 7$; Fig. 2A, B).

A β in vivo treatment exacerbates 4-AP-induced hyperexcitability only in the PCx ex vivo

To evaluate the effect of A β on PCx excitability we recorded its spontaneous LFP and induced hyperexcitation by bath application of 4-Aminopyridine (4-AP 100 μ M) [47, 54]. Bath application of 4-AP induces hyperexcitation in slices obtained from control animals (injected with F12 medium) and A β -injected animals (Fig. 3A), leading to the generation of spontaneous population spikes in the PCx, more potently in slices obtained from A β -injected animals than in slices obtained from control animals (Fig. 3A). In the slices obtained from A β -injected animals, the 4-AP-induced population spikes exhibited a significantly higher amplitude ($200.9 \pm 58.3 \mu$ V; $n = 8$; Fig. 3C), frequency (0.18 ± 0.04 Hz; $n = 8$; Fig. 3D) and increase in power ($7.8 \pm 4.0 \times 10^4\%$ of basal; $n = 8$; Fig. 3B) than the population spikes obtained from control animals ($70.1 \pm 16.8 \mu$ V, 0.07 ± 0.02 Hz and $7.3 \pm 2.8 \times 10^3\%$ of basal, respectively, $n = 9$; $p < 0.05$; Fig. 3).

In contrast to what we observed in the PCx, 4-AP-induced hyperexcitation tended to be smaller in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium) than slices obtained from A β -injected animals (Fig. 4). In the OB, 4-AP-induced excitation lead to medium-voltage slow activity that increased the power to $3.2 \pm 2.4 \times 10^4\%$ of basal in OB-PCx slices obtained from control animals, which was higher but not significantly different ($p = 0.1$) than the increase in power (to $2.2 \pm 1.1 \times 10^3\%$ of basal) in OB-PCx slices obtained from A β -injected animals.

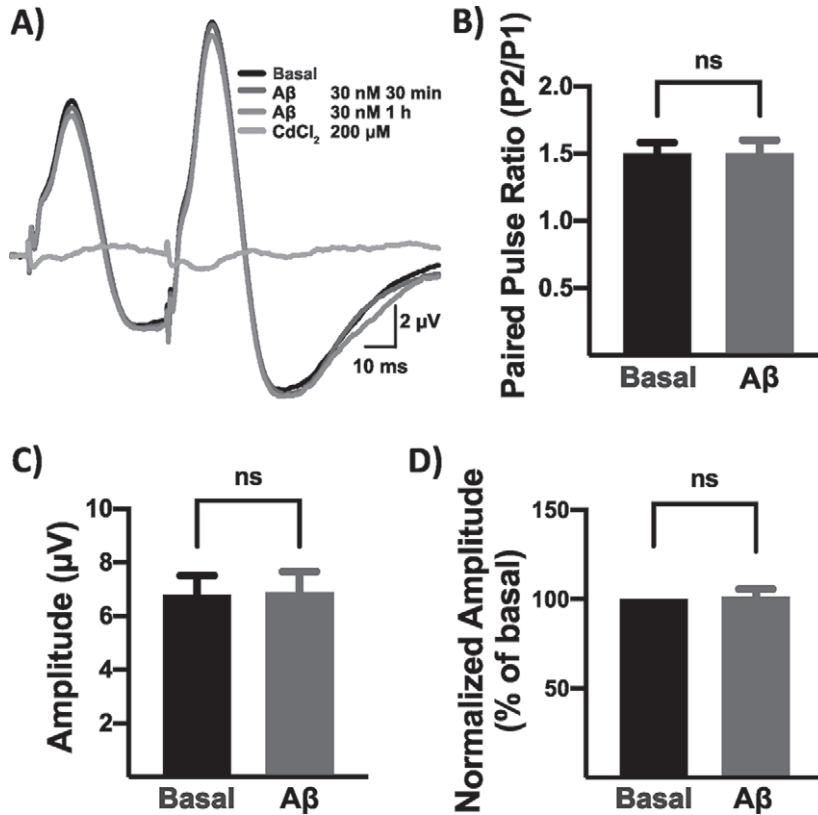


Fig. 2. Synaptic transmission from the OB to the PCx is not sensitive to A β application *in vitro*. A) Representative fEPSPs recorded in the PCx layer II evoked by a paired LOT stimulation (in OB-PCx slices) under basal conditions 30 min and 1 h after A β 30 nM bath application and after CdCl₂ 200 μ M application. B) Quantification of the paired pulse ratio of the paired fEPSPs recorded under basal conditions and 1 h after A β application. C) Quantification of the fEPSP amplitude of the first EPSP recorded under basal conditions and 1 h after A β application. D) Normalized fEPSP amplitude recorded under basal conditions (set as 100%) and 1 h after A β application. "ns" ($p > 0.05$) denotes the absence of a significant difference between conditions.

OB and PCx network activity and coherence are depressed by injection of A β *in vivo*

When we evaluated the effect of A β injection *in vivo* on the spontaneous LFP in freely moving animals, we observed that two weeks after A β administration the activity of both the OB and the PCx exhibited a reduction in amplitude (Fig. 5A). The quantification of power in the theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz) frequency bands exhibited a significant reduction in A β -injected animals compared to control animals (injected with F12 medium) ($p < 0.05$, $n = 15$; Fig. 5B, D). However, no differences in the delta frequency band (<3 Hz) were observed between groups ($p > 0.1$, $n = 15$; Fig. 5B, D). Moreover, the relative power in all frequency bands did not show differences between groups ($p > 0.2$, $n = 15$; Fig. 5C, E).

As a proxy for functional communication between the OB and the PCx, we evaluated the effect of A β administration *in vivo* on their synchrony in freely moving animals. For this purpose, we measured the coherence of both signals (Fig. 6) and found that the coherence of OB-PCx activities was reduced in A β -injected animals in the fast frequency components of the spectrum (Fig. 6A). The control group showed a coherence value of 0.30 ± 0.01 for the beta frequency band (13–35 Hz), which was significantly higher than the coherence recorded in A β -injected animals (0.19 ± 0.01 ; $p = 0.02$, $n = 15$; Fig. 6B). This was similar for the gamma frequency band (36–55 Hz), as the control group showed a coherence value of 0.29 ± 0.03 , which was significantly higher than the coherence recorded in A β -injected animals (0.18 ± 0.01 ; $p = 0.04$, $n = 15$; Fig. 6B). In addition, the theta band showed a

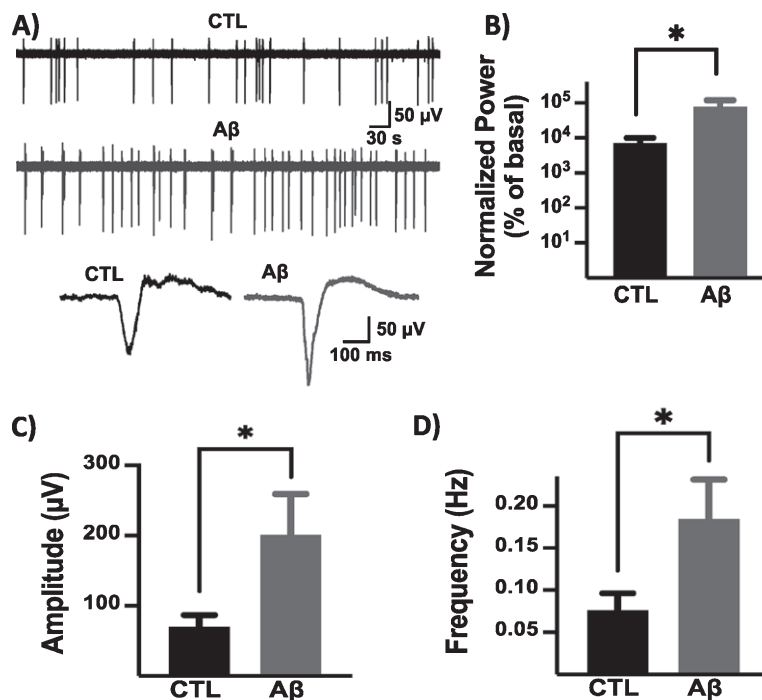


Fig. 3. A β treatment exacerbates 4-AP-induced hyperexcitability in the PCx. A) Representative traces of the PCx local field potential in the presence of 4-AP (100 μ M) in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium; CTL; upper trace) and A β -injected animals (A β ; middle trace). The lower traces showed a representative population spike from each group. B) Normalized population spike power measured as % of basal activity (set as 100%) for the CTL (black) and A β (gray) groups. C) Mean amplitude of the population spikes for both groups (same color code). D) Quantification of the population spike frequencies for both groups (same color code). * $p < 0.05$ denotes a significant difference between experimental groups.

tendency toward a lower coherence value for the A β -injected group (0.25 ± 0.01) compared to the control group (0.35 ± 0.03 ; $p = 0.052$, $n = 15$; Fig. 6B).

A β disrupts odor habituation and discrimination

Since proper communication between the OB and the PCx is necessary for discrimination and olfactory learning [28, 33, 64], we evaluated whether A β alters the habituation/dishabituation performance. We also evaluated if the implantation of electrodes in both structures affected these functions (Fig. 7). Control animals (injected with F12 medium) exhibited reduced exploration time after repeated presentations of the same odor ($p < 0.05$, $n = 10$; Fig. 7A), which indicates odor habituation [38]. In contrast, animals injected with A β did not exhibit a significant reduction in the exploration time between the first and last odor presentation in each block ($p > 0.1$, $n = 10$; Fig. 7A), which indicates that these animals are not capable of olfactory habituation [38]. We assessed odor discrimination by evaluating odor cross-habituation (i.e., difference between the

explorations of a habituated odor and a newly presented odor) through the cross-habituation index [33]. Thus, the increased investigation time (higher cross-habituation index) reflects discrimination between odors, whereas lower investigation times (small cross-habituation index) reflect generalization or a failure to discriminate [33]. We found that control animals (injected with F12 medium) significantly increased the exploration time of a newly presented odor ($p < 0.05$; $n = 10$; Fig. 7A) and exhibited a high cross-habituation index (0.93 ± 0.02 , Fig. 7B). In contrast, A β -injected animals did not show a change in the investigation time of the new odor (Fig. 7A) and exhibited a small cross-habituation index (0.11 ± 0.3 , $p = 0.001$, $n = 10$; Fig. 7B), indicating that they are not capable of odor discrimination. These results suggest that the animals treated with A β present deficiencies in odor habituation and olfactory discrimination [33]. An identical scenario was observed in implanted animals ($n = 11$; Fig. 7C, D), demonstrating that the damage produced by electrodes introduced in the OB and PCx do not interfere with the described phenomena.

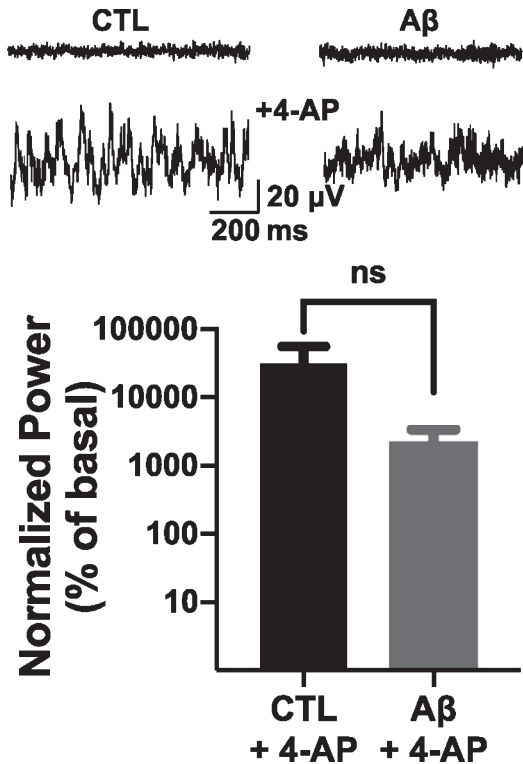


Fig. 4. Lack of effect of A β treatment on 4-AP-induced hyperexcitability in the OB. Representative traces of OB local field potential under basal conditions (upper traces) and in the presence of 4-AP 100 μ M (lower traces) in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium; left traces) and A β -injected animals (right traces). The quantification of normalized power, measured as % of basal activity (set as 100%), during 4-AP-induced hyperexcitability for both experimental groups is also shown. "ns" ($p=0.1$) denotes the absence of a significant difference between experimental groups.

DISCUSSION

In the present study, we show that intracerebral administration of an A β oligomerized solution, containing oligomers, monomers and protofibrils (Fig. 1C; inset) [39, 48] disrupts odor habituation and discrimination while reducing both OB and PCx network activity, as well as their coherence (Fig. 8). We also found that after A β treatment the PCx exhibited an exacerbated 4-AP-induced excitation, while the OB tended to be less excitable. Our results indicate that A β -induced olfactory dysfunction involves complex changes at different levels of the olfactory pathway, including modifications in PCx excitability and its coupling with the OB (Fig. 8). As we have done before [50, 63], F12 medium injection was used for control experiments. Despite that the injec-

tion of the reverse A β sequence would constitute a more accurate test for A β specificity [39, 55], vehicle application still allows to control for a variety of experimental manipulations used in studies like ours [49, 50, 63, 65].

Our finding that intracerebral A β administration reduces odor habituation and discrimination coincides with similar observations in AD patients [43] and AD transgenic animals that overproduce A β [29, 33–36], but goes a bit further to show that a two-week-long increase in A β is enough to induce this disruption in OB and PCx network activity (Fig. 8). A similar timeline was observed for the olfactory disruption induced by intrabulbar A β application [37, 38] or by intraventricular A β application [49], which correlates with signs of oxidative stress and neurodegeneration in the OB and the hippocampus [49]. Studies in AD transgenic animals, which are a closer proxy to the chronic and insidious nature of AD neuropathology and of long-term A β -induced effects [66–68], have shown that olfactory dysfunction coincides with A β accumulation in the PCx [29, 33, 35, 36] and that this disruption can be reversed by reducing A β levels [28, 34–36]. Our data, and those just described, strongly suggest that A β accumulation is sufficient and necessary for the induction of olfactory dysfunction in AD animal models and perhaps in AD (Fig. 8). It is likely that these A β -induced olfactory deficits are the consequence of a variety of functional alterations, although cell-damage cannot be discarded [49], that are going to be discussed next. Before, is worth mentioning that A β injection *in vivo* or its bath application *in vitro* did not affect synaptic transmission from the OB to the PCx, which is similar to the lack of effect of A β in basal synaptic transmission in different circuits [63, 69–71].

The observation that A β induces a reduction in the power of neural network activity in both the OB and the PCx (Fig. 8), coincides with previous findings that acute [37, 48, 55, 72, 73] and chronic [38, 63, 74] A β exposure reduces neural network activity, *in vitro* and *in vivo*, in a variety of circuits including the hippocampus [48, 55, 63, 72, 73], the entorhinal cortex [75] and the prefrontal cortex [76]. Moreover, we have previously shown that acute [37, 39] and chronic [38] A β presence reduces network activity in the OB. However, here we demonstrated for the first time that this phenomenon is also present in the PCx and might contribute to olfactory dysfunction (Fig. 8). It is likely that this reduction in PCx network activity involves changes in synaptic transmission [48, 55, 77–79] and in intrinsic neuronal properties [55, 66,

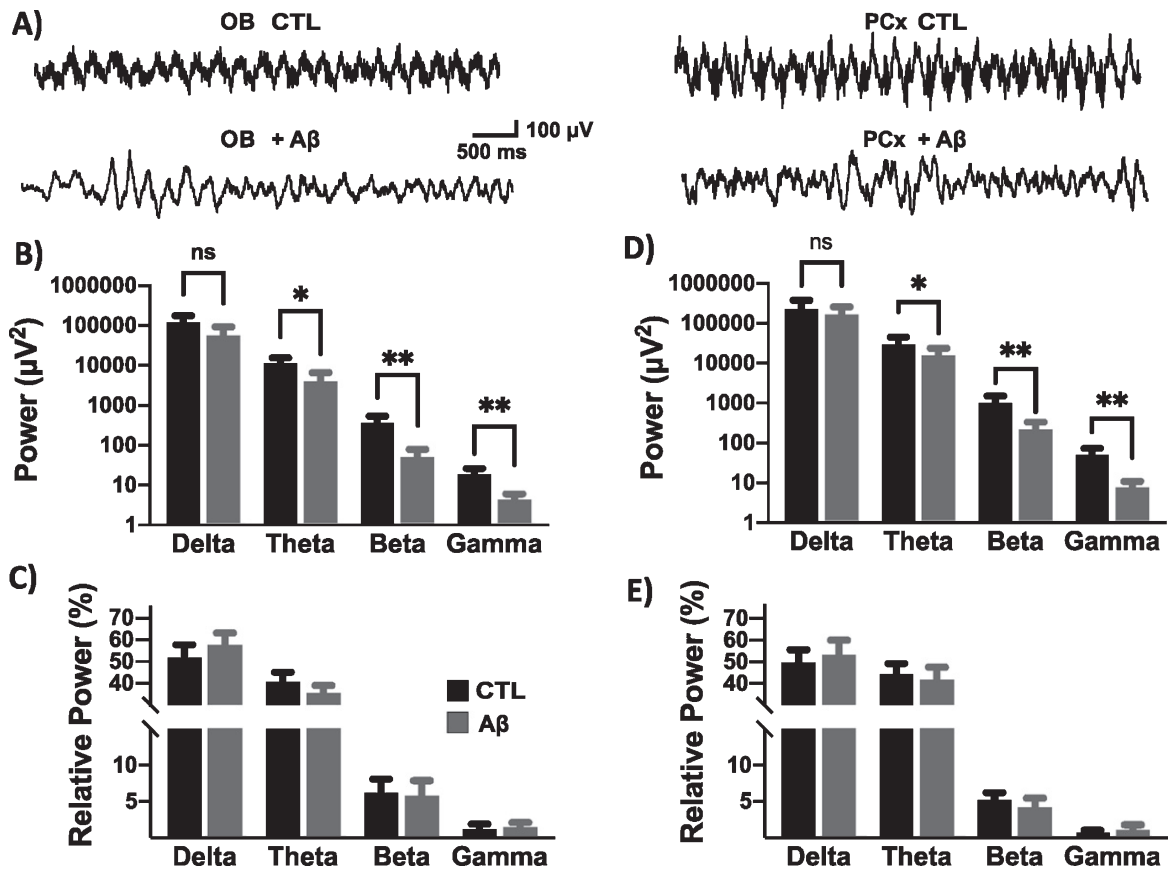


Fig. 5. PCx and OB network activity is depressed by A β injection *in vivo*. A) Representative traces of spontaneous network activity in the OB (left traces) and PCx (right traces) obtained from control (F12-injected; CTL; upper traces) and A β -injected (lower traces) freely moving animals. B) Quantification of the power of OB activity in CTL (black) and A β (gray) animals in the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz). C) OB Relative power for the same frequency bands and experimental groups (same color code). D) Same as B but for the PCx. E) Same as C but for the PCx. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ denotes a significant difference between experimental groups. “ns” ($p > 0.05$) denotes the absence of a significant difference between experimental groups.

80–82] that need to be specifically characterized in the PCx.

As observed for A β in the present study, similar alterations of PCx activity induced by *APOE4* expression also correlate with olfactory dysfunction [83]. Thus, the PCx is likely a neural circuit that is highly sensitive to pathological conditions [83], including A β accumulation [84]. In fact, A β application reduces antioxidant defenses in the PCx [84], which could make it prone to dysfunction and/or to oxidative stress and neurodegeneration [49]. Another mechanism that might contribute to A β -induced PCx dysfunction is neuroinflammation [32, 85], since the hypometabolic activity in the PCx observed in AD transgenic mice [44], and the associated olfactory dysfunction [32], have been closely related to gliosis. Neuroinflammatory conditions can

be induced directly by A β and can contribute to the induction of neural network dysfunction [85]. Alternatively, A β -induced PCx depression could also involve the activation of pathological intracellular pathways leading to the recruitment of GSK3 β [19, 38, 75, 86]. In fact, GSK3 β is accumulated in the PCx of AD transgenic mice that overproduce A β [19] and is activated upon A β presence [38, 75, 86]. Moreover, pharmacological and non-pharmacological GSK3 β inhibition can prevent the A β -induced depression of neural network activity in a variety of neural circuits [38, 75, 86], including the OB [38]. It is likely that GSK3 β contributes to AD pathology, including olfactory loss. All these mechanisms, and others, need to be evaluated to reveal the cellular and molecular mechanism underlying A β -induced olfactory dysfunction.

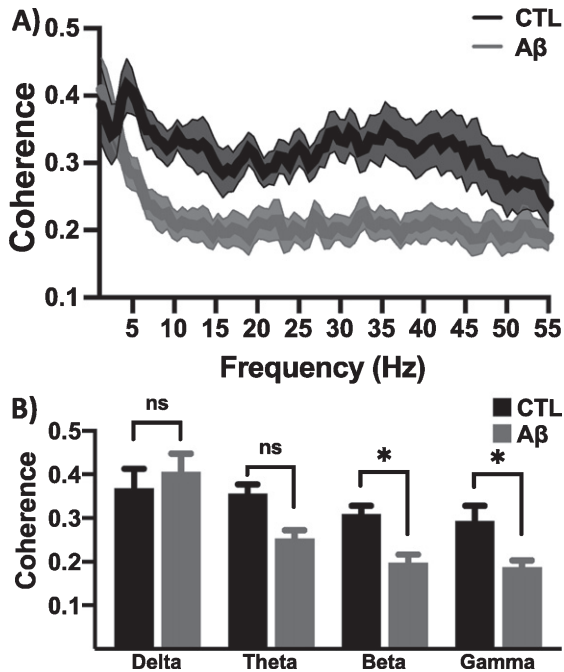


Fig. 6. A β reduces OB-PCx functional coupling. A) Coherence between OB-PCx local field potentials (LFPs) as a function of frequency obtained from control (F12-injected; CTL; black) and A β -injected (gray) freely moving animals. B) Quantification of the coherence between OB-PCx LFPs in the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz) for both experimental groups. * $p < 0.05$ denotes a significant difference between experimental groups. “ns” ($p > 0.05$) denotes the absence of a significant difference between experimental groups.

Olfactory dysfunction observed after A β microinjection also coincides with a reduction in PCx-OB coherence (Fig. 8), that is similar to the alterations in OB-PCx coherence [28, 33] and in OB-OB coherence in AD transgenic mice that overproduce A β [87]. Previous reports have shown that PCx-OB coherence is involved in olfactory processing [88] and that a disruption of either of these structures impairs odor perception [1–3]. Since we found that A β microinjection did not affect the transmission from the OB through the PCx (via the LOT; Fig. 1), it is likely that the reduction in PCx-OB coherence is due to alterations in the centrifugal connection from the PCx to the OB. Since disruptions in centrifugal innervation to the OB affect olfactory discrimination [89] or odor-reward association [90], it remains to be determined whether A β affects centrifugal transmission into the OB. This possibility is highly likely since A β affects the long-range coupling between different brain cir-

cuits [76, 91], such as the hippocampal-prefrontal cortex coupling [76] or the cortico-cortical connections [91].

We also found that after A β treatment the PCx exhibited an exacerbated response to 4-AP, while the OB tended to be less hyperexcitable. This finding indicates that the PCx and the OB could be differentially sensitive to the presence of A β and even produce opposite effects in identical conditions, as described for synaptic transmission in the hippocampus and the prefrontal cortex [92, 93]. This differential sensitivity between circuits of the olfactory pathway has been previously described in AD transgenic animals that overproduce A β [27, 28, 94], where the PCx exhibits earlier and more abundant A β accumulation than the OB [27, 31]. Moreover, in 6–7-month-old Tg2576 mice, the increase in LFP power induced by odor exposure is exacerbated in the PCx and depressed in the OB [28], which is similar to our findings. Moreover, gamma activity is increased in the PCx of 6–7-month-old Tg2576 mice, whereas these oscillations are normal in the OB [28]. This differential sensitivity between neural circuits to the presence of A β is observed in the olfactory pathway and in other forebrain circuits (i.e., hippocampus and different cortical areas) [28, 92, 93]. The differential composition of neuronal types, their connectivity, and their sensitivity to A β could likely account for these differences in network excitability after A β presence [28, 93]. Moreover, differences in the interconnection with other circuits could also influence the differential response of some neural networks to the differences in excitability induced by A β [28, 76].

The fact that the PCx becomes more prone to hyperexcitability in A β -injected animals coincides with previous observations in transgenic AD animals that overproduce A β exhibiting signs of hyperexcitability [28, 95] and odor hyperresponsiveness [25], which have been associated with alterations in olfactory function [28, 95]. Moreover, the worsening of 4AP-induced excitability produced by A β injection is similar to the findings that some AD transgenic animals that overproduce A β exhibit an increased susceptibility to seizures [96, 97]. It is likely that the PCx hyperexcitability and hyperresponsiveness in the presence of A β might be due to the high susceptibility of the PCx to seizures [20] and alterations in intra-network inhibition caused by damage to different inhibitory interneurons (i.e., somatostatin- and calretinin-positive interneurons) within the PCx, already observed in AD transgenic

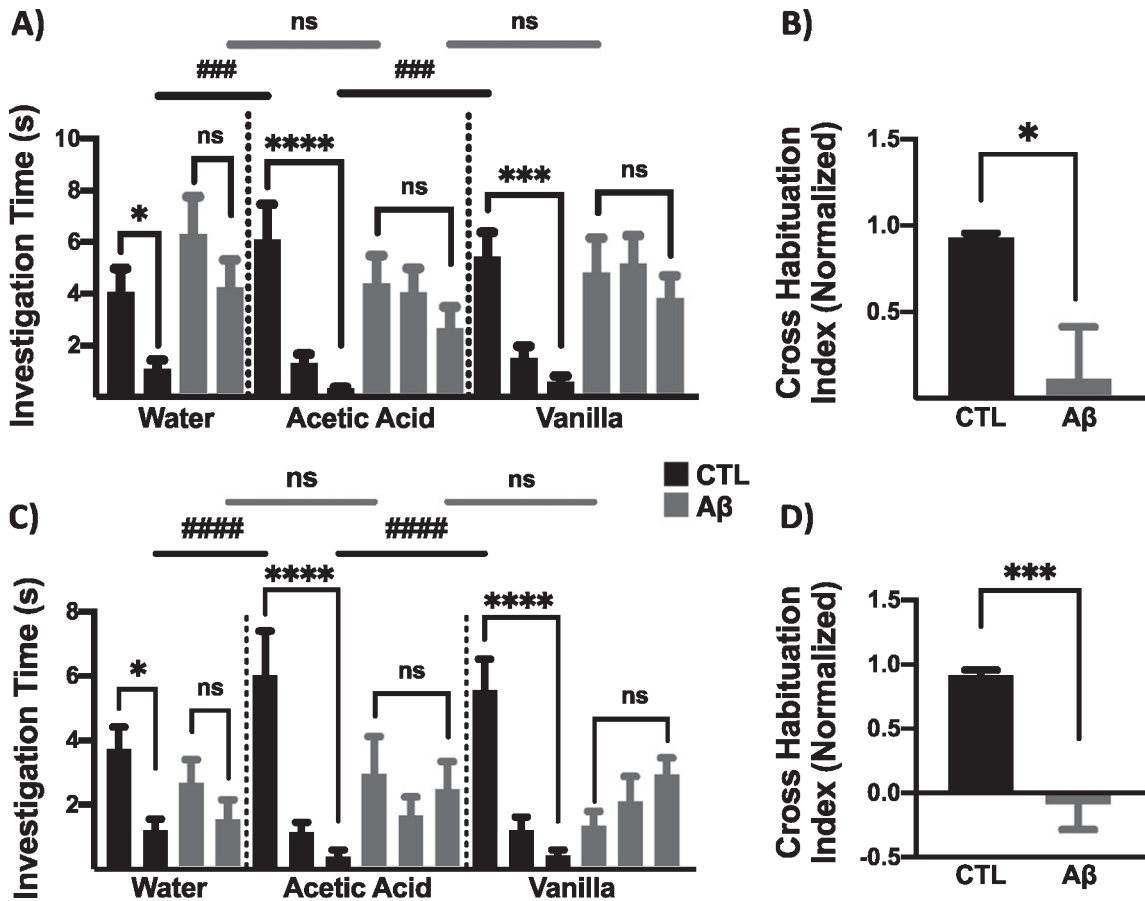


Fig. 7. A β disrupts odor habituation and discrimination. A) Mean investigation time for the sequential and repetitive presentation of water and two odors (acetic acid and vanilla) to control (F12-medium injected; CTL; black) and A β -injected (gray) animals. Odor habituation is reflected as a reduction in the investigation time after repeated presentation of the same odor. Cross habituation is reflected as an increase in the exploration time when a new odorant was presented. B) Cross-habituation index obtained by subtracting the normalized investigation time of the last trial of an odor block to the normalized investigation time of the first trial of the next odor block, for both experimental groups (same color code). C) Same as A, but for animals implanted with electrodes. D) Same as B, but for animals implanted with electrodes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ denotes a significant difference between the first and the last trial of an odor block. ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$ denotes a significant difference between the last trial of one odor block and the first trial of the next odor block (indicated by horizontal lines). "ns" ($p > 0.05$) denotes the absence of significant difference between the indicated exploration times.

animals that overproduce A β and in AD patients [16, 24].

As we have previously described in the hippocampus [51], the pro-epileptogenic effects of A β in the PCx are associated with a reduction in the power of spontaneous network activity and with a reduction in its coupling with the OB. It is possible that both phenomena have a common origin and are correlated. In fact, the reduction in oscillatory network activity has been associated with increased pyramidal cell activity [92, 96, 98–100] and with the inhibition of GABAergic interneurons [65, 97, 101–106], which

are hallmarks of epileptic conditions [50, 107]. On the other hand, although it could be counterintuitive to associate a reduction in coupling with hyperexcitation, modeling and electrophysiological experiments have shown that weak coupling could lead neocortical networks to a state that favors the induction of epileptiform activity [108]. Thus, the A β -induced reduction in network activity and coupling could determine the pro-epileptic effects of A β [51, 106, 109] and, altogether, contribute to olfactory dysfunction when this complex phenomenon affects the OB-PCx network.

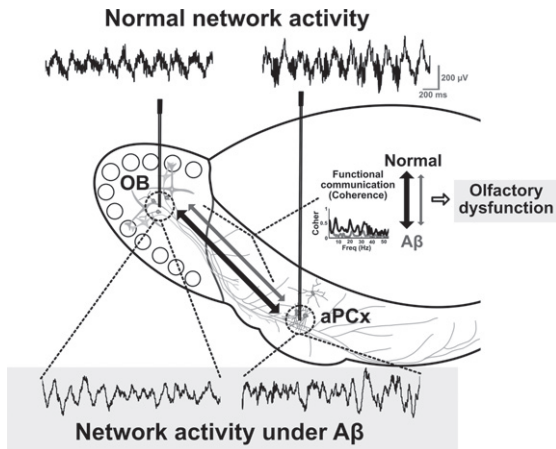


Fig. 8. $A\beta$ disrupts OB and PCx activity and coupling, inducing olfactory dysfunction. Scheme of the complex changes in the olfactory network, including the olfactory bulb (OB) and piriform cortex (PCx), leading to olfactory dysfunction. By recording OB and PCx excitability and coherence, we found that olfactory dysfunction was related to a reduction of PCx and OB network activity and coupling, which could contribute to hyposmia in Alzheimer's disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Ignacio Martínez is a student from Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Rebeca Hernández and Benjamín Villasana are students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). All received fellowships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. The authors would like to thank Jessica González-Norris and Anaïd Antaramian for the editorial comments.

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Grants IN202018 and IG20052) at UNAM and Conacyt (Grant A1-S-7540).

Authors' disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/20-1392r1>).

REFERENCES

[1] Nusser Z, Kay LM, Laurent G, Homanics GE, Mody I (2001) Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J Neurophysiol* **86**, 2823-2833.
 [2] Wilson DA (2001) Receptive fields in the rat piriform cortex. *Chem Senses* **26**, 577-584.

[3] Doucette W, Milder J, Restrepo D (2007) Adrenergic modulation of olfactory bulb circuitry affects odor discrimination. *Learn Mem* **14**, 539-547.
 [4] Mesholam RI, Moberg PJ, Mahr RN, Doty RL (1998) Olfaction in neurodegenerative disease: A meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch Neurol* **55**, 84-90.
 [5] Murphy C (1999) Loss of olfactory function in dementing disease. *Physiol Behav* **66**, 177-182.
 [6] Bahar-Fuchs A, Moss S, Rowe C, Savage G (2011) Awareness of olfactory deficits in healthy aging, amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* **23**, 1097-1106.
 [7] Rahayel S, Frasnelli J, Joubert S (2012) The effect of Alzheimer's disease and Parkinson's disease on olfaction: A meta-analysis. *Behav Brain Res* **231**, 60-74.
 [8] Albers MW, Tabert MH, Devanand DP (2006) Olfactory dysfunction as a predictor of neurodegenerative disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* **6**, 379-386.
 [9] Conti MZ, Vicini-Chilovi B, Riva M, Zanetti M, Liberini P, Padovani A, Rozzini L (2013) Odor identification deficit predicts clinical conversion from mild cognitive impairment to dementia due to Alzheimer's disease. *Arch Clin Neuropsychol* **28**, 391-399.
 [10] Devanand DP, Michaels-Marston KS, Liu X, Pelton GH, Padilla M, Marder K, Bell K, Stern Y, Mayeux R (2000) Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up. *Am J Psychiatry* **157**, 1399-1405.
 [11] Devanand DP, Liu X, Tabert MH, Pradhaban G, Cuasay K, Bell K, de Leon MJ, Doty RL, Stern Y, Pelton GH (2008) Combining early markers strongly predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **64**, 871-879.
 [12] Yang D-S, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson D, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA (2011) Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* **134**, 258-277.
 [13] Montgomery KS, Simmons RK, Edwards G3, Nicolle MM, Gluck MA, Myers CE, Bizon JL (2011) Novel age-dependent learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease: Implications for translational research. *Neurobiol Aging* **32**, 1273-1285.
 [14] Young JW, Sharkey J, Finlayson K (2009) Progressive impairment in olfactory working memory in a mouse model of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **30**, 1430-1443.
 [15] Kameshima N, Nanjou T, Fukuhara T, Yanagisawa D, Tooyama I (2012) Correlation of $A\beta$ deposition in the nasal cavity with the formation of senile plaques in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **513**, 166-169.
 [16] Saiz-Sanchez D, Ubeda-Banon I, la Rosa-Prieto De C, Martinez-Marcos A (2012) Differential expression of interneuron populations and correlation with amyloid- β deposition in the olfactory cortex of an $A\beta$ PP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **31**, 113-129.
 [17] Qin Y-Y, Li M-W, Zhang S, Zhang Y, Zhao L-Y, Lei H, Oishi K, Zhu W-Z (2013) *In vivo* quantitative whole-brain diffusion tensor imaging analysis of APP/PS1 transgenic

- mice using voxel-based and atlas-based methods. *Neuro-radiology* **55**, 1027-1038.
- [18] Kong V, Devenyi GA, Gallino D, Ayranci G, Germann J, Rollins C, Chakravarty MM (2018) Early-in-life neuroanatomical and behavioural trajectories in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* **223**, 3365-3382.
- [19] Gandy JC, Melendez-Ferro M, Bijur GN, Van Leuven F, Roche JK, Lechat B, Devijver H, Demedts D, Perez-Costas E, Roberts RC (2013) Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) expression in a mouse model of Alzheimer's disease: A light and electron microscopy study. *Synapse* **67**, 313-327.
- [20] Yan X-X, Cai Y, Shelton J, Deng S-H, Luo X-G, Oddo S, LaFerla FM, Cai H, Rose GM, Patrylo PR (2012) Chronic temporal lobe epilepsy is associated with enhanced Alzheimer-like neuropathology in 3 \times Tg-AD mice. *PLoS One* **7**, e48782.
- [21] Ohm TG, Braak H (1987) Olfactory bulb changes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **73**, 365-369.
- [22] Attems J, Jellinger KA (2006) Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Clin Neuropathol* **25**, 265-271.
- [23] Murray HC, Dieriks BV, Swanson MEV, Anekal PV, Turner C, Faull RLM, Belluscio L, Koretsky A, Curtis MA (2020) The unfolded protein response is activated in the olfactory system in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **8**, 109.
- [24] Saiz-Sanchez D, la Rosa-Prieto De C, Ubeda-Banon I, Martinez-Marcos A (2015) Interneurons, tau and amyloid- β in the piriform cortex in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* **220**, 2011-2025.
- [25] Xu W, Fitzgerald S, Nixon RA, Levy E, Wilson DA (2015) Early hyperactivity in lateral entorhinal cortex is associated with elevated levels of A β PP metabolites in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **264**, 82-91.
- [26] Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn S-M, Kim H-S, Lee SH, Emson PC, Suh Y-H (2006) Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB J* **20**, 729-731.
- [27] Zhang X-M, Xiong K, Cai Y, Cai H, Luo X-G, Feng J-C, Clough RW, Patrylo PR, Struble RG, Yan X-X (2010) Functional deprivation promotes amyloid plaque pathogenesis in Tg2576 mouse olfactory bulb and piriform cortex. *Eur J Neurosci* **31**, 710-721.
- [28] Wesson DW, Borkowski AH, Landreth GE, Nixon RA, Levy E, Wilson DA (2011) Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an Alzheimer's β -amyloidosis mouse model. *J Neurosci* **31**, 15962-15971.
- [29] Xu W, Lopez-Guzman M, Schoen C, Fitzgerald S, Lauer SL, Nixon RA, Levy E, Wilson DA (2014) Spared piriform cortical single-unit odor processing and odor discrimination in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **9**, e106431-10.
- [30] Wu N, Rao X, Gao Y, Wang J, Xu F (2013) Amyloid- β deposition and olfactory dysfunction in an Alzheimer's disease model. *J Alzheimers Dis* **37**, 699-712.
- [31] Cassano T, Romano A, Macheda T, Colangeli R, Cimmino CS, Petrella A, LaFerla FM, Cuomo V, Gaetani S (2011) Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease. *Behav Brain Res* **224**, 408-412.
- [32] Plucińska K, Crouch B, Koss D, Robinson L, Siebrecht M, Riedel G, Platt B (2014) Knock-in of human BACE1 cleaves murine APP and reiterates Alzheimer-like phenotypes. *J Neurosci* **34**, 10710-10728.
- [33] Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA (2010) Olfactory dysfunction correlates with amyloid- β burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* **30**, 505-514.
- [34] Wesson DW, Morales-Corraliza J, Mazzella MJ, Wilson DA, Mathews PM (2013) Chronic anti-murine A β immunization preserves odor guided behaviors in an Alzheimer's β -amyloidosis model. *Behav Brain Res* **237**, 96-102.
- [35] Morales-Corraliza J, Schmidt SD, Mazzella MJ, Berger JD, Wilson DA, Wesson DW, Jucker M, Levy E, Nixon RA, Mathews PM (2013) Immunization targeting a minor plaque constituent clears β -amyloid and rescues behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging* **34**, 137-145.
- [36] Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CYD, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE (2012) ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* **335**, 1503-1506.
- [37] Alvarado-Martínez R, Salgado-Puga K, Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS One* **8**, e75745-15.
- [38] Cornejo-Montes-de-Oca JM, Hernández-Soto R, Isla AG, Morado-Urbina CE, Peña-Ortega F (2018) Tolfenamic acid prevents amyloid β -induced olfactory bulb dysfunction *in vivo*. *Curr Alzheimer Res* **15**, 731-742.
- [39] Hernández-Soto R, Rojas-García KD, Peña-Ortega F (2019) Sudden intrabulbar amyloid increase simultaneously disrupts olfactory bulb oscillations and odor detection. *Neural Plasticity* **2019**, 3424906.
- [40] Gottfried JA (2010) Central mechanisms of odour object perception. *Nat Rev Neurosci* **11**, 628-641.
- [41] Wilson DA, Sullivan RM (2011) Cortical processing of odor objects. *Neuron* **72**, 506-519.
- [42] Wilson DA, Stevenson RJ (2003) The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci* **26**, 243-247.
- [43] Li W, Howard JD, Gottfried JA (2010) Disruption of odour quality coding in piriform cortex mediates olfactory deficits in Alzheimer's disease. *Brain* **133**, 2714-2726.
- [44] Adlimoghaddam A, Snow WM, Stortz G, Perez C, Djordjevic J, Goertzen AL, Ko JH, Albeni BC (2019) Regional hypometabolism in the 3 \times Tg mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **127**, 264-277.
- [45] Peña F, Tapia R (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem* **72**, 2006-2014.
- [46] Peña F, Tapia R (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus *in vivo*: Role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* **101**, 547-561.
- [47] Villasana-Salazar B, Hernández-Soto R, Guerrero-Gómez ME, Ordaz B, Manrique-Maldonado G, Salgado-Puga K, Peña-Ortega F (2020) Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability *in vitro*. *Epilepsy Res* **166**, 106375.

- [48] Balleza-Tapia H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F (2010) Amyloid β oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. *Curr Alzheimer Res* **7**, 453-462.
- [49] Raj A, Dey S, Maheshwari DU, Manjula SN, Madhupantula SV, Ali M (2019) Evaluating the olfactory dysfunction and cognitive deficits induced by intracerebroventricular injection of amyloid-beta (1-42) in female C57BL/6 mice. *J App Pharm Sci* **9**, 24-34.
- [50] Salgado-Puga K, Peña-Ortega F (2015) Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid β protein. *Protein Pept Lett* **22**, 303-321.
- [51] Alcántara-González D, Villasana-Salazar B, Peña-Ortega F (2019) Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine-induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus* **29**, 1150-1164.
- [52] Paxinos G, Franklin K (2019) *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier Science.
- [53] McGinley MJ, Westbrook GL (2013) Hierarchical excitatory synaptic connectivity in mouse olfactory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16193-16198.
- [54] Peña F, Alavez-Pérez N (2006) Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus *in vitro*. *Epilepsia* **47**, 47-54.
- [55] 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* **20**, 78-96.
- [56] Peña F, Bargas J, Tapia R (2002) Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine *in vivo*. *Neuropharmacology* **42**, 807-812.
- [57] Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GAR (2003) Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from Ginkgo biloba, is an antagonist at recombinant α 1 β 2 γ 2 GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* **464**, 1-8.
- [58] Leung LS, Fu XW (1994) Factors affecting paired-pulse facilitation in hippocampal CA1 neurons *in vitro*. *Brain Res* **650**, 75-84.
- [59] Ambert N, Greget R, Haerberlé O, Bischoff S, Berger TW, Bouteiller J-M, Baudry M (2010) Computational studies of NMDA receptors: Differential effects of neuronal activity on efficacy of competitive and non-competitive antagonists. *Open Access Bioinformatics* **2**, 113-125.
- [60] Gustafsson B, Wigström H, Abraham WC, Huang YY (1987) Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J Neurosci* **7**, 774-780.
- [61] Honoré T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen P, Lodge D, Nielsen FE (1988) Quinoxalinediones: Potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* **241**, 701-703.
- [62] Lee S-H, Govindaiah G, Cox CL (2010) Selective excitatory actions of DNQX and CNQX in rat thalamic neurons. *J Neurophysiol* **103**, 1728-1734.
- [63] Salgado-Puga K, Rodríguez-Colorado J, Prado-Alcalá RA, Peña-Ortega F (2017) Subclinical doses of ATP-sensitive potassium channel modulators prevent alterations in memory and synaptic plasticity induced by amyloid- β . *J Alzheimers Dis* **57**, 205-226.
- [64] Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* **90**, 3921-3930.
- [65] Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Roulot E, Bellessort B, Epelbaum J, Dutar P, Stéphan A (2010) Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J Neurosci* **30**, 10991-11003.
- [66] Mondragón-Rodríguez S, Gu N, Manseau F, Williams S (2018) Alzheimer's transgenic model is characterized by very early brain network alterations and β -CTF fragment accumulation: Reversal by β -secretase inhibition. *Front Cell Neurosci* **12**, 121.
- [67] Mondragón-Rodríguez S, Gu N, Fasano C, Peña-Ortega F, Williams S (2019) Functional connectivity between hippocampus and lateral septum is affected in very young Alzheimer's transgenic mouse model. *Neuroscience* **401**, 96-105.
- [68] Mondragón-Rodríguez S, Salgado-Burgos H, Peña-Ortega F (2020) Circuitry and synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A new tau hypothesis. *Neural Plasticity* **2020**, 2960343.
- [69] Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* **2**, 271-276.
- [70] Giacchino J, Criado JR, Games D, Henriksen S (2000) *In vivo* synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res* **876**, 185-190.
- [71] Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C (2006) The role of beta-amyloid protein in synaptic function: Implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* **4**, 149-163.
- [72] Adaya-Villanueva A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F (2010) Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides* **31**, 1761-1766.
- [73] Gutiérrez-Lerma AI, Ordaz B, Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms *in vitro*. *Int J Pept* **2013**, 328140.
- [74] Peña-Ortega F, Bernal-Pedraza R (2012) Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *Int J Pept* **2012**, 236289.
- [75] Peña-Ortega F, Solis-Cisneros A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Javier Lopez-Guerrero J (2012) Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: Role of GSK-3. *Curr Alzheimer Res* **9**, 857-863.
- [76] Flores-Martínez E, Peña-Ortega F (2017) Amyloid β peptide-induced changes in prefrontal cortex activity and its response to hippocampal input. *Int J Pept* **2017**, 7386809.
- [77] Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M (2012) Dual effect of beta-amyloid on α 7 and α 4 β 2 nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus. *PLoS One* **7**, e29661.
- [78] Salamone A, Mura E, Zappettini S, Grilli M, Olivero G, Preda S, Govoni S, Marchi M (2014) Inhibitory effects of beta-amyloid on the nicotinic receptors which stimulate glutamate release in rat hippocampus: The glial contribution. *Eur J Pharmacol* **723**, 314-321.

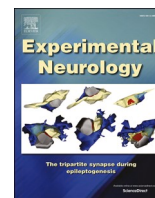
- [79] Satoh Y, Hirakura Y, Shibayama S, Hirashima N, Suzuki T, Kirino Y (2001) Beta-amyloid peptides inhibit acetylcholine release from cholinergic presynaptic nerve endings isolated from an electric ray. *Neurosci Lett* **302**, 97-100.
- [80] Chen C (2005) beta-Amyloid increases dendritic Ca²⁺-influx by inhibiting the A-type K⁺-current in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1913-1919.
- [81] Hou J-F, Cui J, Yu L-C, Zhang Y (2009) Intracellular amyloid induces impairments on electrophysiological properties of cultured human neurons. *Neurosci Lett* **462**, 294-299.
- [82] Rovira C, Arbez N, Mariani J (2002) Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 1317-1321.
- [83] Peng KY, Mathews PM, Levy E, Wilson DA (2016) Apolipoprotein E4 causes early olfactory network abnormalities and short-term olfactory memory impairments. *Neuroscience* **343**, 364-371.
- [84] Kim H-C, Yamada K, Nitta A, Olariu A, Tran MH, Mizuno M, Nakajima A, Nagai T, Kamei H, Jhoo W-K, Im D-H, Shin E-J, Hjelle OP, Ottersen OP, Park SC, Kato K, Mirault M-E, Nabeshima T (2003) Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs endogenous antioxidant systems *in vivo*. *Neuroscience* **119**, 399-419.
- [85] Peña-Ortega F (2019) Brain arrhythmias induced by amyloid beta and inflammation: Involvement in Alzheimer's disease and other inflammation-related pathologies. *Curr Alzheimer Res* **16**, 1108-1131.
- [86] Isla AG, Vázquez-Cuevas FG, Peña-Ortega F (2016) Exercise prevents amyloid- β -induced hippocampal network disruption by inhibiting GSK3 β activation. *J Alzheimers Dis* **52**, 333-343.
- [87] 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**, 81-85.
- [88] Kay LM, Beshel J (2010) A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. *J Neurophysiol* **104**, 829-839.
- [89] Nunez-Parra A, Maurer RK, Krahe K, Smith RS, Araneda RC (2013) Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14777-14782.
- [90] Kiselycznyk CL, Zhang S, Linstner C (2006) Role of centrifugal projections to the olfactory bulb in olfactory processing. *Learn Mem* **13**, 575-579.
- [91] Busche MA, Kekuš M, Adelsberger H, Noda T, Förstl H, Nelken I, Konnerth A (2015) Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer's disease models. *Nat Neurosci* **18**, 1623-1630.
- [92] Kurudenkandy FR, Zilberter M, Biverstål H, Presto J, Honcharenko D, Strömberg R, Johansson J, Winblad B, Fisahn A (2014) Amyloid- β -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *J Neurosci* **34**, 11416-11425.
- [93] Wang Y, Zhou TH, Zhi Z, Barakat A, Hlatky L, Querfurth H (2013) Multiple effects of β -amyloid on single excitatory synaptic connections in the PFC. *Front Cell Neurosci* **7**, 129.
- [94] Cassano T, Serviddio G, Gaetani S, Romano A, Dipasquale P, Cianci S, Bellanti F, Laconca L, Romano AD, Padalino I, LaFerla FM, Nicoletti F, Cuomo V, Vendemiale G (2012) Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **33**, 1121.e1-12.
- [95] Chapuis J, Cohen Y, He X, Zhang Z, Jin S, Xu F, Wilson DA (2013) Lateral entorhinal modulation of piriform cortical activity and fine odor discrimination. *J Neurosci* **33**, 13449-13459.
- [96] Minceviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fulop L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkanen A, Tanila H (2009) Amyloid β -induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci* **29**, 3453-3462.
- [97] Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu G-Q, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* **55**, 697-711.
- [98] Ren S-C, Chen P-Z, Jiang H-H, Mi Z, Xu F, Hu B, Zhang J, Zhu Z-R (2014) Persistent sodium currents contribute to A β 1-42-induced hyperexcitation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett* **580**, 62-67.
- [99] Busche MA, Chen X, Henning HA, Reichwald J, Staufenbiel M, Sakmann B, Konnerth A (2012) Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8740-8745.
- [100] Juhász G, Márki A, Vass G, Fülöp L, Budai D, Penke B, Falkay G, Szegei V (2009) An intraperitoneally administered pentapeptide protects against A β 1-42 induced neuronal excitation *in vivo*. *J Alzheimers Dis* **16**, 189-196.
- [101] Rubio SE, Vega-Flores G, Martínez A, Bosch C, Pérez-Mediavilla A, del Río J, Gruart A, Delgado-García JM, Soriano E, Pascual M (2012) Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* **26**, 4458-4467.
- [102] Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AMI, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ (2012) Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* **149**, 708-721.
- [103] Villette V, Dutar P (2017) GABAergic microcircuits in Alzheimer's disease models. *Curr Alzheimer Res* **14**, 30-39.
- [104] Albuquerque MS, Mahar I, Davoli MA, Chabot J-G, Mechawar N, Quirion R, Krantic S (2015) Regional and sub-regional differences in hippocampal GABAergic neuronal vulnerability in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **7**, 30.
- [105] Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Luano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* **21**, 119-132.
- [106] Hazra A, Gu F, Aulakh A, Berridge C, Eriksen JL, Ziburkus J (2013) Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e64318.

- [107] Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *J Neurodegener Dis* **2013**, 657470.
- [108] Van Drongelen W, Lee HC, Hereld M, Chen Z, Elsen FP, Stevens RL (2005) Emergent epileptiform activity in neural networks with weak excitatory synapses. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* **13**, 236-241.
- [109] Cuevas ME, Haensgen H, Sepúlveda FJ, Zegers G, Roa J, Opazo C, Aguayo LG (2011) Soluble A β (1-40) peptide increases excitatory neurotransmission and induces epileptiform activity in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis* **23**, 673-687.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexnr

Research Paper

Chronic intermittent hypoxia alters main olfactory bulb activity and olfaction

Rebeca Hernández-Soto¹, Benjamín Villasana-Salazar¹, Laura Pinedo-Vargas, Fernando Peña-Ortega*

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Querétaro, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Chronic intermittent hypoxia
Obstructive sleep apnea
Main olfactory bulb
Habituation/dishabituation test
Buried food test
Olfactory dysfunction
Network activity

ABSTRACT

Olfactory dysfunction is commonly observed in patients with obstructive sleep apnea (OSA), which is related to chronic intermittent hypoxia (CIH). OSA patients exhibit alterations in discrimination, identification and odor detection threshold. These olfactory functions strongly rely on neuronal processing within the main olfactory bulb (MOB). However, a direct evaluation of the effects of controlled CIH on olfaction and MOB network activity has not been performed. Here, we used electrophysiological field recordings *in vivo* to evaluate the effects of 21-day-long CIH on MOB network activity and its response to odors. In addition, we assessed animals' olfaction with the buried food and habituation/dishabituation tests. We found that mice exposed to CIH show alterations in MOB spontaneous activity *in vivo*, consisting of a reduction in beta and gamma frequency bands power along with an increase in the theta band power. Likewise, the MOB was less responsive to odor stimulation, since the proportional increase of the power of its population activity in response to four different odorants was smaller than the one observed in control animals. These CIH-induced MOB functional alterations correlate with a reduction in the ability to detect, habituate and discriminate olfactory stimuli. Our findings indicate that CIH generates alterations in the MOB neural network, which could be involved in the olfactory deterioration in patients with OSA.

1. Introduction

The olfactory system is needed for survival and well-being (Kay, 2015), allowing the detection and discrimination of immeasurable odor signals (Malnic et al., 1999; Buck, 2004; Bushdid et al., 2014; Saraiva et al., 2016). Olfaction regulates food consumption (Rolls, 2005), social behavior (Kiyokawa et al., 2009; Sanchez-Andrade and Kendrick, 2009) and danger assessment (Takahashi et al., 2005; Saraiva et al., 2016), among other survival functions. Unfortunately, olfaction is a sensory function highly sensitive to pathological conditions (Masurkar and Devanand, 2014; Roberts et al., 2016; Li et al., 2019), and altered even before the presence of their most typical neurological symptoms (Masurkar and Devanand, 2014; Roberts et al., 2016; Li et al., 2019).

Obstructive sleep apnea (OSA) consists of repetitive airway occlusions that lead to chronic intermittent hypoxia (CIH) and sleep fragmentation (Ramirez et al., 2013; Salihoğlu et al., 2014). OSA is

associated with olfactory dysfunction (Banabilh et al., 2010; Salihoğlu et al., 2014; Fu et al., 2015; Magliulo et al., 2018), and patients exhibit difficulties to detect and discriminate between odors and, in some cases, show higher olfactory detection thresholds (Miyamoto et al., 2009; Salihoğlu et al., 2014; Fu et al., 2015; Günbey et al., 2015). This dysfunction also includes the trigeminal chemosensory system (Heiser et al., 2013). Although the alterations in the olfactory functions correlate with the severity of OSA (Miyamoto et al., 2009; Salihoğlu et al., 2014; Fu et al., 2015; Günbey et al., 2015), the causal relationship between CIH and olfactory dysfunction has not been directly established.

Prolonged exposure to hypoxia can induce apoptosis in olfactory neurons (Zhao et al., 2007), which could be related to the reduction in olfactory bulb volume in OSA patients as a consequence of CIH (Salihoğlu et al., 2014; Doğan et al., 2019). Despite the evidence of anatomical alterations in the olfactory system induced by CIH, and of functional changes induced by CIH in other neural circuits (i.e. the

Abbreviations: OSA, Obstructive sleep apnea; CIH, Chronic intermittent hypoxia; MOB, Main Olfactory bulb; LFP, Local field potential.

* Corresponding author at: Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro 76230, Mexico.

E-mail address: jfpena@unam.mx (F. Peña-Ortega).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113653>

Received 21 September 2020; Received in revised form 2 February 2021; Accepted 14 February 2021

Available online 17 February 2021

0014-4886/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

hippocampus; Payne et al., 2004; Villasana-Salazar et al., 2020; Arias-Cavieres et al., 2020), the specific effects of CIH on olfactory function have not been directly assessed. Here, we tested whether CIH alters main olfactory bulb (MOB) function and found that CIH modifies MOB local field potential activity in vivo, increasing slow theta activity while reducing faster beta gamma activities. Moreover, CIH halts the MOB population response to odors and alters olfactory function.

2. Materials and methods

All the experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology at UNAM and conducted in accordance with the guidelines of the Official Mexican Standard for the Use and Care of Laboratory Animals (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) and the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH publication 80–23, Bethesda, MD, USA, 1996). Only a minimal and necessary number of animals were used in this study.

2.1. Animals

Adult male C57BL/6 mice ($n = 22$; 6–8 weeks old) were obtained from the Institute of Neurobiology-UNAM animal facility, and housed in collective cages (4–6 animals / cage) in a temperature-controlled vivarium ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). All animals were kept under a normal 12h light-12h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with standard diet (LabDiet 5001, composition 13.4% calories fat, 57.9% calories carbohydrate, and 28.7% calories protein) and water ad libitum. Since the CIH protocol

produces a slight mortality (Villasana-Salazar et al., 2020), we included a higher number of animals in the CIH group ($n = 12$) than in the control group ($n = 10$).

2.2. Chronic intermittent hypoxia protocol

CIH was induced as previously reported (Villasana-Salazar et al., 2020). Briefly, every day, mice were placed in collective cages (4–5 animals / cage) within Plexiglas chambers (76 cm \times 51 cm \times 51 cm) equipped with gas injectors and with O_2 , CO_2 , humidity and temperature sensors (BioSpherix, NY, USA; Fig. 1A). There, CIH animals were submitted to intermittent 5 min of N_2 injection, controlled with an OxyCycler system (A420C, BioSpherix; Fig. 1A), to induce hypoxic episodes (5–7% inspired O_2) followed by O_2 injection, for 5 min, during normoxic episodes (21–22% inspired O_2 ; Fig. 1A–B) (Moraes and Machado, 2015; Villasana-Salazar et al., 2020); which were cyclically alternated (Fig. 1A–B) daily for 8 h (from 10:00 h to 18:00 h), during the light phase of the cycle, for 21 days. We chose this period based on the observation that it is required to induce major pathological changes (Nanduri et al., 2017; Khuu et al., 2019), which cannot be achieved by shorter CIH periods (Nanduri et al., 2017; Khuu et al., 2019). Control animals were placed in a normoxic chamber (21–22% inspired O_2) for 21 days (Moraes and Machado, 2015; Villasana-Salazar et al., 2020). The animals' weight and survival were constantly monitored during this protocol.

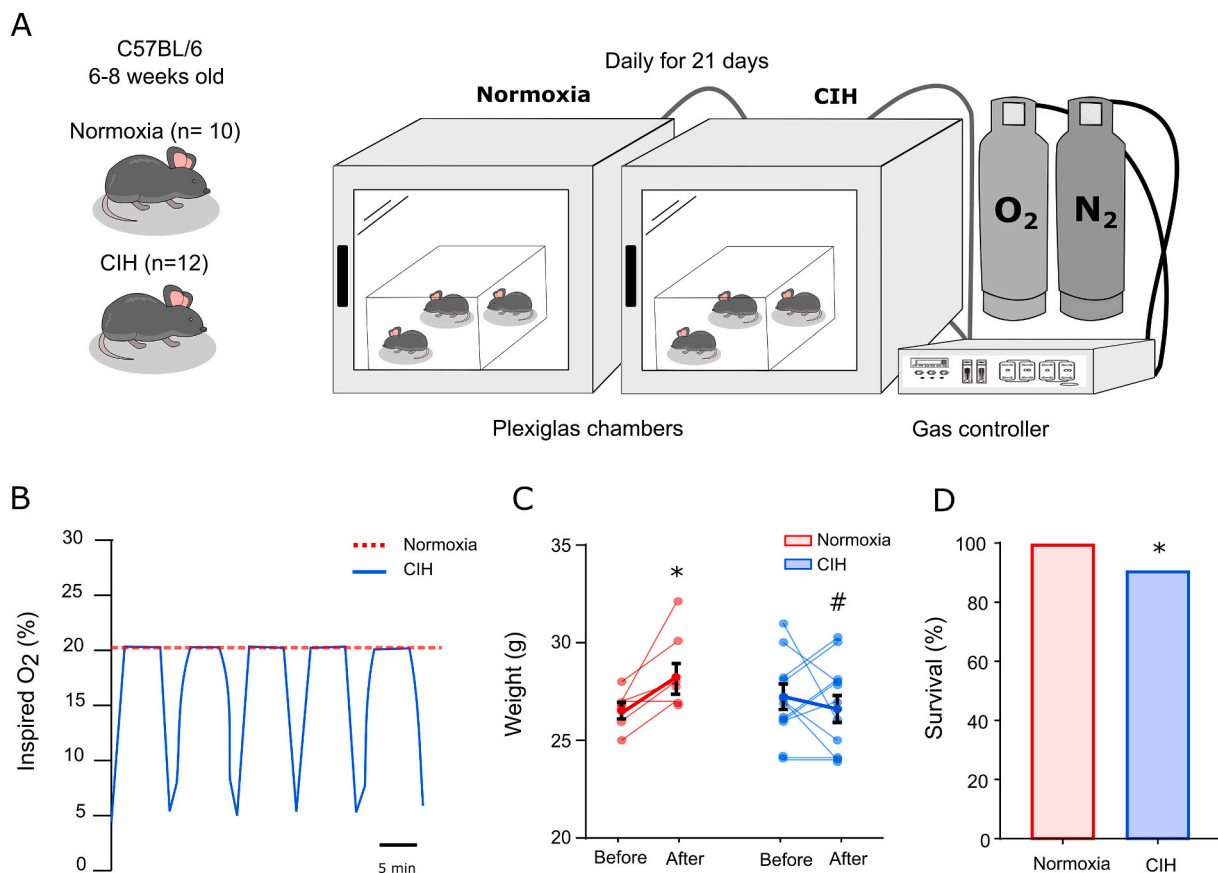


Fig. 1. Chronic intermittent hypoxia (CIH) and normoxia treatments and their impact on weight and survival. A) CIH and normoxic groups (left) were placed in independent chambers every day for 21 days; the chambers contained controlled gas concentrations. B) Representative traces of O_2 levels into the chambers during CIH (blue line) or normoxic (red dotted line) conditions. C) Quantification of body weight before and after the 21-day treatments. While normoxic animals gained weight, CIH animals exhibited significant weight loss. Data are presented as mean \pm SEM. D) Proportion of animal survival after treatments. Note a slight reduction in survival after CIH. # denotes a significant difference vs normoxic group ($p < 0.05$). * denotes a significant difference vs initial weight and a significant difference vs normoxia group in survival rate ($p < 0.05$).

2.3. Buried food test

At the end of the CIH protocol, animals were tested for olfactory detection with the buried food test (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019). To do so, animals were habituated for 30 min to a cage (24 × 20 × 45 cm) with clean sawdust covering the floor. Then, a highly odorous food piece (50 mg of cookie; TRIKI TRAKES®) was hidden ~1 cm beneath the cage bedding, in a random corner. Later, the latency for animals to locate and extract the hidden food was quantified (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019). We considered that the animals successfully found the cookie when they held it with both forepaws. A limit for this test was set at 600 s. To evaluate animals' motility and motivation, we repeated the same test but with the cookie in plain sight (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019).

2.4. Olfactory habituation-dishabituation test

Olfactory discrimination and odor familiarization were evaluated with the habituation/dishabituation test, as previously described (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). Briefly, all animals were acclimated to the testing cage for 30 min before olfactory stimuli were presented. The stimuli consisted of 10 µl of distilled water or one of two odorants deposited on filter paper (2 × 2 cm) located in a metal container above the lid of the testing box. Two initial presentations of distilled water (3 min each, 1 min inter-presentation interval), included for animal familiarization with the procedure (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018), were followed by three sequential odor stimuli (3 min long with a 1 min inter-stimulus interval) of one of the following odors: vinegar or vanilla, both at 10% v/v, diluted in mineral oil. The fourth odor stimulus consisted of the presentation of the other odor, which was repeated two more times in an identical fashion as the first one (3 min long with a 1 min inter-stimulus interval). The animals were videotaped for offline analysis. The exploration time was evaluated and normalized to the first trial (set as 100%). We assumed that the stimulus was explored if the animal sniffed it within a 1 cm distance to the filter paper. A significant decrease in the investigation time during the repetitive presentation of the same odor is an indication of odor recognition and habituation, while an increase in exploration of the new odorant indicates a discrimination between odors or dishabituation (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). A "cross-habituation index" (Wesson et al., 2010) was calculated by subtracting the last exploration time of any given odor (3rd exposure) to the normalized exploration of the subsequent novel odor trial (first exposure). We chose these odorants because the response to both vinegar (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018) and vanilla extract (Mosienko et al., 2017) exhibit the habituation and dishabituation phenomena. Moreover, despite that vanillin (the main odorant in vanilla extracts) has been considered an olfactory-nerve specific stimulant (Doty et al., 1978), vanilla (as vinegar) can also induce trigeminal responses (Doty et al., 1978). Thus, this odor combination allowed us to test the function of both the olfactory and the trigeminal systems.

2.5. Olfactory bulb network activity recording

Within a week after the CIH protocol, animals were shallowly anesthetized with urethane (2 g/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and fixed to a stereotaxic frame (Stoelting Co., Wood Dale, IL). Animals were wrapped with a cotton surgical drape, which allow us to restrict any change in body temperature to <1 °C for 1.5 h. A stainless-steel bipolar electrode was implanted into the MOB granular cell layer at the following coordinates (relative to Bregma): AP: +4.7 mm; ML: ±0.6 mm; DV: -1.6 mm (Franklin and Paxinos, 2007). An epidural stainless-steel screw was implanted above the cerebellum to ground the signal (AP: -6.0 mm, ML: ±1.0 mm) (Franklin and Paxinos, 2007). The MOB local field potential (LFP) was recorded for 30 min in the absence of odors (baseline). Then, odor stimulations were delivered using a

computer-controlled flow-dilution olfactometer (Slotnick and Restrepo, 2005), provided with a vacuum line to remove odors after their application (Knosys, Inc. Tampa, FL, USA). Odorants (10% v/v diluted in mineral oil; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), were individually applied directly to the nostrils for 10 s through an odor-sampling tube, and immediately removed with the vacuum (Slotnick and Restrepo, 2005). Each odorant was delivered 3 times in the following sequence: amyl-acetate, ethyl-butyrate, limonene (+) and limonene (-). To avoid any interference between applications, the interstimulus interval was set at 300 s (Wilson, 1998; Neville and Haberly, 2003; Le Pichon et al., 2009; Lepousez and Lledo, 2013; Fukunaga et al., 2014; Wu et al., 2020). Simultaneously, the respiratory rhythm was monitored to verify the shallow anesthesia with a piezoelectric sensor attached to the thorax. At the end of the experiments, animals were euthanized with a sodium pentobarbital overdose (50 mg/kg, i.p.; PiSA Agropecuaria, México). LFPs and breathing signals were filtered (0.3 Hz - 0.3 kHz), amplified (7P511L, Grass Instruments Co., Quincy, MA) and digitized at 1 kHz using a MiniDigi 1A (Molecular Devices, San Jose, CA) and Axoscope (v.10.6, Molecular Devices).

2.6. Data analysis

Recordings were analyzed as previously described (Alvarado-Martínez et al., 2013; Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020), with a blind approach (e.g. the analyzer ignored the treatment condition; Villasana-Salazar et al., 2020). The respiratory rate was calculated in three 5 s windows during baseline conditions (Lorea-Hernández et al., 2016). A power spectrum analysis was performed on three randomly selected segments (5 s long) for each experimental condition (baseline and odor-evoked activity) using the fast Fourier transform algorithm with Clampfit software (v.10.7, Molecular Devices). The relative power spectra were calculated in the 1–115 Hz band and expressed as % of power (Peña-Ortega and Bernal-Pedraza, 2012; Alcantara-Gonzalez et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020). The relative power spectra were segmented into the following frequency bands: theta (1–15 Hz), beta (15–30 Hz) and gamma (30–115 Hz) (Villasana-Salazar et al., 2020). All analyses excluded the alternate current-induced noise (55–65 Hz). To evaluate the change in MOB activity during the odor-evoked activity, power during baseline conditions was normalized (set as 100%) for each frequency band and power during odor-evoked activity was calculated as % of basal (Hernández-Soto et al., 2019). Representative time-frequency spectrograms were obtained with NeuroExplorer (v.5.129, Nex Technologies).

2.7. Statistics

Prism software (v.5, GraphPad, CA, USA) was used for statistical analysis. Differences between groups or conditions were considered significant at $p < 0.05$. The normality of data distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. When the assumptions for parametric testing were negative, non-parametric tests were used. Changes in body weight between Normoxia and CIH groups were compared using a one-way repeated measures ANOVA. Animal survival was compared with the Fisher exact test. The effect of CIH on spontaneous activity was assessed with a one-way repeated measures ANOVA with a correction for multiple comparisons (Benjamini, Krieger and Yekutieli False Discovery Rate). The effect of CIH latencies to uncover pellets in the buried food test was assessed with a Mann-Whitney *U* test. To evaluate the differences between exploration times during the habituation/dishabituation, we used a two-way ANOVA. Finally, differences in the cross-habituation index were evaluated with a Mann-Whitney *U* test. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). A Pearson's correlation was performed between respiratory rate and relative theta power. In addition, a cross-correlation between breathing and MOB activity was performed. Similarly, Spearman's correlations

were performed to find relationships between olfactory performance and amyl acetate-induced changes in MOB activity in all frequency bands. In these correlation plots, points were grouped with a Ward hierarchical clustering analysis through a customized algorithm in MATLAB using the linkage.m function for a variable amount of groups (v. 2020a, The MathWorks, MA, USA).

3. Results

3.1. Chronic intermittent hypoxia reduces weight gain and survival

As expected, the animals belonging to both experimental groups had identical weights at the beginning of the protocol (Normoxia: 26.67 ± 0.42 g; $n = 6$; CIH: 27.42 ± 0.73 g; $n = 11$; $p > 0.05$; Fig. 1C). After 21 days of normoxia, control mice significantly increased their body weight (to 28.30 ± 0.55 g; $n = 6$; $p < 0.05$; Fig. 1C). However, mice exposed to CIH for the same period showed a slight but significant reduction in body weight (to 26.73 ± 0.68 g; $n = 11$; $p < 0.05$; Fig. 1C). We also observed a significant increase in mortality after exposure to CIH (1/12 mice, 8.33%; $p < 0.05$; Fig. 1D).

3.2. Chronic intermittent hypoxia alters spontaneous bulbar activity and its response to odors

To evaluate the effects of CIH on MOB spontaneous network activity, we recorded its LFP in shallowly anesthetized animals (Fig. 2A–B). As

previously described (Hernández-Soto et al., 2019), MOB spontaneous network activity in urethane shallowly anesthetized mice exhibited a mixture of oscillatory patterns dominated by a slow rhythm (theta; 1–15 Hz), synchronized with breathing, in both experimental groups (CIH and Normoxia; Figs. 2–3). This slow rhythm coexisted with faster beta (15–35 Hz) and gamma (35–115 Hz) oscillations in both groups (Figs. 2–3). This activity pattern is identical to the one previously described (i.e. Macrides et al., 1982; Le Pichon et al., 2009; Lepousez and Lledo, 2013; Rojas-Líbano et al., 2014; Fukunaga et al., 2014; Lockmann et al., 2018; Fourcaud-Trocmé et al., 2019). Comparison of relative power between groups shows that CIH animals exhibited a higher proportion of theta frequency band power ($92.72 \pm 1.06\%$; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 2B–D) than normoxic animals ($83.31 \pm 3.40\%$; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 2A–D). In contrast, CIH animals exhibited a decreased proportion of both beta and gamma frequency bands power ($5.34 \pm 0.82\%$ and $1.93 \pm 0.35\%$, respectively; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 2B–D) compared to normoxic animals ($10.20 \pm 2.00\%$ and $6.48 \pm 1.49\%$, respectively; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 2A–D).

Considering that respiratory activity can be modulated by intermittent hypoxia (Peña-Ortega, 2017; Camacho-Hernández et al., 2019) and that this activity strongly modulates MOB theta rhythm (Rojas-Líbano et al., 2014), we evaluated whether the change in MOB theta activity is related to a correspondent change in respiratory activity and found that the respiratory rate is not altered in animals treated with CIH (3.45 ± 0.30 Hz, $n = 9$) compared to normoxic animals (2.74 ± 0.33 Hz, $n = 10$; $p > 0.05$; Fig. 3A–B). The cross-correlation between MOB activity and

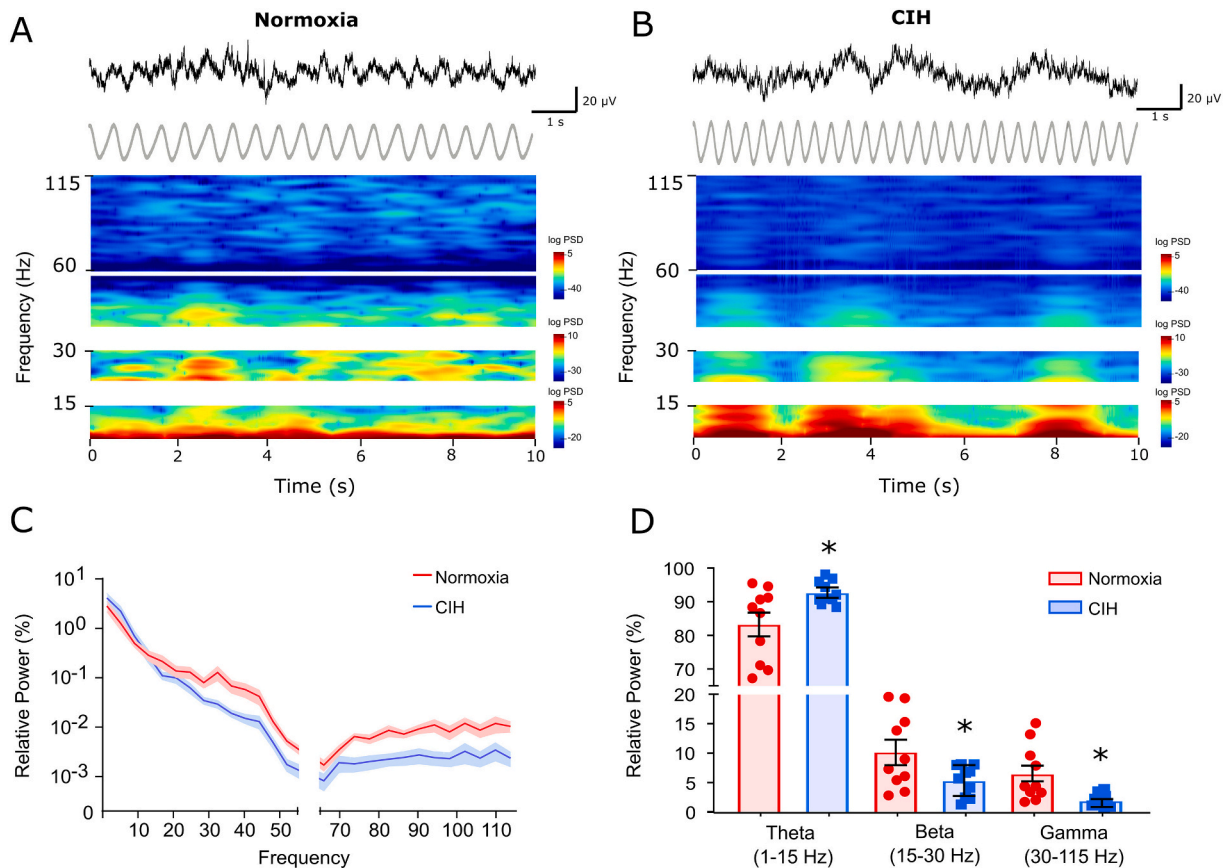


Fig. 2. CIH alters MOB spontaneous activity. A) Representative recordings (top), rhythmic thoracic movements (middle) and spectrograms (bottom) of MOB spontaneous network activity from animals maintained under room air conditions (Normoxia group). B) The same as in (A), but for animals exposed to CIH. The spectrograms were segmented in theta (1–15 Hz), beta (15–30 Hz) and gamma (30–115 Hz) frequency ranges and independently scaled. C) Mean relative power spectra (as % of power) of both groups. The thick, dark line represents the mean, while the clear shadow represents the SEM. Relative power in theta was higher and beta/gamma was lower in the CIH group than in the normoxic group. Note a hiatus around 60 Hz in both the spectrograms and the power spectra due to the presence of a notch filter in this frequency band in our recording conditions. D) Quantification of the relative power during spontaneous activity in theta, beta and gamma frequency bands in both groups ($n = 10$ each one). Data are presented as mean \pm SEM. * denotes a significant difference vs normoxia ($p < 0.05$).

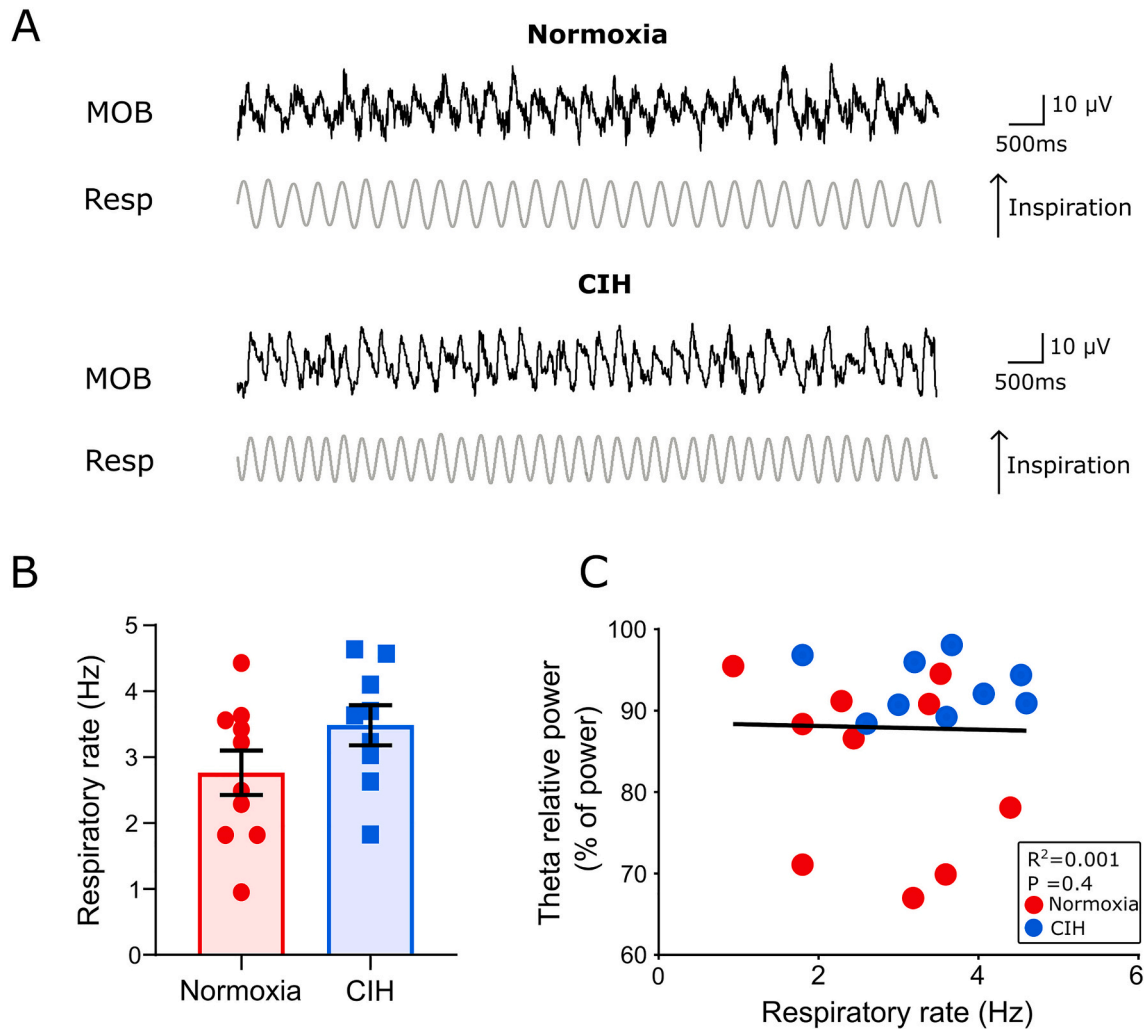


Fig. 3. Breathing frequency is not changed after CIH and is not related to the increase in MOB theta activity. A) Representative traces of simultaneous recordings of the main olfactory bulb (MOB) local field potential (top) and rhythmic thoracic movements (resp; bottom) in animals exposed to normoxia (upper traces) and CIH (lower traces). B) Quantification of the respiratory rate during baseline conditions. Data are presented as mean \pm SEM. ($p > 0.05$). C) Lack of correlation between respiratory rate and theta relative power during MOB spontaneous activity ($p > 0.05$).

breathing is not altered in animals treated with CIH (0.46 ± 0.08 Hz, $n = 9$) compared to normoxic animals (0.41 ± 0.06 Hz, $n = 10$; $p > 0.05$). Furthermore, we found that the respiratory rate is not correlated with the theta relative power in any of the experimental groups ($r^2 = 0.001$; $p > 0.05$; Fig. 3C). Finally, we did not find evident clustering of the points corresponding to the different experimental groups in the correlation plot (Fig. 3C).

3.3. Chronic intermittent hypoxia decreases the bulbar population response to odors

To study the response of MOB activity to odor presentation (amyl acetate, ethyl butyrate, + and - limonene), we calculated the change in LFP power for all described frequency bands as a proportion of “baseline” (set as 100%). As previously described, odor stimulation in anesthetized mice induces an increase in power (Neville and Haberly, 2003; Martin and Ravel, 2014), which includes all frequency bands in the normoxic group but is reduced in CIH animals (Fig. 4). During olfactory stimulation with amyl acetate (Fig. 4A–B), MOB activity increased in normoxic animals in all frequency bands power (theta: to $6102.91 \pm 4548.54\%$ of baseline, beta: $3416.74 \pm 1282.01\%$ of baseline and gamma: $3755.18 \pm 1391.23\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4A–B). In contrast, the change was significantly smaller in the theta (to 253.29

$\pm 76.03\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4A–B), beta (to $1011.22 \pm 597.96\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4A–B) and gamma (to $2009.56 \pm 1013.75\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4A–B) frequency bands power in CIH animals (Fig. 4A–B). During olfactory stimulation with ethyl butyrate, MOB activity increased in normoxic animals in all frequency band power (theta: to $1878.53 \pm 707.18\%$ of baseline, beta: to $3414.12 \pm 1200.27\%$ of baseline and gamma: to $3149.81 \pm 748.64\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4C–D). In contrast, the change was significantly smaller in the theta (to $322.88 \pm 109.65\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4C–D), beta (to $1286.66 \pm 788.84\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4C–D) and gamma (to $1219.66 \pm 484.61\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4C–D) frequency bands power in CIH animals (Fig. 4C–D).

To further assess the effects of CIH on the response of the MOB to odors, and perhaps changes in its specificity, we tested the effects of CIH on the response to aromatic enantiomers. Thus, we recorded MOB activity during stimulation with + and - limonene in animals exposed to CIH and normoxic controls (Fig. 4E–H). We found that during olfactory stimulation with + limonene, MOB activity increased in normoxic animals in all frequency band power (theta: $1147.35 \pm 519.08\%$ of baseline, beta: $1312.34 \pm 384.36\%$ of baseline and gamma: $1664.45 \pm 653.92\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4E–F). In contrast, the change was significantly smaller in the theta (to $163.22 \pm 58.74\%$ of

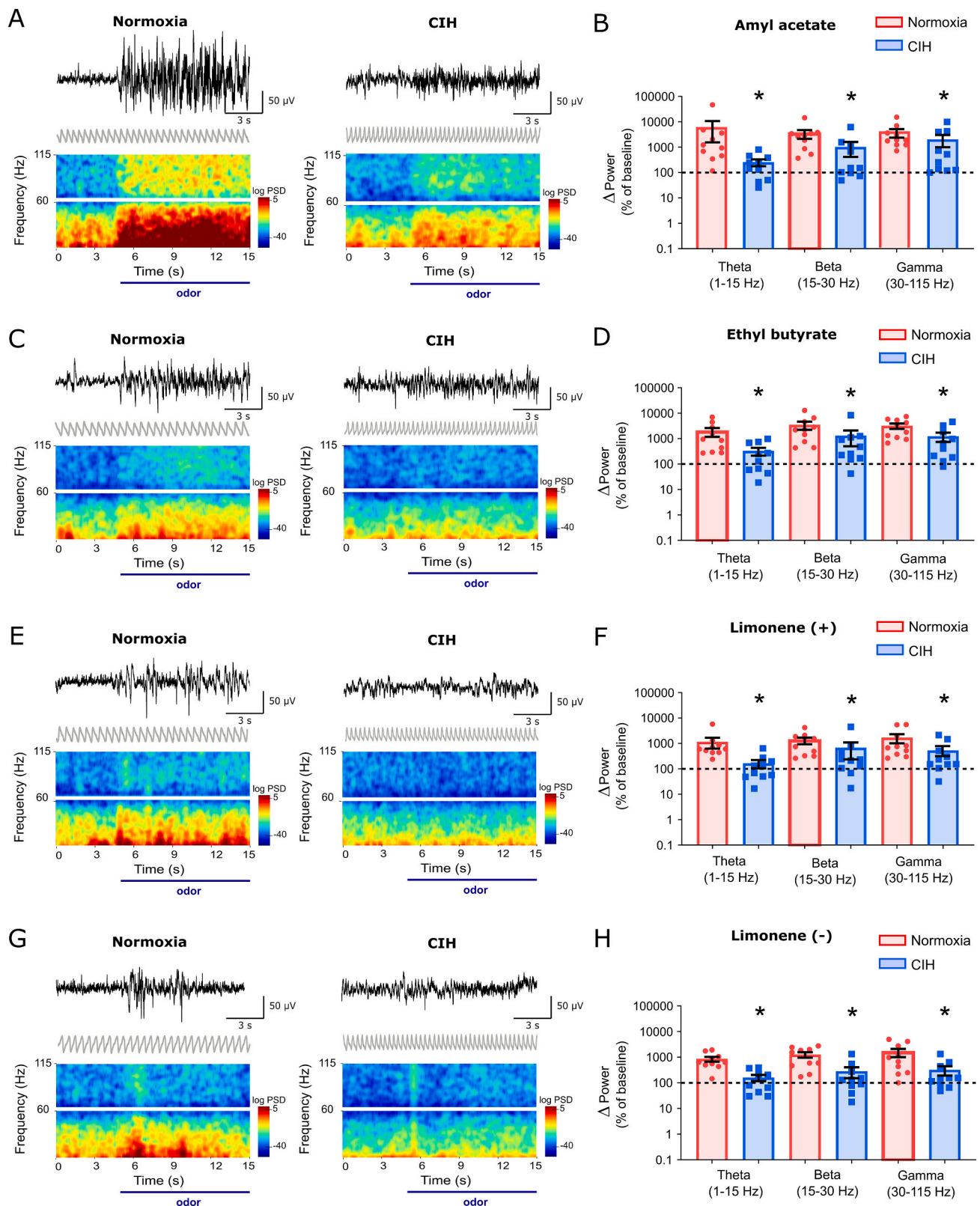


Fig. 4. CIH reduces odor-evoked MOB activity. Representative recordings (top), rhythmic thoracic movements (middle) and spectrograms (bottom) of MOB activity before and during odor presentation (blue line; 10 s) in animals treated with normoxia (left) and CIH (right) when the stimulus was amyl acetate (A), ethyl butyrate (C), + limonene (E) and - limonene (G). Note a hiatus at around 60 Hz in the spectrograms due to the presence of a notch filter in this frequency band in our recording conditions. Quantification of the change in power (Δ power; as % of baseline, represented as a dotted line) of MOB activity in the response to odors is shown for the stimulation with amyl acetate (B), ethyl butyrate (D), + limonene (F) and - limonene (H), in the following frequency bands: theta (1–15 Hz), beta (15–30 Hz) and gamma (30–115 Hz) for both groups ($n = 10$, each). Data are presented as mean \pm SEM. * denotes a significant difference vs normoxia ($p < 0.05$).

baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4E–F), beta (to $664.99 \pm 429.54\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4E–F) and gamma (to $522.16 \pm 222.07\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4E–F) frequency bands power in CIH animals. Finally, we found that during olfactory stimulation with -limonene, MOB activity increased in normoxic animals in all frequency bands (theta: $848.68 \pm 181.41\%$ of baseline, beta: $1255.82 \pm 303.98\%$ of baseline and gamma: $1557.73 \pm 552.75\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4G–H). In contrast, the change was significantly smaller in theta (to $159.06 \pm 43.14\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4G–H), beta (to $277.44 \pm 125.30\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 3G–H) and gamma (to $318.27 \pm 127.20\%$ of baseline; $n = 10$; $p < 0.05$, Fig. 4G–H) frequency bands power in CIH animals. Altogether, these data indicate that CIH exposure impairs MOB neuronal activity and its response to odors, with no specificity to a particular type of odor. All these alterations would be reflected in olfactory impairment. Thus, next we tested the effects of CIH on odor detection and discrimination.

3.4. Chronic intermittent hypoxia disrupts olfaction

To evaluate the effects of CIH on olfactory detection, we used the buried food test (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019) and found that the average latency to uncover the buried pellet was significantly longer in CIH animals (78.27 ± 26.96 s; $n = 6$; $p < 0.05$, Fig. 5) than in normoxic mice (24.32 ± 5.72 s; $n = 6$; $p < 0.05$, Fig. 5). Furthermore, there were no differences among groups in the time to reach a visible pellet (CIH group: 11.77 ± 1.36 s; Normoxic group: 9.47 ± 2.12 s; $n = 6$ to both groups; $p > 0.05$, Fig. 5).

To further elucidate the effects of CIH on olfaction, we evaluated the short-term adaptation and the discrimination aspects of this function through the habituation/dishabituation test (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). Normoxic mice profusely explored odors and exhibited the odor habituation and dishabituation phenomena, which were not observed in the CIH group (Fig. 6). When the odorants were applied for the first time, the animals exposed to CIH scarcely explored them (vinegar 1st: 4.87 ± 1.62 s and vanilla 1st: 1.97 ± 0.44 s; $n = 11$; $p < 0.05$, Fig. 6A) compared to control normoxic animals (vinegar 1st: 14.73 ± 3.90 s and vanilla 1st: 7.82 ± 1.86 s; $n = 10$; Fig. 5A). Aside from these

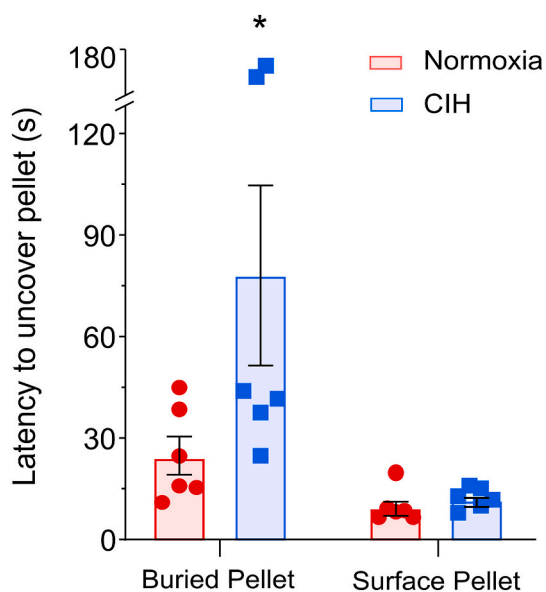


Fig. 5. CIH impairs odor identification. Quantification of the latency to reach an odorous pellet by normoxic and CIH animals ($n = 6$, each) while the pellet was hidden underneath the sawdust (left bars) or at plain sight (right bars). The maximal time allowed for the test was 600 s. Mice exposed to CIH take longer to uncover a hidden odor source. Data are presented as mean \pm SEM. * denotes a significant difference vs normoxia group ($p < 0.05$).

differences in exploration time between groups, we also compared their habituation to the repeated odor presentation through normalized exploration (first stimulus set as 100%) (Fig. 6B–C) and found that control animals exposed to normoxia are capable of habituating to olfactory stimuli, which is reflected in a significantly reduced exploration of the repetitive exposures to both odors ($13.72 \pm 4.93\%$ and $43.84 \pm 24.82\%$ in the third presentation of vinegar and vanilla respectively, $p < 0.05$, Fig. 6B). In contrast, animals exposed to CIH were not capable of habituating to repetitive olfactory stimuli, since they did not reduce their exploration during the repetitive stimulation ($51.12 \pm 22.92\%$ and $223.10 \pm 72.14\%$ in the third presentation of vinegar and vanilla respectively, Fig. 6C). To better assess the olfactory discrimination between odors (dishabituation), we calculated the “cross-habituation index” (Wesson et al., 2010) by subtracting the normalized exploration to the third presentation of one odor to normalize the exploration to the first stimulation of the next odor and found that CIH animals exhibited a significantly smaller cross-habituation index (-33 ± 46.81 ; $n = 11$; $p < 0.05$, Fig. 6D) than normoxic control animals (72.61 ± 8.74 ; $n = 10$; Fig. 6D). Altogether, the results indicate that CIH affects odor processing; specifically, odor identification, discrimination and learning.

To evaluate a possible relationship between olfactory performance and MOB response to odors, we performed correlation and cluster analyses between olfactory scores and the MOB population response to amyl acetate in different frequency bands power (Fig. 7). We found that the latency to find the hidden food correlates with the change in the power of MOB activity to an odor (amyl acetate) in all frequency bands (Theta: $r^2 = 0.56$, $p < 0.05$; Beta: $r^2 = 0.60$, $p < 0.05$; Gamma: $r^2 = 0.59$, $p < 0.05$; Fig. 7A). However, this correlation was not observed with the cross-habituation index (Theta: $r^2 = 0.33$, $p > 0.05$; Beta: $r^2 = 0.21$, $p > 0.05$; Gamma: $r^2 = 0.19$, $p > 0.05$; Fig. 7B). The hierarchical clustering analysis revealed that the animals exposed to CIH are clustered in a homogeneous group in most of the correlation plots, while the normoxic animals represent a more heterogeneous population although clearly differentiated from the CIH cluster (Fig. 7).

4. Discussion

Despite the well-known relationship between OSA and olfactory dysfunctions (Salihoglu et al., 2014; Magliulo et al., 2018), the impact of CIH on olfaction and MOB activity had not been evaluated before our study. To fill this void, we characterized the alterations induced by CIH on MOB activity and olfaction and found that CIH modifies MOB neural network activity and its response to odors while inducing olfactory impairment. Since MOB function depends on the synchronized activity of its neural components (Rojas-Libano et al., 2014), which leads to the generation of various odor-sensitive oscillatory patterns (Martin et al., 2006; Neville and Haberly, 2003; Rojas-Libano et al., 2014), alterations in OB neurons affect MOB oscillatory activity and olfaction (Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020). Moreover, CIH affects neurogenesis (Khuu et al., 2019) and alterations in neurogenesis disrupt olfaction (Lietzau et al., 2018), including odor habituation/dishabituation (Lietzau et al., 2018) and the buried pellet test (Lietzau et al., 2018), which is likely involved in CIH-induced olfactory impairment.

As reported for other pathological conditions (Grassi et al., 1996; Cheaha et al., 2015; Zhou et al., 2017), and as observed in the EEG of patients with OSA (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020), CIH increased the proportion of MOB slow (theta) activity (Fig. 2). MOB theta is closely related to olfactory exploration (sniffing; Kay et al., 2009) and odor learning (Macrides et al., 1982; Kay et al., 2009), which indicates that alterations in this rhythm would highly impact olfactory function (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019). Considering that theta oscillations in the MOB are coupled to the respiratory rhythm (Rojas-Libano et al., 2014; Wu et al., 2020) and that the respiratory rhythm is modulated by acute and chronic intermittent hypoxia (Peña-Ortega, 2017; Camacho-Hernández et al., 2019), we explored if our CIH protocol changed the

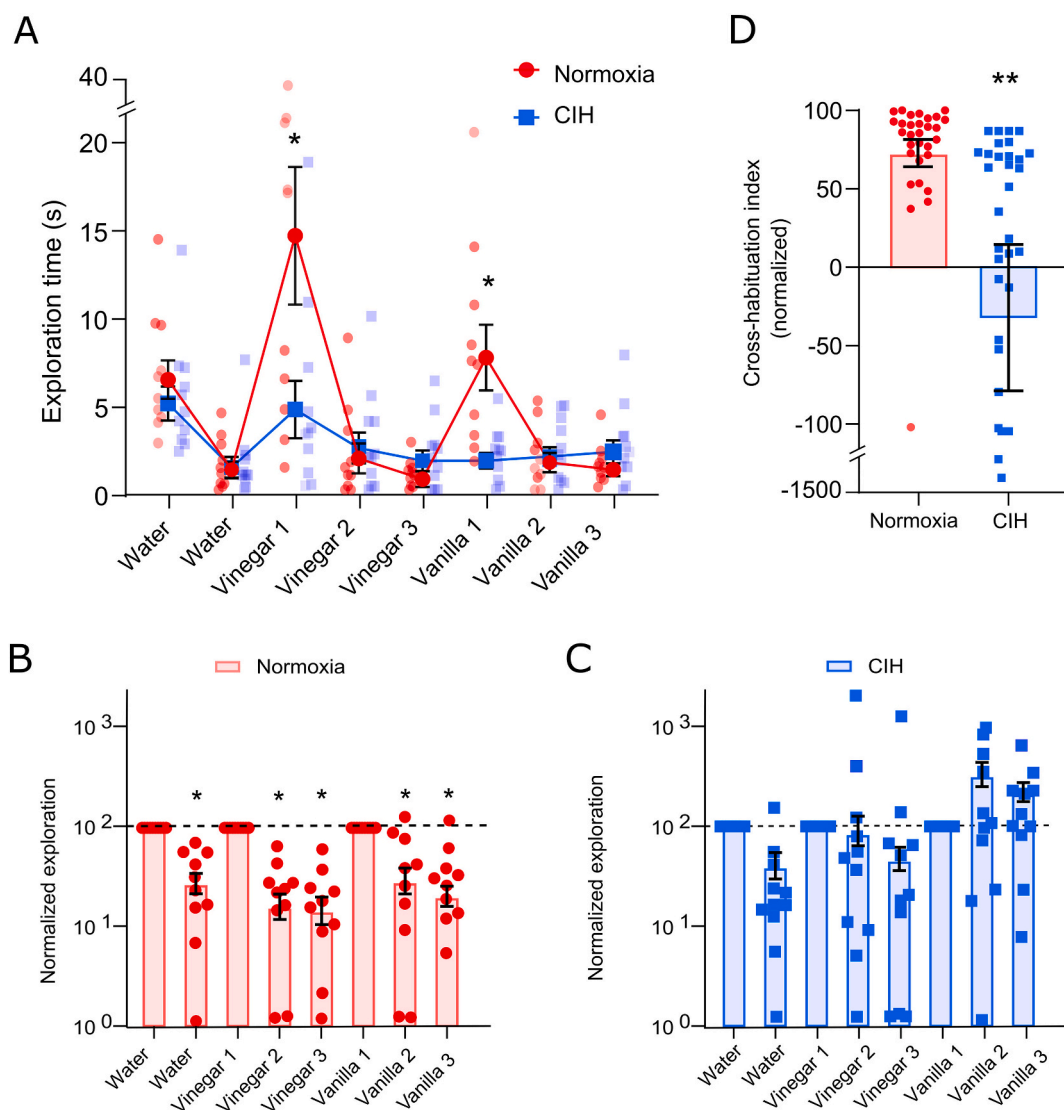


Fig. 6. CIH impairs odor habituation and discrimination. A) Exploration time to different odor presentations for animals of the normoxic ($n = 10$) and CIH ($n = 11$) groups. Alternatively, normalized exploration time (as % of the first exposure) for normoxic (B) and CIH (C) animals are also presented. Note that normoxic animals exhibited a reduction in the exploration time after repetitive stimulation with the same odor (habituation) and an increase upon change in the presented odor (dishabituation), which was not observed in CIH animals. D) Quantification of the cross-habituation index (discrimination) for CIH and normoxic animals. Note a significant reduction in cross-habituation in CIH mice. Data are presented as mean \pm SEM. * denotes a significant difference vs normoxic group ($p < 0.05$).

respiratory rhythm and found that it is not the case (Fig. 3). Thus, the increase in theta rhythm in CIH animals cannot be associated with a change in inspiratory modulation. This finding is similar to the lack of relationship between changes in breathing pattern and alterations in MOB oscillatory activities during fasting (Wu et al., 2020). Another external influence on MOB theta oscillations is the hippocampal theta rhythm (Kay, 2005). However, we have recently shown that the intrinsic hippocampal theta rhythm in vitro is not altered after an identical CIH exposure (Villasana-Salazar et al., 2020). Still, the increase in theta power observed in the MOB can be due to an increased pathological theta-coupling with other extra-hippocampal structures (e.g. the temporal or prefrontal cortex; Grassi et al., 1996; Salimi et al., 2019). Alternatively, the increase in theta activity after CIH could also be explained by changes in the circuitry within the MOB. Since the rhythmic activity arriving at the olfactory glomeruli in theta frequency recruits local inhibition from juxtglomerular interneurons innervating mitral/tufted cells, which amplify theta activity within the MOB (Fukunaga et al., 2014), it is likely that the already reported changes produced by CIH on extrabulbar interneurons (Yuan et al., 2015; Liang

et al., 2016, 2020) might include the bulbar juxtglomerular interneuron network leading to the increase in MOB theta activity. The increase in MOB slow activity after CIH resembles the EEG slowing observed in Alzheimer's disease (Peña-Ortega, 2013, 2019), inflammation (Peña-Ortega, 2019) and indeed in OSA patients (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020), which has been correlated to a variety of behavioral alterations.

We also found that CIH decreases the proportion of fast (beta and gamma) activity. Beta and gamma rhythms are associated with odor discrimination and learning (Hermer-Vazquez et al., 2007; Kay and Beshel, 2010; Fourcaud-Trocmé et al., 2019), while gamma rhythm is also related to odor detection (Martin et al., 2007; Chapuis et al., 2009; Lockmann et al., 2018). Since beta oscillations mainly rely on the centrifugal interactions with extrabulbar structures (Martin et al., 2007; Hermer-Vazquez et al., 2007; Chapuis et al., 2009; Kay and Beshel, 2010; Lockmann et al., 2018; Fourcaud-Trocmé et al., 2019), it is likely that, as further discussed later, the reduction in beta oscillations induced by CIH is reflecting alterations in extrabulbar structures intimately related to the MOB (Martin et al., 2006; Neville and Haberly, 2003),

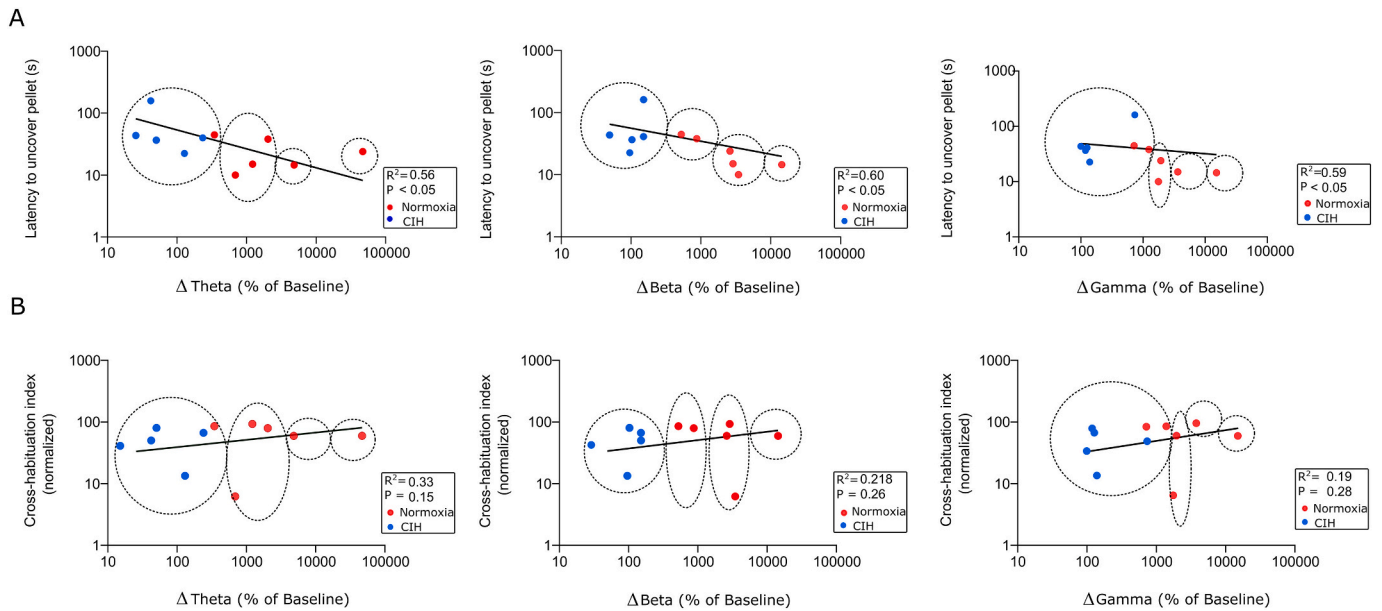


Fig. 7. Correlation between MOB population response to odors with olfactory detection but not with odor discrimination. Correlation plots between olfactory performance with the change in normalized power (% of baseline) of the MOB during exposure to amyl acetate in different frequency bands (Δ theta: 1–15 Hz, left; Δ beta: 15–30 Hz, middle and Δ gamma: 30–115 Hz, right) for all tested animals, including CIH (red dots) and normoxic (red dots) animals. Aside from the linear regressions (black line), dots were grouped through hierarchical clustering (dotted circles). Note that CIH animals are always grouped in the same cluster differentiated from normoxic clusters. Significant correlations were found between the response of the MOB to amyl acetate, in all frequency bands power, with odor detection (latency to uncover pellet; upper graphs) but not with the cross-habituation index (lower graphs).

such as the hippocampus (Villasana-Salazar et al., 2020) or the cortex (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020). Interestingly, alterations in olfactory habituation have also been associated with changes in olfactory related cortices (Wilson, 1998; Smith et al., 2009; Campolongo et al., 2018). As for the theta activity increase, the reduction in MOB fast (beta and gamma) activity also resembles the EEG slowing observed in Alzheimer's disease (Peña-Ortega, 2013, 2019), inflammation (Peña-Ortega, 2019) and OSA patients (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020).

Gamma oscillations are mainly generated within the MOB (Fukunaga et al., 2014), and mostly arise from the dendrodendritic synapses between the mitral cells and granular interneurons (Rojas-Libano and Kay, 2008; Fukunaga et al., 2014; Osinski and Kay, 2016; Osinski et al., 2018). The amount of gamma is enhanced during odor detection and discrimination (Beshel et al., 2007; Lepousez and Lledo, 2013), and is closely related to olfactory task demands (Beshel et al., 2007). Moreover, alterations in MOB gamma activity have been associated with olfactory dysfunction (Lepousez and Lledo, 2013; Cheaha et al., 2015; Li et al., 2019). Considering that MOB gamma oscillations mostly rely on the activity of granule interneurons (Rojas-Libano and Kay, 2008; Fukunaga et al., 2014; Osinski and Kay, 2016; Osinski et al., 2018), it is likely that the changes produced by CIH on interneurons (Yuan et al., 2015; Liang et al., 2016, 2020) might reach the bulbar granule interneuron network decreasing MOB gamma activity. In fact, reducing GABAergic inhibition alters gamma activity and olfactory performance (Lagier et al., 2004; Bathellier et al., 2010; Lepousez and Lledo, 2013). Alternatively, the CIH-induced reduction in NMDA-mediated transmission, already found in the hippocampus (Arias-Cavieres et al., 2020) and the nucleus of the solitary tract (De Paula et al., 2007; Almado et al., 2012), could account for the reduction in MOB gamma oscillations, since NMDA receptors at the dendrodendritic synapses, mainly those between granule and principal cells, are essential for MOB gamma generation (Osinski et al., 2018).

The MOB network suffers a reconfiguration process while transiting from spontaneous network activity in the absence of odors to odor-induced neural network activity, which involves not only an increase

in activity power (Lagier et al., 2004; Le Pichon et al., 2009; Cheaha et al., 2015; Chelminski et al., 2017; Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020) but also changes in cellular elements and synaptic interactions required for the transition from one activity pattern to the other (Friedman and Strowbridge, 2003; Lagier et al., 2004). This reconfiguration process seems to be necessary for proper olfactory information processing (Wu et al., 2020) and is reduced under stressful conditions that affect olfaction (Wu et al., 2020). Coincidentally, here we show that CIH affects the change in the MOB activity pattern induced by the presence of odors, at least the increase in overall power (Fig. 4). Thus, it is likely that this functional alteration in MOB responsiveness might be related to CIH-induced olfactory dysfunction. Similarly, in the hippocampus, CIH alters the synaptic plasticity induced by repetitive input stimulation, which was associated with a reduction in hippocampal-dependent tasks (Payne et al., 2004; Arias-Cavieres et al., 2020).

In summary, here we found that CIH alters MOB activity, which correlates with olfactory dysfunction. The association of both phenomena has been found under other pathological or stressful conditions (Le Pichon et al., 2009; Cheaha et al., 2015; Chelminski et al., 2017; Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020). The olfactory alterations in these conditions have been related to a variety of changes in intrinsic and synaptic properties of bulbar neurons (Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020), including alterations in the firing activity of olfactory neurons (Li et al., 2019; Wu et al., 2020), their response to odor stimuli (Wu et al., 2020) and their synaptic interactions (Le Pichon et al., 2009; Zhang et al., 2018; Li et al., 2019), which can be also the case for the alterations induced by CIH. This is likely because CIH alters intrinsic and synaptic properties in different circuits (Payne et al., 2004; De Paula et al., 2007; Almado et al., 2012; Arias-Cavieres et al., 2020; Villasana-Salazar et al., 2020). These potential changes in the olfactory circuits need to be explored to identify possible therapeutic targets to counteract the effects of CIH on olfactory function, which could be useful for the treatment of hyposmia in OSA patients.

It must be acknowledged that CIH-induced deterioration in olfactory function is sturdier than the CIH-induced changes in MOB network

activity. This apparent dissociation between a moderate reduction in a single-site LFP power and a clear deterioration in behavior has been observed in other pathological conditions and circuits (Radwan et al., 2016; Bygrave et al., 2019). In the absence of major changes in oscillatory activity power, behavioral alterations can be associated to alterations in the temporarily ordered and dynamic activation of ensembles within a given circuit (Radwan et al., 2016) or between distant networks (Bygrave et al., 2019). For instance, mice lacking the GLUA1 protein (which is related to schizophrenia), show impaired spatial working memory and stimulus habituation, which are not related to a dramatic change in slow or fast oscillations (although some slight state-dependent alterations in power are observed; Bygrave et al., 2019) but are, instead, correlated to major alterations in hippocampal–prefrontal coherence, in a demand-dependent manner. Similarly, cognitive discrimination deficits in fragile X mental retardation protein 1-deficient mice were not related to a dramatic change in slow or fast oscillations (Radwan et al., 2016), but were closely correlated with alterations in the dynamic transitions in the theta/gamma coupling along the somato-dendritic axis of CA1 during different demands (Radwan et al., 2016), producing what has been called a discoordinated state (Radwan et al., 2016). It must be acknowledged too, that dynamic functional impairments would be difficult to detect by steady-state measurements, by recording only one structure, or by only analyzing the changes in power of oscillatory activity. These limitations are present in our study and need to be amended by evaluating the activity of the MOB (and simultaneously other related circuits) under different olfactory demands and/or by simultaneously recording all its cellular types and layers. As it is now, we cannot discard that CIH produces differential changes within the MOB (beyond the recorded granular layer) or other extrabulbar olfactory circuits. In fact, there are olfactory-related extrabulbar structures affected by CIH, perhaps more than the MOB, such as the piriform cortex (Mukai et al., 2013), the entorhinal cortex-hippocampal circuit (Mukai et al., 2013; Villasana-Salazar et al., 2020) and neuromodulatory networks (Ma et al., 2008; Mukai et al., 2013), that could influence the CIH-induced olfactory dysfunction. The contribution of these extrabulbar circuits to the CIH-induced olfactory dysfunction needs to be addressed.

5. Conclusion

Our findings provide evidence that CIH disrupts MOB spontaneous and odor-evoked activity, which correlates with alterations in olfaction. It is likely that the hyposmia observed in OSA patients is induced by CIH-induced alterations in the MOB and, perhaps, in other extrabulbar circuits. Further studies are needed to reveal the cellular and network mechanisms underlying these alterations and their possible reversal.

Funding

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México (grant number IN202018, IG200521) and by CONACyT (grant number A1-S-7540), México.

Author's contributions

Rebeca Hernández-Soto, Benjamín Villasana-Salazar and Fernando Peña-Ortega designed the experiments. Rebeca Hernández-Soto and Fernando Peña-Ortega wrote the manuscript. Rebeca Hernández-Soto and Benjamín Villasana-Salazar performed the electrophysiological recordings, behavioral test and analyzed the data. Benjamín Villasana-Salazar and Laura Pinedo-Vargas monitored the animals during the chronic intermittent hypoxia protocol. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors have no financial conflicts of interest.

Acknowledgements

Rebeca Hernández-Soto, Benjamín Villasana-Salazar, Laura Pinedo-Vargas are graduate students at “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas” at “Universidad Nacional Autónoma de México” (UNAM) and received fellowships (No. 612139, 587113 and 621862, respectively) from “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACyT), México. Authors thank Jessica González Norris and Anaid Antaramian for editorial comments and Benito Ordaz for technical support.

References

- Alcantara-Gonzalez, D., Villasana-Salazar, B., Peña-Ortega, F., 2019. Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine-induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus* 29 (12), 1150–1164. <https://doi.org/10.1002/hipo.23129>.
- Almado, C.E.L., Machado, B.H., Leao, R.M., 2012. Chronic intermittent hypoxia depresses afferent neurotransmission in NTS neurons by a reduction in the number of active synapses. *J. Neurosci.* 32 (47), 16736–16746. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2654-12.2012>.
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., Peña-Ortega, F., 2013. Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS One* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075745>.
- Arias-Cavieres, A., Khuu, M.A., Nwakudu, C.U., Barnard, J.E., Dalgin, G., Garcia III, A.J., 2020. A HIF1a-dependent pro-oxidant state disrupts synaptic plasticity and impairs spatial memory in response to intermittent hypoxia. *Eneuro* 7 (3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0024-20.2020>.
- Banabilih, S.M., Suzina, A.H., Mohamad, H., Dinsuhaimi, S., Samsudin, A.R., Singh, G.D., 2010. Assessment of 3-D nasal airflow morphology in Southeast Asian adults with obstructive sleep apnea using acoustic rhinometry. *Clin. Oral Investig.* 14 (5), 491–498. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0342-9>.
- Bathellier, B., Gschwend, O., Carleton, A., 2010. Temporal coding in olfaction. In: *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press/Taylor & Francis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55968/>.
- Beshel, J., Kopell, N., Kay, L.M., 2007. Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *J. Neurosci.* 27 (31), 8358–8365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1199-07.2007>.
- Buck, L.B., 2004. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr. Rev.* 62 (suppl 3), S184–S188. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00097.x>.
- Bushdid, C., Magnasco, M.O., Vossell, L.B., Keller, A., 2014. Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343 (6177), 1370–1372. <https://doi.org/10.1126/science.1249168>.
- Bygrave, A.M., Jahans-Price, T., Wolff, A.R., Sprengel, R., Kullmann, D.M., Bannerman, D.M., Kätzel, D., 2019. Hippocampal-prefrontal coherence mediates working memory and selective attention at distinct frequency bands and provides a causal link between schizophrenia and its risk gene GRIA1. *Transl Psychiatry* 9 (1), 142. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0471-0>.
- Camacho-Hernández, N.P., Lorea-Hernández, J.J., Peña-Ortega, F., 2019. Microglial modulators reduce respiratory rhythm long-term facilitation in vitro. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 265, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.012>.
- Campolongo, M., Kazlauskas, N., Falasco, G., Urrutia, L., Salgueiro, N., Höcht, C., Depino, A.M., 2018. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Mol. Autism* 9 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0221-9>.
- Chapuis, J., Garcia, S., Messaoudi, B., Thevenet, M., Ferreira, G., Gervais, R., Ravel, N., 2009. The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. *J. Neurosci.* 29 (33), 10287–10298. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0505-09.2009>.
- Cheaha, D., Bumrungsri, S., Chatpun, S., Kumarnsit, E., 2015. Characterization of in utero valproic acid mouse model of autism by local field potential in the hippocampus and the olfactory bulb. *Neurosci. Res.* 98, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.04.006>.
- Chelminski, Y., Magnan, C., Luquet, S.H., Everard, A., Meunier, N., Gurden, H., Martin, C., 2017. Odor-induced neuronal rhythms in the olfactory bulb are profoundly modified in ob/ob obese mice. *Front. Physiol.* 8, 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00002>.
- Cornejo-Montes-de-Oca, J.M., Hernández-Soto, R., Isla, A.G., Morado-Urbina, C.E., Peña-Ortega, F., 2018. Tolfenamic acid prevents amyloid β -induced olfactory bulb dysfunction in vivo. *Curr. Alzheimer Res.* 15 (8), 731–742. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180223091233>.
- De Paula, P.M., Tolstykh, G., Mifflin, S., 2007. Chronic intermittent hypoxia alters NMDA and AMPA-evoked currents in NTS neurons receiving carotid body chemoreceptor inputs. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 292 (6), R2259–R2265. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00760.2006>.
- Doğan, A., Bayar Muluk, N., Şahin, H., 2019. Olfactory bulb volume and olfactory sulcus depth in patients with OSA: an MRI evaluation. *Ear Nose Throat J.* 0145561319881571 <https://doi.org/10.1177/0145561319881571>.
- Doty, R.L., Bruggler, W.E., Jurs, P.C., Orndorff, M.A., Snyder, P.J., Lowry, L.D., 1978. Intra-nasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol. Behav.* 20 (2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(78\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(78)90070-7).

- Fourcaud-Trocme, N., Lefevre, L., Garcia, S., Messaoudi, B., Buonviso, N., 2019. High beta rhythm amplitude in olfactory learning signs a well-consolidated and non-flexible behavioral state. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56340-y>.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edn. Academic, New York. ISBN: 978-0123742445.
- Friedman, D., Strowbridge, B.W., 2003. Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 89 (5), 2601–2610. <https://doi.org/10.1152/jn.00887.2002>.
- Fu, D., Pinto, J.M., Wang, L., Chen, G., Zhan, X., Wei, Y., 2015. The effect of nasal structure on olfactory function in patients with OSA. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 272 (2), 357–362. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3096-1>.
- Fukunaga, I., Herb, J.T., Kollo, M., Boyden, E.S., Schaefer, A.T., 2014. Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 17 (9), 1208. <https://doi.org/10.1038/nn.3760>.
- Grassi, B., Locatelli, M., Lazzarin, A., Scarone, S., 1996. Temporal lobe electroencephalogram power modifications during olfactory stimulation in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12 (6), 547–551. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.547>.
- Günbey, E., Güzel, A., Karlı, R., Ünal, R., 2015. The relationships between the clinical and polysomnographic findings and the olfactory function in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath.* 19 (4), 1301–1307. <https://doi.org/10.1007/s11325-015-1165-3>.
- Heiser, C., Zimmermann, I., Sommer, J.U., Hörmann, K., Herr, R.M., Stuck, B.A., 2013. Pharyngeal chemosensitivity in patients with obstructive sleep apnea and healthy subjects. *Chem. Senses* 38 (7), 595–603. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt031>.
- Hermer-Vazquez, R., Hermer-Vazquez, L., Srinivasan, S., Chapin, J.K., 2007. Beta-and gamma-frequency coupling between olfactory and motor brain regions prior to skilled, olfactory-driven reaching. *Exp. Brain Res.* 180 (2), 217–235. <https://doi.org/10.1007/s00221-007-0850-2>.
- Hernández-Soto, R., Rojas-García, K.D., Peña-Ortega, F., 2019. Sudden intrabulbar amyloid increase simultaneously disrupts olfactory bulb oscillations and odor detection. *Neural Plastic.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3424906>.
- Kang, J.M., Kim, S.T., Mariani, S., Cho, S.E., Winkelman, J.W., Park, K.H., Kang, S.G., 2020. Difference in spectral power density of sleep EEG between patients with simple snoring and those with obstructive sleep apnea. *Sci. Rep.* 10 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62915-x>.
- Kay, L.M., 2005. Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (10), 3863–3868. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407920102>.
- Kay, L.M., 2015. Olfactory system oscillations across phyla. *Curr. Opin. Neurobiol.* 31, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.10.004>.
- Kay, L.M., Beshel, J., 2010. A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. *J. Neurophysiol.* 104 (2), 829–839. <https://doi.org/10.1152/jn.00166.2010>.
- Kay, L.M., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Líbano, D., Kopell, N., 2009. Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci.* 32 (4), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.008>.
- Khuu, M.A., Pagan, C.M., Nallamothu, T., Hevner, R.F., Hodge, R.D., Ramirez, J.M., García, A.J., 2019. Intermittent hypoxia disrupts adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 39 (7), 1320–1331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-18.2018>.
- Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Nishihara, M., Mori, Y., 2009. Main olfactory system mediates social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Eur. J. Neurosci.* 29 (4), 777–785. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06618.x>.
- Lagier, S., Carleton, A., Lledo, P.M., 2004. Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates γ oscillations in the rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 24 (18), 4382–4392. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5570-03.2004>.
- Le Pichon, C.E., Valley, M.T., Polymenidou, M., Chesler, A.T., Sagdullaev, B.T., Aguzzi, A., Firestein, S., 2009. Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat. Neurosci.* 12 (1), 60–69. <https://doi.org/10.1038/nn.2238>.
- Lepouez, G., Lledo, P.M., 2013. Odor discrimination requires proper olfactory fast oscillations in awake mice. *Neuron* 80 (4), 1010–1024. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.025>.
- Li, W., Li, S., Shen, L., Wang, J., Wu, X., Li, J., Tu, C., Ye, X., Ling, S., 2019. Impairment of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb of APP/PS1 mice. *Front. Aging Neurosci.* 1, 2. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00002>.
- Liang, D., Li, G., Liao, X., Yu, D., Wu, J., Zhang, M., 2016. Developmental loss of parvalbumin-positive cells in the prefrontal cortex and psychiatric anxiety after intermittent hypoxia exposures in neonatal rats might be mediated by NADPH oxidase-2. *Behav. Brain Res.* 296, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.033>.
- Liang, D., Fan, F., Ding, W., Fang, Y., Hu, L., Lei, B., Zhang, M., 2020. Increased seizure susceptibility for rats subject to early life hypoxia might be associated with brain dysfunction of NRG1-ErbB4 signaling in parvalbumin interneurons. *Mol. Neurobiol.* 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02100-3>.
- Lietzau, G., Davidsson, W., Östenson, C.G., Chiazza, F., Nathanson, D., Pintana, H., Skogsberg, J., Klein, T., Nyström, T., Darsalia, V., Patrone, C., 2018. Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity; effects partly reversed by the DPP-4 inhibitor Linagliptin. *Acta Neuropathol. Commun.* 6 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0517-1>.
- Lockmann, A.L., Laplagne, D.A., Tort, A.B., 2018. Olfactory bulb drives respiration-coupled beta oscillations in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 48 (8), 2663–2673. <https://doi.org/10.1111/ejn.13665>.
- Lorea-Hernández, J.J., Morales, T., Rivera-Angulo, A.J., Alcantara-Gonzalez, D., Peña-Ortega, F., 2016. Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoregulation. *Glia* 64 (4), 603–619. <https://doi.org/10.1002/glia.22951>.
- Ma, S., Mifflin, S.W., Cunningham, J.T., Morilak, D.A., 2008. Chronic intermittent hypoxia sensitizes acute hypothalamic-pituitary-adrenal stress reactivity and Fos induction in the rat locus coeruleus in response to subsequent immobilization stress. *Neuroscience* 154 (4), 1639–1647. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.068>.
- Macrides, F., Eichenbaum, H.B., Forbes, W.B., 1982. Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *J. Neurosci.* 2 (12), 1705–1717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.02-12-01705.1982>.
- Magliulo, G., De Vincentiis, M., Iannella, G., Ciofalo, A., Pasquariello, B., Manno, A., Angeletti, D., Polimeni, A., 2018. Olfactory evaluation in obstructive sleep apnoea patients. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 38 (4), 338–345. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-1981>.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L.B., 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96 (5), 713–723. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80581-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80581-4).
- Martin, C., Ravel, N., 2014. Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks? *Front. Behav. Neurosci.* 8, 218. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00218>.
- Martin, C., Gervais, R., Messaoudi, B., Ravel, N., 2006. Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. *Eur. J. Neurosci.* 23 (7), 1801–1810. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04711.x>.
- Martin, C., Beshel, J., Kay, L.M., 2007. An olfactory-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning. *J. Neurophysiol.* 98 (4), 2196–2205. <https://doi.org/10.1152/jn.00524.2007>.
- Masurkar, A.V., Devanand, D.P., 2014. Olfactory dysfunction in the elderly: basic circuitry and alterations with normal aging and Alzheimer's disease. *Curr. Geriatrics Rep.* 3 (2), 91–100. <https://doi.org/10.1007/s13670-014-0080-y>.
- Miyamoto, T., Miyamoto, M., Iwanami, M., Suzuki, K., Inoue, Y., Hirata, K., 2009. Odor identification test as an indicator of idiopathic REM sleep behavior disorder. *Mov. Dis.* 24 (2), 268–273. <https://doi.org/10.1002/mds.22361>.
- Moraes, D.J., Machado, B.H., 2015. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 593 (3), 619–634. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283085>.
- Mosienko, V., Chang, A.J., Alenina, N., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., 2017. Rodents and humans are able to detect the odour of L-lactate. *PLoS One* 12 (5), e0178478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178478>.
- Mukai, T., Nagao, Y., Nishioka, S., Hayashi, T., Shimizu, S., Ono, A., Sakagami, Y., Watanabe, S., Ueda, Y., Hara, M., Tokudome, K., Kato, R., Matsumura, Y., Ohno, Y., 2013. Preferential suppression of limbic Fos expression by intermittent hypoxia in obese diabetic mice. *Neurosci. Res.* 77 (4), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.09.013>.
- Muñoz-Torres, Z., Jiménez-Correa, U., Montes-Rodríguez, C.J., 2020. Sex differences in brain oscillatory activity during sleep and wakefulness in obstructive sleep apnea. *J. Sleep Res.* e12977. <https://doi.org/10.1111/jsr.12977>.
- Nanduri, J., Peng, Y.J., Wang, N., Khan, S.A., Semenza, G.L., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2017. Epigenetic regulation of redox state mediates persistent cardiorespiratory abnormalities after long-term intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 595 (1), 63–77. <https://doi.org/10.1113/JP272346>.
- Neville, K.R., Haberly, L.B., 2003. Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J. Neurophysiol.* 90 (6), 3921–3930. <https://doi.org/10.1152/jn.00475.2003>.
- Osinski, B.L., Kay, L.M., 2016. Granule cell excitability regulates gamma and beta oscillations in a model of the olfactory bulb dendrodendritic microcircuit. *J. Neurophysiol.* 116 (2), 522–539. <https://doi.org/10.1152/jn.00988.2015>.
- Osinski, B.L., Kim, A., Xiao, W., Mehta, N.M., Kay, L.M., 2018. Pharmacological manipulation of the olfactory bulb modulates beta oscillations: testing model predictions. *J. Neurophysiol.* 120 (3), 1090–1106. <https://doi.org/10.1152/jn.00090.2018>.
- Payne, R.S., Goldbart, A., Gozal, D., Schurr, A., 2004. Effect of intermittent hypoxia on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1029 (2), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.045>.
- Peña-Ortega, F., 2013. Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *J. Neurodegen. Dis.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/657470>.
- Peña-Ortega, F., 2017. Neural network reconfigurations: Changes of the respiratory network by hypoxia as an example. In: *The Plastic Brain*. Springer, Cham, pp. 217–237. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_12.
- Peña-Ortega, F., 2019. Brain arrhythmias induced by amyloid beta and inflammation: involvement in Alzheimer's disease and other inflammation-related pathologies. *Curr. Alzheimer Res.* 16 (12), 1108–1131. <https://doi.org/10.2174/1567205017666191213162233>.
- Peña-Ortega, F., Bernal-Pedraza, R., 2012. Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *Int. J. Pept.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/236289>.
- Radwan, B., Dvorak, D., Fenton, A.A., 2016. Impaired cognitive discrimination and discoordination of coupled theta-gamma oscillations in Fmr1 knockout mice. *Neurobiol. Dis.* 88, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.01.003>.
- Ramirez, J.M., Garcia III, A.J., Anderson, T.M., Koschnitzky, J.E., Peng, Y.J., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2013. Central and peripheral factors contributing to obstructive sleep apneas. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189 (2), 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.004>.
- Roberts, R.O., Christianson, T.J., Kremers, W.K., Mielke, M.M., Machulda, M.M., Vassilaki, M., Alhurani, R.E., Geda, Y.E., Knopman, D.S., Petersen, R.C., 2016. Association between olfactory dysfunction and amnesic mild cognitive impairment

- and Alzheimer disease dementia. *JAMA Neurol.* 73 (1), 93–101. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.2952>.
- Rojas-Libano, D., Kay, L.M., 2008. Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn. Neurodyn.* 2 (3), 179–194. <https://doi.org/10.1007/s11571-008-9053-1>.
- Rojas-Libano, D., Frederick, D.E., Egaña, J.L., Kay, L.M., 2014. The olfactory bulb theta rhythm follows all frequencies of diaphragmatic respiration in the freely behaving rat. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 214. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00214>.
- Rolls, E.T., 2005. Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol. Behav.* 85 (1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.03.002>.
- Salihoğlu, M., Kendirli, M.T., Altundağ, A., Tekeli, H., Sağlam, M., Cayönü, M., Şenol, M. G., Özdağ, F., 2014. The effect of obstructive sleep apnea on olfactory functions. *Laryngoscope* 124 (9), 2190–2194. <https://doi.org/10.1002/lary.24565>.
- Salimi, M., Ghazvineh, S., Zare, M., Parsazadegan, T., Dehdar, K., Nazari, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Jamaati, H., Raoufy, M.R., 2019. Distraction of olfactory bulb-medial prefrontal cortex circuit may induce anxiety-like behavior in allergic rhinitis. *PLoS one* 14 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221978> e0221978.
- Sanchez-Andrade, G., Kendrick, K.M., 2009. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav. Brain Res.* 200 (2), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.021>.
- Saraiva, L.R., Kondoh, K., Ye, X., Yoon, K.H., Hernandez, M., Buck, L.B., 2016. Combinatorial effects of odorants on mouse behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (23), E3300–E3306. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605973113>.
- Slotnick, B., Restrepo, D., 2005. Olfactometry with mice. *Curr. Protocols Neurosci.* 33 (1), 8–20. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0820s33>.
- Smith, D.R., Burruss, D.R., Johnson, A.W., 2009. An assessment of olfaction and responses to novelty in three strains of mice. *Behav. Brain Res.* 201 (1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.024>.
- Takahashi, L.K., Nakashima, B.R., Hong, H., Watanabe, K., 2005. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (8), 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.008>.
- Villasana-Salazar, B., Hernández-Soto, R., Guerrero-Gómez, M.E., Ordaz, B., Manrique-Maldonado, G., Salgado-Puga, K., Peña-Ortega, F., 2020. Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability in vitro. *Epilepsy Res.* 106375. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106375>.
- Wesson, D.W., Levy, E., Nixon, R.A., Wilson, D.A., 2010. Olfactory dysfunction correlates with amyloid- β burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J. Neurosci.* 30 (2), 505–514. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4622-09.2010>.
- Wilson, D.A., 1998. Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. *J. Neurophysiol.* 79 (3), 1425–1440. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.3.1425>.
- Wu, J., Liu, P., Chen, F., Ge, L., Lu, Y., Li, A., 2020. Excitability of neural activity is enhanced, but neural discrimination of odors is slightly decreased, in the olfactory bulb of fasted mice. *Genes* 11 (4), 433. <https://doi.org/10.3390/genes11040433>.
- Xiromeritis, A.G., Hatziefthimiou, A.A., Hadjigeorgiou, G.M., Gourgouliaris, K.I., Anagnostopoulou, D.N., Angelopoulos, N.V., 2011. Quantitative spectral analysis of vigilance EEG in patients with obstructive sleep apnoea syndrome: EEG mapping in OSAS patients. *Sleep Breath.* 15 (1), 121–128. <https://doi.org/10.1007/s11325-010-0335-6>.
- Yuan, L., Wu, J., Liu, J., Li, G., Liang, D., 2015. Intermittent hypoxia-induced parvalbumin-immunoreactive interneurons loss and neurobehavioral impairment is mediated by NADPH-oxidase-2. *Neurochem. Res.* 40 (6), 1232–1242. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1586-1>.
- Zhang, J., Hao, C., Jiang, J., Feng, Y., Chen, X., Zheng, Y., Liu, J., Zhang, Z., Long, C., Yang, L., Yang, L., 2018. The mechanisms underlying olfactory deficits in apolipoprotein E-deficient mice: focus on olfactory epithelium and olfactory bulb. *Neurobiology of Aging* 62, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.036>.
- Zhao, Y., Wang, B., Gao, Y., Zhao, Y., Xiao, Z., Zhao, W., Chen, B., Wang, X., Dai, J., 2007. Olfactory ensheathing cell apoptosis induced by hypoxia and serum deprivation. *Neuroscience letters* 421 (3), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.028>.
- Zhou, Y., Fang, F.H., Pan, P., Liu, Z.R., Ji, Y.H., 2017. Visual deprivation induce cross-modal enhancement of olfactory perception. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486 (3), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.140>.



Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability *in vitro*

Benjamín Villasana-Salazar, Rebeca Hernández-Soto, María Estefanía Guerrero-Gómez, Benito Ordaz, Guadalupe Manrique-Maldonado¹, Karla Salgado-Puga², Fernando Peña-Ortega*

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, QRO 76230, México

ARTICLE INFO

Keywords:

4-Aminopyridine
Chronic intermittent hypoxia
Hippocampal network activity
Epileptiform activity
Reoxygenation

ABSTRACT

Chronic intermittent hypoxia (CIH) is the most distinct feature of obstructive sleep apnea (OSA), a common breathing and sleep disorder that leads to several neuropathological consequences, including alterations in the hippocampal network and in seizure susceptibility. However, it is currently unknown whether these alterations are permanent or remit upon normal oxygenation. Here, we investigated the effects of CIH on hippocampal spontaneous network activity and hyperexcitability *in vitro* and explored whether these alterations endure or fade after normal oxygenation. Results showed that applying CIH for 21 days to adult rats increases gamma-band hippocampal network activity and aggravates 4-Aminopyridine-induced epileptiform activity *in vitro*. Interestingly, these CIH-induced alterations remit after 30 days of normal oxygenation. Our findings indicate that hippocampal network alterations and increased seizure susceptibility induced by CIH are not permanent and can be spontaneously reverted, suggesting that therapeutic interventions against OSA in patients with epilepsy, such as surgery or continuous positive airway pressure (CPAP), could be favorable for seizure control.

1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a chronic multifactorial disorder characterized by recurrent brief episodes of complete or partial collapse of the upper airway during sleep (Xie & Yung, 2012; Sforza & Roche, 2016). Chronic intermittent hypoxia (CIH), the principal consequence of OSA (Chiang, 2006; Xie & Yung, 2012; Rosenzweig et al., 2014; Sforza & Roche, 2016), leads to several neuropathological consequences, including cognitive impairment and structural and functional hippocampal network alterations (Chiang, 2006; Manni & Terzaghi, 2010; Xie & Yung, 2012; Rosenzweig et al., 2014; Cha et al., 2017; Peña-Ortega, 2016). OSA is commonly present in patients with drug-resistant epilepsy and aggravates the clinical course of this disorder, resulting in poor seizure control and a high risk of sudden unexpected death in epilepsy (Malow et al., 2000; Chihorek et al., 2007; Manni & Terzaghi, 2010; Nobili et al., 2011; Andersen et al., 2012; Segal et al., 2012).

CIH can be experimentally induced by exposing animals to recurrent brief episodes of moderate hypoxia (3–8% inspired O₂), alternating with brief episodes of normoxia several hours a day for several days (Veasey et al., 2004; Del Rio et al., 2014; Navarrete-Opazo & Mitchell, 2014; Moraes & Machado, 2015; Sforza & Roche, 2016; Morgan et al., 2016). Experimentally induced CIH leads to diverse neuropathological features resembling OSA (Del Rio et al., 2014; Moraes & Machado, 2015; Sforza & Roche, 2016; Morgan et al., 2016), including cognitive impairment and hippocampal network activity alterations (Gozal et al., 2001; Wais et al., 2009; Cha et al., 2017; Khuu et al., 2019). In addition, it has been shown that hypoxia results in long-lasting neuropathological effects in neonatal animals (Mikati et al., 2005; Kanaan et al., 2005; Dylag et al., 2017), including augmented seizure susceptibility and epileptogenesis (Jensen et al., 1991, 1992; Björkman et al., 2010; Xie et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodriguez-Alvarez et al., 2015). Moreover, Wais et al. (2009) showed that brief hypoxic episodes in adult rats induce seizures and augment hippocampal epileptiform activity *in vitro*.

Abbreviations: 4AP, 4-Aminopyridine; CIH, Chronic intermittent hypoxia; LFP, Local field potential; OSA, Obstructive sleep apnea; CPAP, continuous positive airway pressure; ReOx, Reoxygenation

* Corresponding author.

E-mail address: jfpena@unam.mx (F. Peña-Ortega).

¹ Present address: Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, United States.

² Present address: Department of Psychology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, United States.

<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2020.106375>

Received 2 December 2019; Received in revised form 21 April 2020; Accepted 28 May 2020

Available online 31 May 2020

0920-1211/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

However, the persistency, or reversibility, of the hippocampal network activity alterations and the increased seizure susceptibility induced by CIH remain unknown (Xie & Yung, 2012). Here, we investigated the effects of CIH on hippocampal spontaneous network activity and 4-Aminopyridine (4AP)-induced hyperexcitability *in vitro* and explored whether these alterations are permanent or remit after normal oxygenation. Results showed that experimentally induced CIH for 21 days alters hippocampal network activity in the gamma band and aggravates 4AP-induced epileptiform activity in adult rat hippocampal slices. In addition, our results demonstrate that CIH-induced hippocampal network alterations and pro-epileptiform effects are spontaneously reversed after normal oxygenation (reoxygenation, ReOx).

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Twenty-two male Wistar rats (6-8 weeks old, 150-200 g) were obtained from the animal facility at the Institute of Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM) and housed in collective cages (4 animals/cage) at the Behavioral Analysis Unit (BAU; INB-UNAM) under standard *vivarium* conditions (22-23 °C, 12-h light/dark cycle), with food and water *ad libitum*. All the experiments were conducted in accordance with the Official Mexican Standard published by México's Ministry of Agriculture (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). In addition, all experiments were approved by the Bioethics Committee of the INB-UNAM. Only the minimal and necessary number of animals were used in this study.

2.2. Chronic intermittent hypoxia

CIH was induced as previously reported (Moraes & Machado, 2015), but with slight modifications (Fig. 1). Animals in collective cages (4 animals/cage) were introduced daily into Plexiglas chambers (76 cm x 51 cm x 51 cm) equipped with gas injectors and O₂, CO₂, humidity and temperature sensors (BioSpherix, NY, USA) (Fig. 1A). There, animals were subjected to intermittent 5-min of N₂ injection to induce hypoxic episodes of 40-50 seconds (5-7% inspired O₂) (Fig. 1B). After each hypoxia episode, O₂ was injected for 5-min to return to normoxia (21-22% inspired O₂) (Moraes & Machado, 2015) (Fig. 1B). Gas injectors were controlled with an OxyCycler system (A420C, BioSpherix). This CIH protocol was conducted daily for 8 hours (from 10:00 h to 18:00 h) during the light phase of the cycle and lasted 21 days. This CIH period induces major pathological changes at different levels and locations (Del Rio et al., 2014; Morgan et al., 2016), which cannot be achieved by shorter CIH periods (Del Rio et al., 2014; Morgan et al., 2016), and which include changes in neuronal excitability and responsiveness to

challenging conditions (Veasey et al., 2004; Del Rio et al., 2014; Morgan et al., 2016). To investigate the reversibility of the CIH effects, independent groups of animals were subjected to CIH for 21 days (Fig. 1), followed by normoxia for 30 days (ReOx), while animals breathed room air (21-22% inspired O₂) at the BAU-INB-UNAM. Each CIH animal group was matched with a littermate independent control group (CTL). CTL animals in collective cages (4 animals/cage) were simultaneously introduced into the same Plexiglas chambers but breathed normoxic air (21-22% O₂). The animals' weight and survival were constantly monitored during the CIH protocol.

2.3. Preparation of hippocampal slices

Hippocampal slices were obtained as previously described (Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Briefly, animals were euthanized with an injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg, ip; PiSa, México) and perfused transcardially with a cold protective sucrose solution (composition (in mM): 238 sucrose, 3 KCl, 2.5 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 D-glucose, pH 7.4), bubbled with carbogen (95% O₂/5% CO₂). The brain was subsequently removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF; composition (in mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 D-glucose, pH 7.4) and bubbled with carbogen. Both hemispheres were glued and mounted onto an agar block with a 30° angle inclination. Sagittal slices (400 μm thick) containing the ventral hippocampus and the entorhinal cortex were obtained using a vibratome (Microm HM 650 V, Thermo Scientific, IL, USA). These slices preserve all the connections of the trisynaptic pathway and thus the output from hippocampus to the entorhinal cortex; allowing sustained reverberatory epileptiform activity to be efficiently induced and recorded (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Panuccio et al. 2010). Slices were left to recover at room temperature for at least 60 min before any further experimental manipulation.

2.4. Electrophysiological recordings and 4AP-induced epileptiform activity

Slices were transferred to a submerged recording chamber that was continuously perfused at 15-17 ml/min with aCSF bubbled with carbogen and maintained at 30-32 °C. Local field potential (LFP) recordings were obtained using borosilicate electrodes (< 1MΩ) filled with aCSF and positioned on the pyramidal layer of the hippocampal CA1 region (Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019), which render LFPs in the order of μV (Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019), in contrast to the LFPs recorded in the order of mV with electrodes with resistance higher than 2MΩ (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Panuccio et al., 2010). Basal hippocampal LFP was recorded for 30 min before 4AP (100 μM) was added to the bath (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and its effects were continuously recorded for 1 h. 4AP is a K⁺ channel blocker that

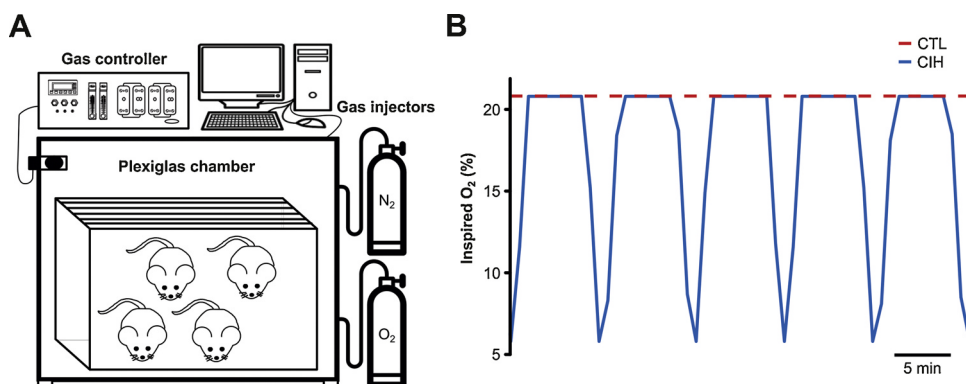


Fig. 1. Chronic intermittent hypoxia (CIH) protocol. A. Scheme of the set up required to apply CIH into a Plexiglas chamber. The chamber for normoxic conditions was not included. The animals were introduced to one of those chambers, where either intermittent hypoxia or normoxia was present for 8 hrs/day for 21 days. B. Representative traces of inspired O₂ levels during a typical application of the chronic intermittent hypoxia (CIH, blue trace) or normoxia (CTL, red-dotted trace) protocols. Note that intermittent hypoxia consisted of intermittent 5-min of N₂ injection to induce hypoxic episodes of 40-50 seconds (5-7% inspired O₂). After each hypoxic episode, O₂ was injected for 5-min to return to normoxia (21-22% inspired O₂).

produces persistent epileptiform activity in hippocampal slices (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Jensen et al., 1998; Avoli et al., 2002; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Panuccio et al., 2010; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Finally, lidocaine (1 mM) was added to the bath to test the slice's viability and the neuronal nature of the recorded LFP (Peña & Alavez-Pérez, 2006, Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Electrophysiological recordings were amplified, filtered (including a notch filter around 60 Hz; Grass Instruments Co., MA, USA) and digitized at 2 kHz through a TL-2 interface (Axon Instruments Inc., CA, USA).

2.5. Data analysis and statistics

Recordings were analyzed using Clampfit (v.10.7, Molecular Devices, CA, USA). The individual responsible for this analysis was blinded to the experimental group to which each and all of the recordings belonged to. A power spectrum analysis was performed on three randomly selected periods (20 s each) by means of the fast Fourier transform (FFT) algorithm (4096 frequency points and 0.224 Hz spectral resolution, Hamming window with 50% overlap). Relative power values from basal hippocampal LFP were calculated for each frequency as the percent of their own power from the total power in the 1-115 Hz broadband and were expressed as % of power (Magdaleno-Madrigal et al., 2019; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Then, the relative power spectrum was segmented in the following frequency bands: delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) and gamma (30-115 Hz). To evaluate the change in power during 4AP-induced epileptiform activity, the absolute power values were averaged for the 1-115 Hz frequency band before (defined as "basal" -pre 4AP-) and after 4AP administration, for each experiment. Analyses excluded the alternating current-related noise frequency band (55-65 Hz), due to the use of a notch filter. The mean power of each basal recording was set as 100%, and the activity in the presence of 4AP was calculated as % of basal for each experiment. Representative time-frequency spectrograms were obtained with a customized routine in MATLAB (R2015a, Mathworks, MA, USA) based on the *spectrogram.m* function (Pardo-Peña et al., 2018; Magdaleno-Madrigal et al., 2019). In the graphic representations, a hiatus around 60 Hz both in the spectrograms and the power spectra was included due to the use of a 60 Hz notch filter.

The collected data exhibited a non-normal distribution, which was evaluated with the Kolmogorov-Smirnov normality test. Thus, non-parametric statistical comparisons were carried out with the Kruskal-Wallis test followed by the two-stage step-up method of Benjamini, Krieger and Yekutieli test, to correct for multiple comparisons. Fisher's exact test and Mann-Whitney test were used to compare proportion data and body weight changes, respectively. Spearman's correlation was used to correlate relative power in the gamma band of the basal hippocampal network activity and the 4AP-induced epileptiform activity normalized power. A non-linear log-log fitting function was used for pairwise graphic correlations. Prism software (v.8.0.2, GraphPad, CA, USA) was used for statistical analysis. Significance threshold was set at $p < 0.05$. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Weight loss and mortality during the chronic intermittent hypoxia protocol

Despite starting at the same body weight (CTL = 155.6 ± 3.7 g, CIH = 154.2 ± 5.2 g, MW = 204.5, df = 20, $p > 0.1$), animals that underwent the 21 days CIH protocol gained slightly less body weight (CIH = 258.0 ± 3.0 g; 167.3% of day one) than CTL animals (273.9 ± 4.1 g; 176.0 % of day one, MW = 96, df = 20, $p < 0.01$, Table 1). CIH-induced weight loss has also been observed in adult mice exposed to CIH (Siqués et al., 2006; Jun et al., 2010) and neonatal mice exposed to

Table 1
Effects of chronic intermittent hypoxia (CIH) on body weight and mortality rate.

	CTL	CIH	Statistics
Initial body weight	155.6 ± 1.7 g	154.2 ± 5.2 g	$p = 0.24$ (MW = 204.5, df = 20)
Final body weight	273.9 ± 4.1 g	258 ± 3.0 g	$p < 0.001$ (MW = 96, df = 20)
Mortality rate	0 % (0/8 animals)	16 % (2/14 animals)	$p < 0.001$

brief hypoxia (Rodríguez-Alvarez et al., 2015), which has been associated with a decreased food intake (Siqués et al., 2006; Jun et al., 2010). In addition, 16% of animals that underwent the CIH protocol died of unknown causes during the intermittent hypoxia periods (2/14 animals), whereas none of the CTL animals died (0/8 animals, $p < 0.001$, Table 1). This mortality rate is similar to the one reported by other groups in immature and juvenile rats exposed to brief hypoxia (Moshé & Albala, 1985; Jensen et al., 1992; Owens et al., 1997; Rodríguez-Alvarez et al., 2015; Morand et al., 2018), or adult rats exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia (Siqués et al., 2006). Despite that developmental differences in sensitivity to hypoxia may influence the phenomenon, this mortality may be related to the induction of seizures (Wais et al., 2009; Rodríguez-Alvarez et al., 2015), weight loss or increase in the hematocrit (Siqués et al., 2006) and/or ventricular arrhythmias and sudden cardiac death (Morand et al., 2018). However, we did not specifically look or measured these types of changes.

3.2. Chronic intermittent hypoxia alters hippocampal network activity in the gamma frequency band and aggravates 4AP-induced epileptiform activity

After 21 days of CIH or normoxic protocols, animals were euthanized, and their hippocampal network activity was recorded *in vitro* (Fig. 2A). Power spectrum analysis of basal hippocampal network activity showed no difference in the mean absolute power, in the 1-115 Hz frequency broadband, between groups (CTL = 32.2 ± 10.0 nV²/Hz, n = 14 slices from 5 animals; CIH = 22.6 ± 8.0 nV²/Hz, n = 18 slices from 8 animals, KW = 123.4, df = 9, $p > 0.1$, Fig. 2B), demonstrating that CIH seems not to produce a generalized change in hippocampal network activity. However, basal relative power spectra exhibit a significant increase at the gamma frequency band (30-115 Hz) in CIH-treated animals (16.8 ± 3.6 % of power) compared to the CTL group (5.7 ± 0.4 % of power, KW = 60.5, df = 7, $p < 0.05$, Fig. 2C and D). There were no statistical differences in delta (1-4 Hz; $p > 0.1$), theta (4-10 Hz; $p > 0.1$) and beta (10-30 Hz; $p > 0.1$) frequency bands relative power between groups (Fig. 2C).

Application of 4AP to the perfusion bath induces sustained epileptiform activity *in vitro* (Perreault & Avoli, 1991; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019), which is characterized, in our experimental conditions, by interictal-like activity during the first hour (Peña & Alavez-Pérez, 2006). In our experimental conditions, longer 4AP presence is required to induce ictal-like activity in control slices (Peña & Alavez-Pérez, 2006). In slices recorded in an interface chamber this latency for 4AP-induced ictal-like activity is shorter (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Panuccio et al., 2010). Thus, in hippocampal slices obtained from the CTL group, recorded in a submerged chamber, the 4AP-induced epileptiform activity was characterized, during the evaluated first hour, by recurrent high-amplitude paroxysmal spikes (Fig. 3A), also called interictal-like activity (Perreault & Avoli, 1991; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). In contrast, 4AP-induced epileptiform activity, in a third of the hippocampal slices (6/18 slices), obtained from 63% of CIH animals (5/8 animals), showed an exacerbated epileptiform activity pattern defined in the literature as ictal-like activity (Barbarosie &

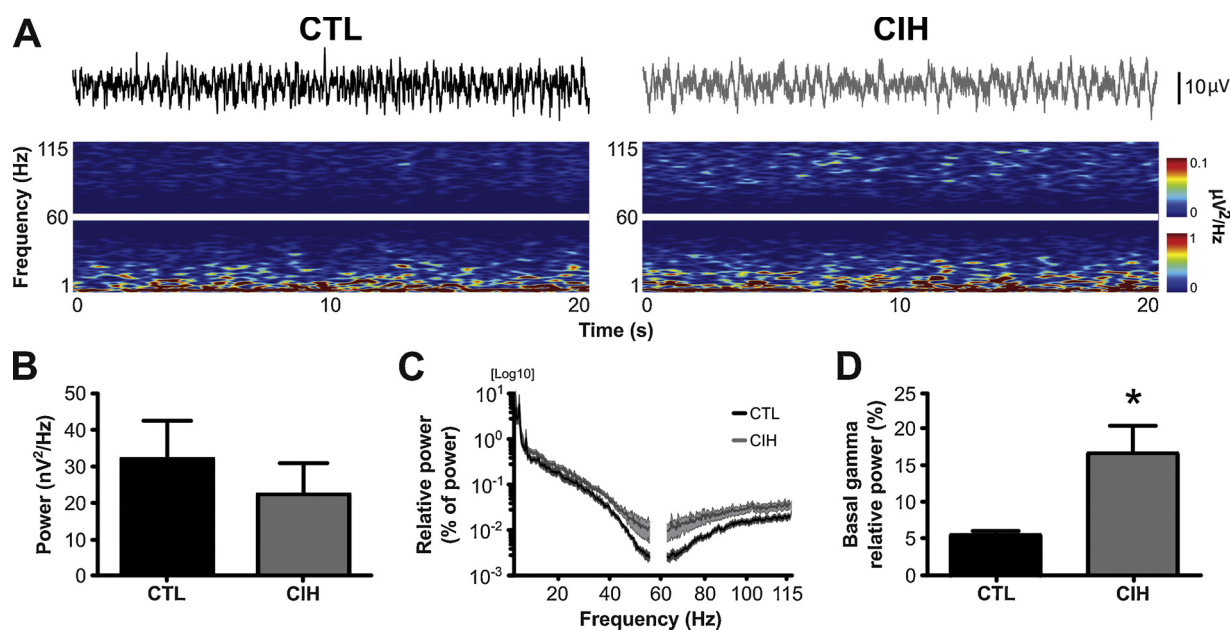


Fig. 2. Chronic intermittent hypoxia (CIH) alters basal hippocampal network activity in the gamma frequency band. A. Representative traces (top) and spectrograms (bottom) of basal hippocampal network activity in slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. B. Quantification of the mean absolute power (1-115 Hz) of the basal hippocampal network activity of CTL and CIH groups. C. Mean relative power spectra (as % of power) of CTL and CIH groups. The thicker and darker line represents the mean, while the clearer shadow, flanked by thinner lines, represents the SEM. Note that the relative gamma is higher in the CIH group. D. Quantification of basal gamma relative power (30-115 Hz) of CTL and CIH groups. Note that CIH increases the relative power at the gamma frequency band. Data are presented as mean \pm SEM. Spectrograms and power spectra show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings. * denotes a significant difference against CTL, $p < 0.05$.

Avoli, 1997; Jensen et al., 1998; Avoli et al., 2002; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Panuccio et al., 2010), which is characterized by recurrent bursts of high-frequency and high-amplitude paroxysmal spikes followed by a postictal depression (Fig. 3A). Thus, 33.3 % of the slices obtained from CIH animals presented ictal-like activity, whereas none of the slices obtained from CTL animals exhibited this epileptiform pattern (0/14 slices from 5 animals, $p < 0.05$, Fig. 3B). Analysis of the power spectrum during 4AP-induced epileptiform activity (normalized to basal activity; in each experiment; i.e. pre 4AP application; set as 100%), in the 1-115 Hz frequency broadband, showed that the increase in power during epileptiform activity is dramatically higher in slices obtained from CIH animals (to $99.4 \pm 64.5 \times 10^3$ % of basal; $n = 18$) compared to slices obtained from the CTL group (to $2.2 \pm 0.6 \times 10^3$ % of basal; $n = 14$, KW = 58.7, df = 9, $p < 0.05$, Fig. 3C), when the CIH group included all the tested slices, mixing the slices that generated interictal-like activity with those that generated ictal-like activity in the presence of 4AP ($n = 18$ slices, Fig. 3C). The statistical difference between groups remained significant when compared the normalized power of the CTL slices with the normalized power only of the slices obtained from CIH animals that exhibited either interictal-like activity ($138.8 \pm 89.9 \times 10^3$ % of basal, $n = 12$ slices, KW = 54.3, df = 9, $p < 0.01$) or ictal-like activity ($34.3 \pm 29.4 \times 10^3$ % of basal, $n = 6$ slices, KW = 33, df = 9, $p < 0.05$). Finally, we found no difference in the normalized power of the slices obtained from CIH animals that exhibited either interictal-like activity ($138.8 \pm 89.9 \times 10^3$ % of basal, $n = 12$ slices) or ictal-like activity ($34.3 \pm 29.4 \times 10^3$ % of basal, $n = 6$ slices, KW = 34.5, df = 9, $p > 0.1$).

In order to evaluate a possible relation between the gamma band relative power during basal hippocampal network activity and the 4AP-induced epileptiform activity power (normalized to basal activity -pre 4AP), in the 1-115 Hz frequency band, a correlation analysis was performed. Gamma band relative power during basal hippocampal network activity slightly correlated with the 4AP-induced epileptiform activity power change in slices obtained from the CTL and CIH groups ($r = 0.42$, $p < 0.01$, Fig. 3D).

3.3. Reoxygenation reverses the changes in hippocampal network activity induced by chronic intermittent hypoxia

To investigate the preservation of the CIH-induced alterations in hippocampal network activity, independent groups of animals were exposed to the same CIH or normoxic protocols but followed by 30 days of ReOx (breathing room air). Then, hippocampal network activity was recorded in slices obtained from CTL + ReOx and CIH + ReOx animals (Fig. 4A). Basal hippocampal network activity showed no difference in the mean absolute power between groups (CTL + ReOx = 41.9 ± 19.4 nV²/Hz, $n = 11$ slices from 3 animals; CIH + ReOx = 31.2 ± 7.7 nV²/Hz, $n = 13$ slices from 4 animals, KW = 92.96, df = 9, $p > 0.1$, Fig. 4B). Also, relative power spectrum of their basal hippocampal network activity showed no differences between groups in any of the analyzed frequency bands ($p > 0.1$, Fig. 3C), including the gamma band (CTL + ReOx = 5.9 ± 1.4 % of power, CIH + ReOx = 5.7 ± 1.0 % of power, KW = 63.8, df = 7, $p > 0.1$, Fig. 4D).

Bath application of 4AP induced interictal-like epileptiform activity in all the slices obtained from CTL + ReOx and CIH + ReOx animals (CTL + ReOx = 11/11 slices, CIH + ReOx = 13/13 slices, $p > 0.1$, Fig. 5A and B). No ictal-like activity was observed in any of these slices. Power spectrum analysis during 4AP-induced epileptiform activity showed no difference between groups in the 1-115 Hz frequency broadband (CTL + ReOx = $15.0 \pm 7.6 \times 10^3$ % of basal, CIH + ReOx = $23.1 \pm 10.5 \times 10^3$ % of basal, KW = 14.3, df = 9, $p > 0.1$, Fig. 5C). Finally, correlation analysis showed no significant association between gamma band relative power during basal hippocampal network activity and the 4AP-induced epileptiform activity normalized power (% of basal activity; -pre 4AP-), while including CTL + ReOx and CIH + ReOx groups ($r = -0.02$, $p > 0.1$, Fig. 5D).

4. Discussion

OSA is commonly present in patients with drug-resistant epilepsy (Höllinger et al., 2006; Li et al., 2012), suggesting that long-term

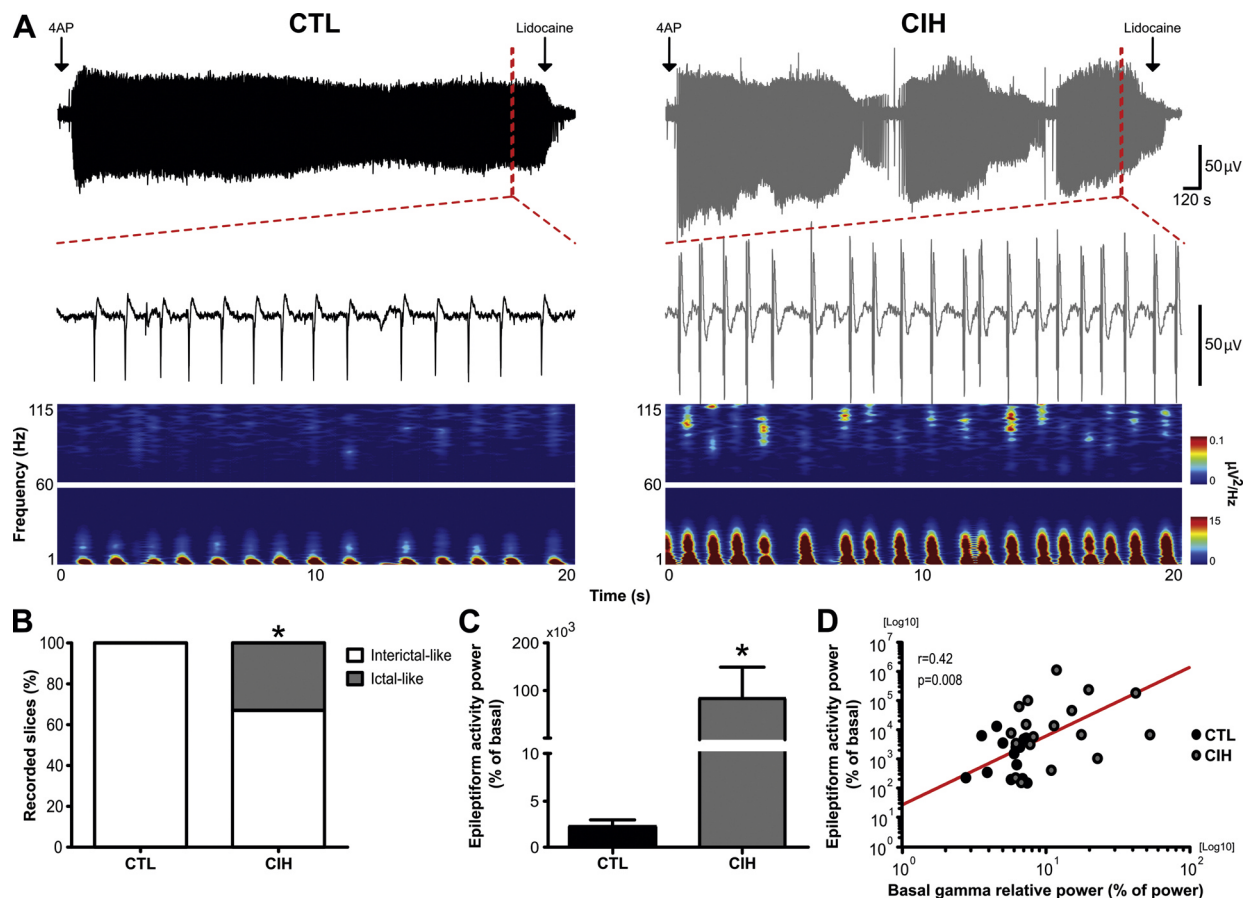


Fig. 3. 4-Aminopyridine (4AP)-induced hippocampal epileptiform activity is exacerbated by chronic intermittent hypoxia (CIH). **A.** Long-lasting representative traces (top) of the epileptiform activity induced by 4AP in hippocampal slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. The arrows indicate the beginning of bath application of 4AP and lidocaine. Shorter samples of epileptiform activity (middle), delimited by the red dotted lines, and their spectrograms (bottom) are also shown. Note that slices obtained from CIH-treated animals exhibit ictal-like epileptiform activity, in contrast to slices obtained from CTL animals that only exhibit interictal-like epileptiform activity. **B.** Quantification of the proportion of recorded slices exhibiting either interictal-like or ictal-like epileptiform activity induced by 4AP in CTL and CIH groups. Note that only slices obtained from CIH animals show ictal-like epileptiform activity pattern. **C.** Quantification of the 4AP-induced epileptiform activity mean power (as % of basal) in the 1-115 Hz frequency band in CTL and CIH groups, including both interictal-like and ictal-like epileptiform activity. **D.** Correlation of basal gamma relative power (as % of power) and 4AP-induced epileptiform activity power (as % of basal) from CTL (black circles) and CIH (gray circles) groups. A non-linear log-log function was fitted to the data (red line). Note that basal hippocampal gamma activity shows a slight positive correlation with the magnitude of the epileptiform activity. Data are presented as mean \pm SEM. Spectrograms show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings. *denotes a significant difference against CTL, $p < 0.05$.

intermittent hypoxic episodes could be involved in epileptogenesis (Chihorek et al., 2007). Moreover, acute and repeated episodes of moderate hypoxia induce a long-term enhancement of brain excitability and increase seizure susceptibility (Wais et al., 2009; Björkman et al., 2010; Xie et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodríguez-Alvarez et al., 2015). Here, we show that CIH, the most distinct feature of OSA (Chiang, 2006; Xie & Yung, 2012; Rosenzweig et al., 2014; Sforza & Roche, 2016), increases hippocampal network activity, specifically in the gamma frequency band, while enhancing epileptiform activity in adult rat hippocampal slices. Hippocampal gamma oscillations (30-120 Hz) have been involved in the coupling between distant and neighboring brain regions (Montgomery and Buzsáki, 2007; Buzsáki & Schomburg, 2015) and seem to rely on local inhibitory interneuron interactions (Hughes, 2008; Merchant et al., 2012; Keeley et al., 2017). Interestingly, hippocampal inhibitory neural networks seem to be altered after repeated hypoxic episodes in adult mice (Wais et al., 2009). In contrast, brief neonatal hypoxia exposure does not produce any long-term alteration in parvalbumin-positive (PV⁺) hippocampal inhibitory interneurons (Rodríguez-Alvarez et al., 2015; Fernando & Mody, 2015), which is the interneuron subpopulation mostly involved in the generation of gamma oscillations (Merchant et al., 2012). Our results suggest that hippocampal inhibitory network activity could be altered

as a consequence of CIH, which correlated with an increased susceptibility to epileptiform activity.

Enhanced gamma band activity has been observed in epileptic patients and epilepsy animal models in seizure-associated brain areas, mainly during pre-ictal periods (Hughes, 2008; de Curtis and Gnatkovsky, 2009). Interestingly, the increased gamma activity is related to the drug responsiveness in animal models of epilepsy (Maheshwari et al., 2016). Increased high-frequency hippocampal activity may reflect an ongoing epileptogenic process in animals subjected to CIH, similar to what has been observed in experimentally induced epilepsy (Jones et al., 2015).

The ictal-like epileptiform pattern observed here in hippocampal slices obtained from CIH-treated animals has also been observed in hippocampal slices obtained from adult animals previously exposed to brief hypoxia at P10 (Jensen et al., 1998) and may indicate an augmented excitability state of the hippocampal network during the epileptiform process. The ictal-like epileptiform pattern is very uncommon in hippocampal slices from healthy subjects (Jensen et al., 1998; Reyes-García et al., 2018), however, it is commonly observed in human hippocampal tissue resected from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy (Reyes-García et al., 2018). Moreover, the ictal-like epileptiform activity pattern has been associated with aberrant activity of

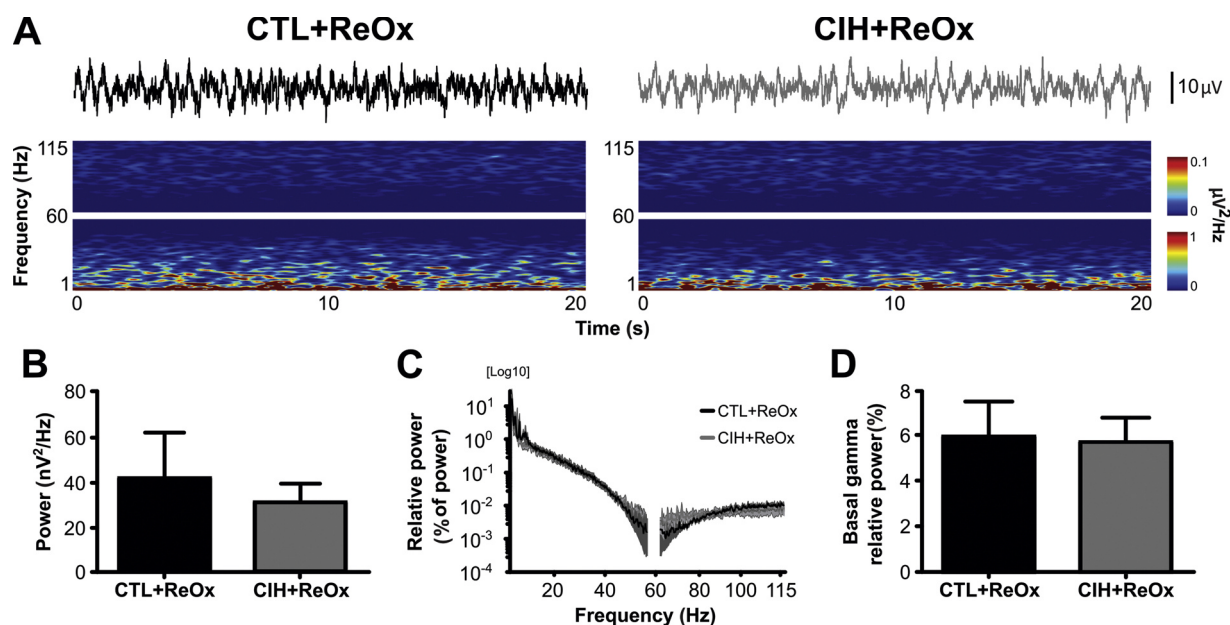


Fig. 4. Alterations of basal hippocampal network activity in the gamma frequency band induced by chronic intermittent hypoxia (CIH) are reverted after reoxygenation (ReOx). **A.** Representative traces (top) and spectrograms (bottom) of basal hippocampal activity in slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. In both cases, the treatments were followed by 30 days of reoxygenation (+ReOx). **B.** Quantification of the mean absolute power (1–115 Hz) of the basal hippocampal network activity of CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. **C.** Mean relative power spectra (as % of power) of CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. The thicker and darker line represents the mean, while the clearer shadow, flanked by thinner lines, represents the SEM. **D.** Quantification of basal gamma relative power (30–115 Hz) of CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. Note that ReOx reverted the change in gamma activity induced by CIH. Data are presented as mean \pm SEM. Spectrograms and power spectra show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings.

hippocampal inhibitory interneurons (Fujiwara-Tsukamoto et al., 2004; Sessolo et al., 2015). Further studies will address whether CIH alters hippocampal inhibitory networks and its impact on epileptogenesis.

Brief perinatal hypoxia has been a reliable epilepsy model characterized by spontaneous electrographic and behavioral seizures and decreased seizure threshold throughout adulthood (Jensen et al., 1991, 1992; 1998; Sanchez et al., 2001; Björkman et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodriguez-Alvarez et al., 2015), which resembles several aspects of seizure susceptibility and long-term consequences observed in pediatric patients with epilepsy (Murray et al., 2005; Kurinczuk et al., 2010). In addition, the presence of signs of hypoxic stress and of the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in animals exposed to pilocarpine-induced *status epilepticus* indicates that seizures promote hypoxic conditions, which could aggravate the course of the hyperexcitability (Gualtieri et al., 2013). Similar to our findings, Wais and colleagues (2009) reported that repeated brief hypoxic episodes in adult mice induce epileptiform activity and hippocampal network alterations.

Here we show that CIH induces hippocampal network alterations in the gamma frequency band and pro-epileptiform effects that can be reverted upon ReOx, which coincides with the observation that many of the CIH-induced neuropathological effects are also transient (Harik et al., 1996; Kanaan et al., 2005), including hypoxia-induced hypervascularity and polycythemia. However, this contrasts with other hypoxia-induced pathological changes, including decreased myelination and increased expression of brain capillary glucose transporter, which seem to be permanent (Harik et al., 1996; Kanaan et al., 2005). Future experiments will address the cellular and molecular mechanisms underlying the effects of CIH and ReOx on hippocampal excitability.

The finding of the reversibility of CIH-induced alterations in hippocampal excitability coincides with studies in epilepsy patients presenting OSA, which show that therapeutic interventions against OSA, such as surgery or CPAP, reduce electrographic epileptiform activity and seizures (Vaughn et al., 1996; Chihorek et al., 2007; Manni & Terzaghi, 2010; Vendrame et al., 2011; Segal et al., 2012). Thus, our

results support the notion that therapeutic interventions against OSA in epilepsy patients could improve seizure control.

5. Conclusions

CIH-induced hippocampal network alterations in the gamma frequency band and increased seizure susceptibility are transient and can be reverted after ReOx. These findings suggest that therapeutic interventions against OSA in epilepsy patients, such as surgery or CPAP, could largely contribute to seizure control.

Funding

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México (grant number IN202018) and by CONACyT (grant number A1-S-7540), México.

Declaration of Competing Interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

Benjamín Villasana-Salazar and Rebeca Hernández-Soto are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships (No. 587113 and 664903, respectively) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. María Estefanía Guerrero-Gómez received a Research Assistant fellowship (No. 15650) from Sistema Nacional de Investigadores, CONACyT, México. Authors thank Jessica González Norris and Anaid Antaramian for editorial comments. Dedicated to the health professionals fighting the COVID-19 pandemic.

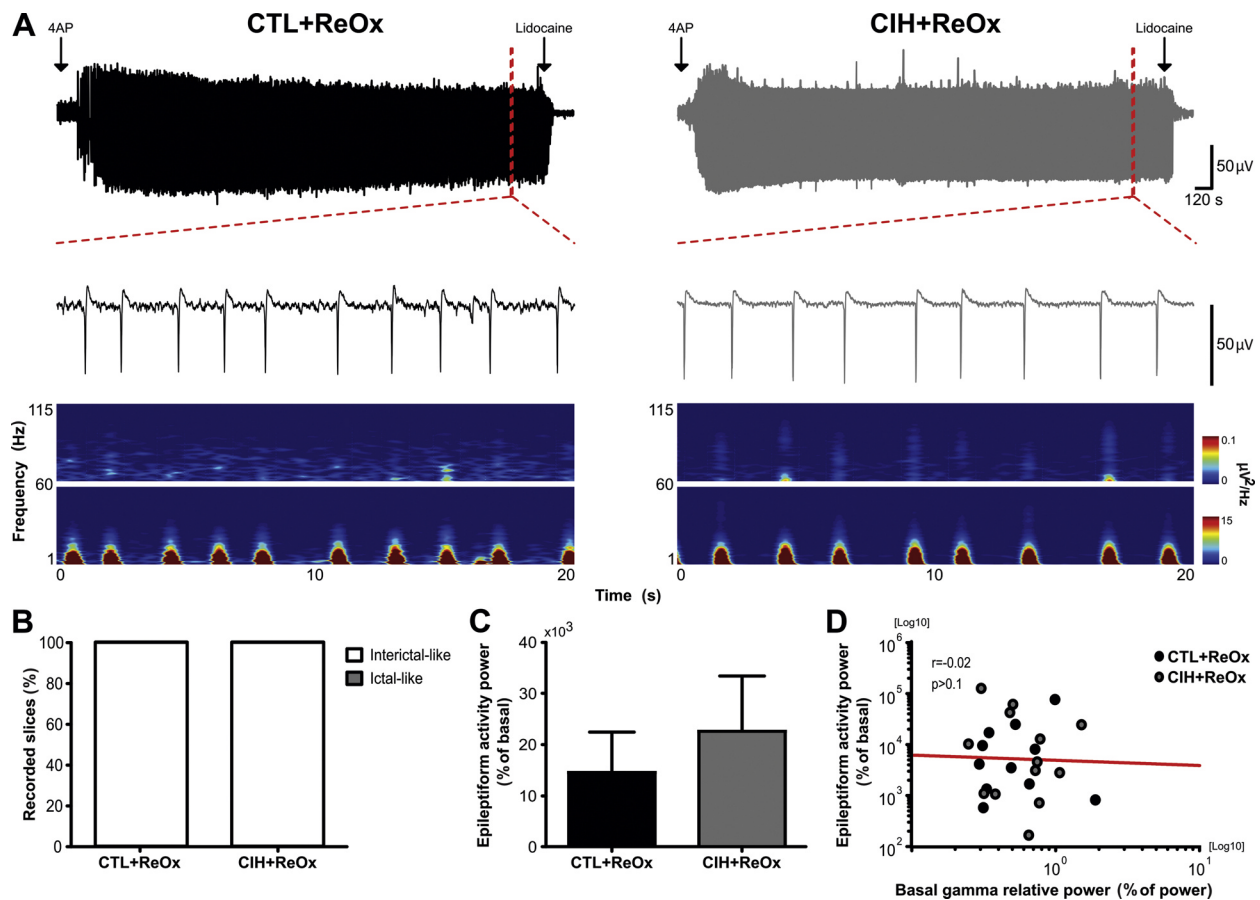


Fig. 5. Reoxygenation (ReOx) reverts the 4-Aminopyridine (4AP)-induced hippocampal epileptiform exacerbation induced by chronic intermittent hypoxia (CIH). A. Long-lasting representative traces (top) of the epileptiform activity induced by 4AP in hippocampal slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. In both cases, the treatments were followed by 30 days of reoxygenation (+ ReOx). The arrows indicate the beginning of both application of 4AP and lidocaine. Shorter samples of epileptiform activity (middle), delimited by the red dotted lines, and their spectrograms (bottom) are also shown. B. Quantification of the proportion of recorded slices exhibiting either interictal-like or ictal-like epileptiform activity induced by 4AP in CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. Note that the totality of slices obtained from CIH + ReOx animals exhibit interictal-like but none ictal-like epileptiform activity. C. 4AP-induced epileptiform activity mean power (as % of basal) in the 1-115 Hz frequency band in CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. D. Correlation of basal gamma relative power (as % of power) and 4AP-induced epileptiform activity power (as % of basal) from CTL + ReOx (black circles) and CIH + ReOx (gray circles) groups. A non-linear log-log function was fitted to the data (red line). Note the absence of a correlation between basal hippocampal gamma activity and the magnitude of the epileptiform activity. Data are presented as mean \pm SEM. Spectrograms show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings.

References

- Alcantara-Gonzalez, D., Villasana-Salazar, B., Peña-Ortega, F., 2019. Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus* 1–15. <https://doi.org/10.1002/hipo.23129>.
- Andersen, M.L., Tufik, S., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., de Albuquerque, M., Matos, G., Scorza, F.A., 2012. Lights out! It is time for bed. Warning: Obstructive sleep apnea increases risk of sudden death in people with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 23, 510–511. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.01.026>.
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., Tancredi, V., 2002. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog. Neurobiol.* 68 (3), 167–207. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00077-1](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00077-1).
- Barbarosie, M., Avoli, M., 1997. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains *in vitro* limbic seizures. *J. Neurosci.* 17 (23), 9308–9314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-23-09308.1997>.
- Björkman, S.T., Miller, S.M., Rose, S.E., Burke, C., Colditz, P.B., 2010. Seizures are associated with brain injury severity in a neonatal model of hypoxia-ischemia. *Neurosci.* 166 (1), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.067>.
- Buzsáki, G., Schomburg, E.W., 2015. What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? *Nat. Neurosci.* 18 (4), 484–489. <https://doi.org/10.1038/nn.3952>.
- Cha, J., Zea-Hernandez, J.A., Sin, S., Graw-Panzer, K., Shifteh, K., Isasi, C.R., Wagshul, M.E., Mora, E.E., Posner, J., Zimmerman, M.E., Arens, R., 2017. The effects of obstructive sleep apnea syndrome on the dentate gyrus and learning and memory in children. *J. Neurosci.* 37 (16), 4280–4288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3583-16.2017>.
- Chiang, A.A., 2006. Obstructive sleep apnea and chronic intermittent hypoxia: a Review. *Chin. J. Physiol.* 49 (5), 234–243.
- Chihorek, A.M., Abou-Khalil, B., Malow, B.A., 2007. Obstructive sleep apnea is associated with seizure occurrence in older adults with epilepsy. *Neurol.* 69 (9), 1823–1827. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000279334.78298.d5>.
- de Curtis, M., Gnatkovsky, V., 2009. Reevaluating the mechanisms of focal ictogenesis: The role of low-voltage fast activity. *Epilepsia* 50 (12), 2514–2525. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02249.x>.
- Del Rio, R., Moya, E.A., Iturriaga, R., 2014. Carotid body potentiation during chronic intermittent hypoxia: implication for hypertension. *Front Physiol.* 5, 434. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00434>.
- Dylag, A.M., Mayer, C.A., Raffay, T.M., Martin, R.J., Jafri, A., MacFarlane, P.M., 2017. Long-term effects of recurrent intermittent hypoxia and hyperoxia on respiratory system mechanics in neonatal mice. *Pediatr. Res.* 84 (1), 565–571. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.240>.
- Fernando, I., Mody, I., 2015. In vitro gamma oscillations following partial and complete ablation of δ subunit-containing GABAA receptors from parvalbumin interneurons. *Neuropharmacology* 88, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.010>.
- Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Kaneda, K., Takada, M., 2004. Synaptic interactions between pyramidal cells and interneurons subtypes during seizure-like activity in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 557 (3), 961–979. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059915>.
- Gozal, D., Daniel, J.M., Dohanich, G.P., 2001. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J. Neurosci.* 21 (7), 2442–2450. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02442.2001>.
- Gualtieri, F., Marinelli, C., Longo, D., Pugnaghi, M., Nichelli, P.F., Meletti, S., Biagini, G., 2013. Hypoxia markers are expressed in interneurons exposed to recurrent seizures. *Neuromol. Med.* 15, 133–146. <https://doi.org/10.1007/s12017-012-8203-0>.
- Harik, N., Harik, S.I., Kuo, N., Sakai, K., Przybylski, R.J., LaManna, J.C., 1996. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density. *Brain Res.* 737, 335–338. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00068-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00068-4).

- org/10.1016/0006-8993(96)00965-1.
- Höllinger, P., Khatami, R., Guggen, M., Hess, C.W., Bassetti, C., 2006. Epilepsy and obstructive sleep apnea. *Eur. Neurol.* 55 (2), 74–79. <https://doi.org/10.1159/000092306>.
- Hughes, J.R., 2008. Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: Their relationship with epilepsy and behavior. *Epilepsy Behav.* 13 (1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.01.011>.
- Jensen, F.E., Applegate, C.D., Holtzman, D., Belin, T.R., Burchfiel, J.L., 1991. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann. Neurol.* 29 (6), 629–937. <https://doi.org/10.1002/ana.410290610>.
- Jensen, F.E., Holmes, G.L., Lombroso, C.T., Blume, H.K., Firkusny, I.R., 1992. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia* 33 (6), 917–980. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01746.x>.
- Jensen, F.E., Wang, C., Stafstrom, C.E., Liu, Z., Geary, C., Stevens, M.C., 1998. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia in vivo. *J. Neurophysiol.* 79 (1), 73–81. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.73>.
- Jones, R.T., Barth, A.M., Ormiston, L.D., Mody, I., 2015. Evolution of temporal and spectral dynamics of pathologic high-frequency oscillations (pHFOs) during epileptogenesis. *Epilepsia* 56 (12), 1879–1889. <https://doi.org/10.1111/epi.13218>.
- Jun, J., Reinke, C., Bedja, D., Berkowitz, D., Bevans-Fonti, S., Li, K., Barouch, A.A., Gabrielson, K., Polotsky, V.Y., 2010. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 209 (2), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.017>.
- Kanaan, A., Farahani, R., Douglas, R.M., LaManna, J.C., Haddad, G.G., 2005. Effect of chronic continuous or intermittent hypoxia and reoxygenation on cerebral capillary density and myelination. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290 (4), 1105–1114. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2005>.
- Keeley, S., Fenton, A.A., Rinzel, J., 2017. Modeling fast and slow gamma oscillations with interneurons of different subtype. *J. Neurophysiol.* 117 (3), 950–965. <https://doi.org/10.1152/jn.00490.2016>.
- Khuu, M., Pagan, C.M., Nallamothu, T., Hevner, R.F., Hodge, R.D., Ramirez, J.M., Garcia, A.J., 2019. Intermittent hypoxia disrupts adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 39 (7), 1320–1331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-18.2018>.
- Kurinczuk, J.J., White-Jonung, M., Badawi, N., 2010. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum. Dev.* 86 (6), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>.
- Li, P., Ghadersohi, S., Jafari, B., Teter, B., Sazgar, M., 2012. Characteristics of refractory vs. medically controlled epilepsy patients with obstructive sleep apnea and their response to CPAP treatment. *Seizure* 21 (9), 717–721. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.07.016>.
- Magdaleno-Madriral, V.M., Contreras-Murillo, G., Valdés-Cruz, A., Martínez-Vargas, D., Martínez, A., Villasana-Salazar, B., Almazán-Alvarado, S., 2019. Effects of high- and low-frequency stimulation of the thalamic reticular nucleus on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Neuromodulation* 22 (4), 425–434. <https://doi.org/10.1111/ner.12926>.
- Maheshwari, A., Marks, R.L., Yu, K.M., Noebels, J.L., 2016. Shift in interictal relative gamma power as a novel biomarker for drug response in two mouse models of absence epilepsy. *Epilepsia* 57 (1), 79–88. <https://doi.org/10.1111/epi.13265>.
- Malow, B.A., Levy, K., Maturen, K., Bowes, R., 2000. Obstructive sleep apnea is common in medically refractory epilepsy patients. *Neurol.* 55 (7), 1002–1007. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.7.1002>.
- Manni, R., Terzaghi, M., 2010. Comorbidity between epilepsy and sleep disorders. *Epilepsy Res.* 90 (3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.05.006>.
- Merchant, H., de LaFuente, V., Peña-Ortega, F., Larriva-Sahd, J., 2012. Functional impact of interneuronal inhibition in the cerebral cortex of behaving animals. *Prog. Neurobiol.* 99 (2), 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.08.005>.
- Mikati, M.A., Zeinieh, M.P., Kurdi, R.M., Harb, S.A., El Hokayem, J.A., Daderian, R.H., Shamseddine, A., Obeid, M., Bitar, F.F., El Sabban, M., 2005. Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 157 (1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.03.007>.
- Montgomery, S.M., Buzsáki, G., 2007. Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (36), 14495–14500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701826104>.
- Moraes, D.J., Machado, B.H., 2015. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 593 (3), 619–634. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283085>.
- Morand, J., Arnaud, C., Pepin, J.L., Godin-Ribuot, D., 2018. Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Sci. Rep.* 8 (1), 2997. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21064-y>.
- Morgan, B.J., Bates, M.L., Rio, R.D., Wang, Z., Dopp, J.M., 2016. Oxidative estromerflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 234, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.09.001>.
- Moshé, S.L., Albala, B.J., 1985. Perinatal hypoxia and subsequent development of seizures. *Physiol. Behav.* 35 (5), 819–823. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90418-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90418-4).
- Murray, D.M., Ryan, C.A., Boylan, G.B., Fitzgerald, A.P., Connolly, S., 2005. Prediction of seizures in asphyxiated neonates: correlation with continuous video-electroencephalographic monitoring. *Pediatrics* 118 (1), 41–46. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1524>.
- Navarrete-Opazo, A., Mitchell, G.S., 2014. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307 (10), 1181–1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>.
- Nobili, L., Prosperpio, P., Rubboli, G., Montano, N., Didato, G., Tassinari, C.A., 2011. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) and sleep. *Sleep Med. Rev.* 15 (4), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2010.07.006>.
- Owens, J.R., Robbins, C.A., Wenzel, H.J., Schwartzkroin, P.A., 1997. Acute and chronic effects of hypoxia on the developing hippocampus. *Ann. Neurol.* 41 (2), 187–199. <https://doi.org/10.1002/ana.410410210>.
- Panuccio, G., D'Antuono, M., de Guzman, P., De Lannoy, L., Biagini, G., Avoli, M., 2010. In vitro icogenes and parahippocampal networks in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 39 (3), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.003>.
- Pardo-Peña, K., Lorea-Hernández, J.J., Camacho-Hernández, N.P., Ordaz, B., Villasana-Salazar, B., Morales-Villagrán, A., Peña-Ortega, F., 2018. Hydrogen peroxide extracellular concentration in the ventrolateral medulla and its increase in response to hypoxia in vitro: Possible role of microglia. *Brain Res.* 1692, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.032>.
- Peña, F., Alavez-Pérez, N., 2006. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia* 47 (1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00369.x>.
- Peña-Ortega, F., 2016. Neural Network Reconfigurations: Changes of the Respiratory Network by Hypoxia as an Example. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1015, 217–237. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_12.
- Perreault, P., Avoli, M., 1991. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65 (4), 771–785. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.4.771>.
- Rakhade, S.N., Fitzgerald, E.F., Klein, P.M., Zhou, C., Sun, H., Hagan, R.L., Jensen, F.E., 2012. Glutamate receptor 1 phosphorylation at serine 831 and 845 modulates seizure susceptibility and hippocampal hyperexcitability after early life seizures. *J. Neurosci.* 32 (49), 17800–17812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6121-11.2012>.
- Rakhade, S.N., Klein, P.M., Huynh, T., Hilario-Gomez, C., Kosaras, B., Rotenberg, A., Jensen, F.E., 2011. Development of later life spontaneous seizures in a rodent model of hypoxia-induced neonatal seizures. *Epilepsia* 52 (4), 753–765. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.02992.x>.
- Reyes-García, S.Z., Scorza, C.A., Araújo, N.S., Ortiz-Villatoro, N.N., Jardim, A.P., Centeno, R., Yacubian, E.M.T., Faber, J., Cavalheiro, E.A., 2018. Different patterns of epileptiform-like activity are generated in the sclerotic hippocampus from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Sci. Rep.* 8 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25378-9>.
- Rodríguez-Alvarez, N., Jimenez-Mateos, E.M., Dunleavy, M., Waddington, J.L., Boylan, G.B., Henshall, D.C., 2015. Effects of hypoxia-induced neonatal seizures on acute hippocampal injury and later-life seizure susceptibility and anxiety-related behavior in mice. *Neurobiol. Dis.* 83, 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.023>.
- Rosenzweig, I., Williams, S.C., Morrell, M.J., 2014. The impact of sleep and hypoxia on the brain: potential mechanisms for the effects of obstructive sleep apnea. *Current opinion in pulmonary medicine* 20 (6), 565–571. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000099>.
- Sanchez, R.M., Koh, S., Wang, C., Lamperti, E.D., Sharma, D., Corfas, G., Jensen, F.E., 2001. Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J. Neurosci.* 21 (20), 8154–8163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08154.2001>.
- Segal, E., Vendreame, M., Gregas, M., Lodenkemper, T., Kothare, S.V., 2012. Effect of treatment of obstructive sleep apnea on seizure outcomes in children with epilepsy. *Pediatr. Neurol.* 46 (6), 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.03.005>.
- Sessolo, M., Marcon, I., Bovetti, S., Losi, G., Cammarota, M., Ratto, G.M., Fellin, T., Carmignoto, G., 2015. Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. *J. Neurosci.* 35 (26), 9544–9557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015>.
- Sforza, E., Roche, F., 2016. Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach. *Hypoxia* 4, 99–108. <https://doi.org/10.2147/HP.S103091>.
- Siqués, P., Brito, J., León-Velarde, F., Barrios, L., Cruz, J.J., López, V., Herruzo, R., 2006. Time course of cardiovascular and hematological responses in rats exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia (4600 m). *High Alt. Med. Biol.* 7 (1), 72–80. <https://doi.org/10.1089/ham.2006.7.72>.
- Vaughn, B.V., D'Cruz, O.F., Beach, R., Messenheimer, J.A., 1996. Improvement of epileptic seizure control with treatment of obstructive sleep apnoea. *Seizure* 5 (1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/S1059-1311\(96\)80066-5](https://doi.org/10.1016/S1059-1311(96)80066-5).
- Veasey, S.C., Zhan, G., Fenik, P., Pratico, D., 2004. Long-term intermittent hypoxia: reduced excitatory hypoglossal nerve output. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170 (6), 665–672. <https://doi.org/10.1164/rccm.200403-261OC>.
- Vendrame, M., Auerbach, S., Lodenkemper, T., Kothare, S., Montouris, G., 2011. Effect of continuous positive airway pressure treatment on seizure control in patients with obstructive sleep apnea and epilepsy. *Epilepsia* 52 (11), 168–171. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03214.x>.
- Wais, M., Wu, C., Zahid, T., Sheppy, E., Gillis, J., Del Campo, M., Wan, Q., Zhang, L., 2009. Repeated hypoxic episodes induce seizures and alter hippocampal network activities in mice. *Neurosci.* 161 (2), 599–613. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.036>.
- Xie, H., Leung, K.L., Chen, L., Chan, Y.S., Ng, P.C., Fok, T.F., Wing, Y.K., Ke, Y., Li, A.M., Yung, W.H., 2010. Brain-derived neurotrophic factor rescues and prevents chronic intermittent hypoxia-induced impairment of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Neurobiol. Dis.* 40 (1), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.020>.
- Xie, H., Yung, W.H., 2012. Chronic intermittent hypoxia-induced deficits in synaptic plasticity and neurocognitive functions: a role for brain-derived neurotrophic factor. *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (1), 5–10. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.184>.

Research Article

Sudden Intrabulbar Amyloid Increase Simultaneously Disrupts Olfactory Bulb Oscillations and Odor Detection

Rebeca Hernández-Soto, Keila Dara Rojas-García, and Fernando Peña-Ortega 

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla, Mexico

Correspondence should be addressed to Fernando Peña-Ortega; jfpena@unam.mx

Received 15 April 2019; Revised 11 June 2019; Accepted 24 June 2019; Published 21 August 2019

Academic Editor: Nicoletta Berardi

Copyright © 2019 Rebeca Hernández-Soto et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

There seems to be a correlation between soluble amyloid beta protein ($A\beta$) accumulation in the main olfactory bulb (OB) and smell deterioration in both Alzheimer's disease (AD) patients and animal models. Moreover, this loss of smell appears to be related to alterations in neural network activity in several olfactory-related circuits, including the OB, as has been observed in anesthetized animals and brain slices. It is possible that there is a correlation between these two pathological phenomena, but a direct and simultaneous evaluation of the acute and direct effect of $A\beta$ on OB activity while animals are actually smelling has not been performed. Thus, here, we tested the effects of acute intrabulbar injection of $A\beta$ at a low dose (200 pmol) on the OB local field potential before and during the presence of a hidden piece of smelly food. Our results show that $A\beta$ decreases the power of OB network activity while impairing the animal's ability to reach the hidden food. We found a strong relationship between the power of the OB oscillations and the correlation between OBs and the olfactory detection test scores. These findings provide a direct link between $A\beta$ -induced OB network dysfunction and smell loss in rodents, which could be extrapolated to AD patients.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia [1]. Aside from cognitive dysfunction, one of the earliest symptoms is hyposmia [2–4]. Recent evidence in animal models has shown that amyloid beta ($A\beta$) accumulation in the olfactory bulb (OB) and other olfactory-related areas correlates with hyposmia [5–9], especially in the early stages of the AD-like pathology [9–11].

Accumulation of $A\beta$ in a variety of circuits is associated with alterations in their synaptic function and intrinsic neural properties. These alterations are reflected in population activity changes, which seem to underlie cognitive deterioration and other related symptoms in AD [8, 9, 12–16]. Similar alterations in network activity have been observed in the OB upon the acute or prolonged presence of oligomerized $A\beta$ [17–19], which also induces alterations in olfaction [17–21]. Considering that various OB oscillatory activities have been closely linked to olfactory information processing [22–28], it is likely that the $A\beta$ -induced alterations in OB activity con-

tribute to olfactory dysfunction. However, a simultaneous evaluation of both pathological processes is missing. Thus, here, we directly tested this likely pathological relationship by acutely injecting $A\beta$ into the OB while recording its population activity and the animal's ability to locate a source of smell. Our results show that a sudden $A\beta$ application decreases the power of OB network activity and the correlation between both OBs while simultaneously impairing the olfactory function of rats. These findings strongly suggest that $A\beta$ accumulation in the OB and the deterioration of its neural network activity is responsible, at least in part, for the hyposmia observed in AD.

2. Materials and Methods

The experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology at UNAM and were performed in accordance with the guidelines of the Official Mexican Norm for the Use and Care of Laboratory Animals (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-

1999) and the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH publication 80-23, Bethesda, MD, USA, 1996).

2.1. Subjects. Experiments were performed using 8-week-old male Wistar rats (300–350 g) obtained from the breeding colony of the animal facility at the Institute of Neurobiology, UNAM. Animals were housed individually in transparent acrylic cages in a temperature-controlled vivarium ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). All animals were kept under a normal 12 h light-12 h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with food and water *ad libitum*.

2.2. Cannula/Electrode Implantation. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (62 mg/kg, i.p.) and then administered atropine sulfate (1 mg/kg, i.p.), saline solution (0.9%, s.c.), and meloxicam (2 mg/kg i.p.). Next, subjects were positioned in a stereotaxic frame (Stoelting Co., IL) for bilateral implantation with stainless steel guide cannulae (23 gauge, 10 mm long) into the superficial layers of the OB (in the boundary between the glomerular and external plexiform layers) at the following coordinates: AP = +7.3, L = ± 1.3 , and V = -1.1 [29]. Cannulae were used for two purposes: (a) as guides for the microinjectors aiming at the granular cell layer (GCL) and (b) as recording electrodes of the OB field activity. For the latter, cannulae were electrically insulated by varnishing their entire surface except the tips (Figure 1(a)) [30, 31]. The electrodes, including the ground electrode, were attached to male connector pins and inserted into a connector strip (American Phenolic Corp.). Two stainless steel screws were threaded into the cranium over the cerebellum (at the following coordinates: AP = -10, L = ± 3 , and V = -1, [29]) to ground the signal and provide support for the cannulae assembly. The arrangement of cannulae and screws was fixed to the skull with dental acrylic (MDC Dental-NicTone R3V). A stylet was inserted into each cannula and kept in place at all times to avoid obstruction (stylets were only transiently removed for the microinjections and recordings). After the surgical procedure, the animals were allowed to recover for a week before further experimental manipulation.

2.3. A β Oligomer Preparation. A β_{1-42} and its inverse sequence, A β_{42-1} , were obtained from American Peptide (Sunnyvale, CA). The oligomerization protocol was performed as previously described [14, 19]. Briefly, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) was added to solid A β_{1-42} at a final peptide concentration of 1 mM and incubated for 60 min at room temperature. HFIP was allowed to evaporate overnight. Then, a 5 mM solution was prepared by adding DMSO. Such solution was then diluted with F12 medium (F12m) to reach a final concentration of 100 μM . This solution was incubated at 5°C for 24 h and then centrifuged at 14,000 rpm for 10 min in the cold. The supernatant containing the A β oligomers, monomers, and protofibrils ([14, 19]; Figure 1(d)) was collected and used for the experiments. The inverse sequence A β_{42-1} was prepared with the same procedure. The composition of the oligomerized A β_{1-42} solution used for this study was corroborated with

standard electrophoresis followed by silver staining, which exhibits the presence of monomers, dimers, trimers/tetramers, heptamers/octamers, and large aggregates/protofibrils (Figure 1(d); [14, 19]).

2.4. Electrophysiological Recording and Drug Administration. On the day of the experiment, animals were moved to a new cage with the same characteristics as their home (acrylic cage; $24 \times 18.5 \times 25$ cm) and clean sawdust, and then, they were placed in a Faraday cage. There, the OB local field potentials (LFPs) were recorded for 60 min under resting conditions (basal spontaneous activity, baseline) before any behavioral or pharmacological manipulation, and the recordings remained uninterrupted during the entire experiment (Figure 1(b)). The signals were amplified and filtered (high-pass, 0.1 Hz; low-pass, 1.5 kHz) with a differential AC amplifier (A-M Systems, Sequim, WA). The recordings were digitized at 20 kHz and stored in a personal computer with the AxoScope acquisition system from Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Then, the buried food tests were performed as described in the next section (Figure 1(b)). After the first olfactory test, either A β_{1-42} or its inverse sequence A β_{42-1} was bilaterally microinjected. In both cases, 1 μl of a solution containing 100 pmol of A β was applied into each OB (200 pmol total). The infusion was made by inserting a microinjector, with a 30-gauge needle (12 mm long), into each guide with the microinjector surpassing it and reaching the GCL (V = -3.1). The microinjectors were connected to microsyringes (Hamilton Company, Reno, NV) by polyethylene tubing. The infusion rate, 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$, was controlled by a microinfusion pump (Chemyx Inc., Stafford, TX). After bilateral A β infusion, the microinjectors remained in place for 5 min to ensure an adequate A β diffusion. After 60 min of postinjection recording under resting conditions (Figure 1(b)), a second olfactory test was performed (Figure 1(b)).

2.5. Olfactory Behavioral Test. Olfaction was tested with the “buried food test” [17, 32] while continuously recording the animals. In each test, a piece of chocolate (50 mg; TRIKI-TRAKES[®]) was randomly placed at one of the four corners, hidden 2 cm under the sawdust. The time that animals took to reach the chocolate (latency) was quantified. The maximum test time allowed was 600 s. The animals were not deprived from food or water at any time, as has been previously reported [33]. The inability or delay to reach the hidden food is interpreted as an alteration in the main OB function [17, 32].

2.6. Histological Evaluation. We carried out histological evaluations and used Nissl staining to confirm the injection sites (Figure 1(b); [30]). For this procedure, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with 80 ml of 0.9% saline solution followed by 30 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate-buffered solution (PBS; pH 7.4). The brains were extracted and maintained in 4% PFA. For sectioning, the OBs were immersed in 0.1 M PBS (pH 7.4), and sagittal slices (40 μm thick) were obtained with a Vibratome

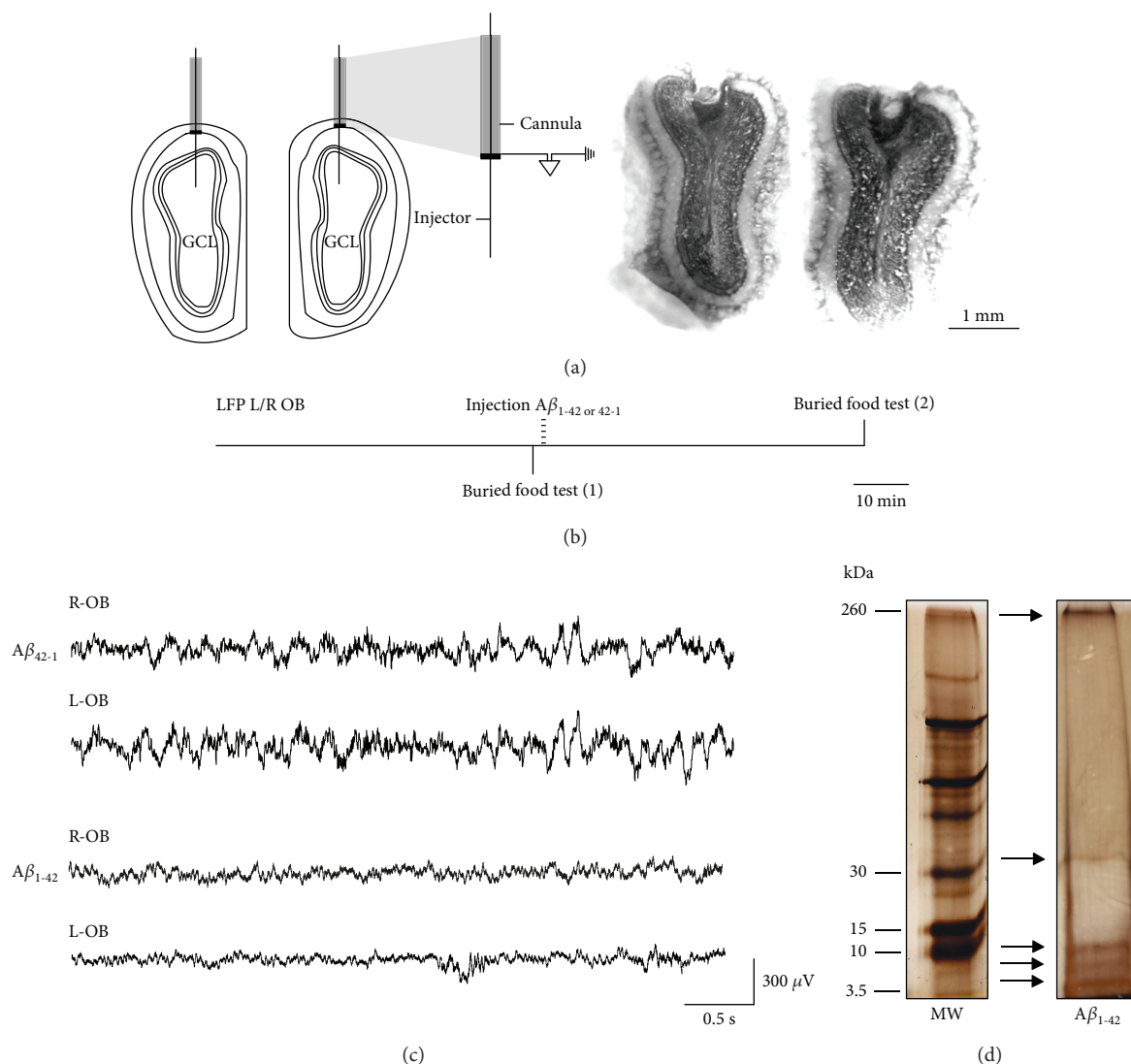


FIGURE 1: Location of the electrodes and injectors, experimental design, recordings, and composition of the $A\beta_{1-42}$ oligomeric solution. (a) Left: scheme of the OBs and location of a guide cannula in each surface (at the limits between the glomerular and external plexiform layers). The injectors reaching the granular cell layer (GCL) are also represented. One cannula with its corresponding injector is expanded to exemplify that the tip of the cannula is exposed and conductive (in black) for use as a recording electrode. Right: coronal sections of both OBs showing the tracks left by both cannulae and the injectors. (b) Temporal organization (horizontal line) of the local field potential (LFP) recordings of both the left and right (L/R) OBs and the application of two buried food tests: the first (1) just before $A\beta$ administration and the second (2) performed 60 min after $A\beta$ administration. Note that LFP recordings were uninterrupted during the entire experiment. (c) Representative traces of the activity of both OBs 60 min after the administration of either $A\beta_{1-42}$ (upper traces) or its reverse sequence $A\beta_{42-1}$ (lower traces). (d) Silver-stained gel of the electrophoretic pattern of the $A\beta_{1-42}$ oligomerized solution (right lane; monomers, dimers, trimers/tetramers, and heptamers/octamers are the main oligomeric forms) along with a molecular-weight (MW) size marker (left lane).

(Leica VT1200). Nissl staining was performed as previously described [30].

2.7. Data Analysis. The electrophysiological recordings were analyzed offline by performing the Rapid Fourier Transform Algorithm with a Hamming window in Clampfit 10.6 (Molecular Devices). Segments of 5 s every 10 min were analyzed for spontaneous activity in resting conditions (in the absence of odors) and during the buried food tests. Spectrograms from 1 to 60 Hz were plotted, using NeuroExplorer (5.1), for enhanced visualization of the frequency compo-

nents of the signals (Figures 2 and 3). The power spectra were segmented in the following frequency bands: theta (1-12 Hz), beta (13-35 Hz), and gamma (36-59 Hz). The power of each individual experiment was normalized to baseline conditions (i.e., activity before $A\beta$ application), arbitrarily set as 100%, for most of the data. To compare the activity power immediately before introducing the odorous food with the activity during the buried food test, the pretest activity power (defined as control) was normalized and set as 100%, only for data presented in Figure 3(c). We evaluated the cross-correlation between the activities of both OBs during resting

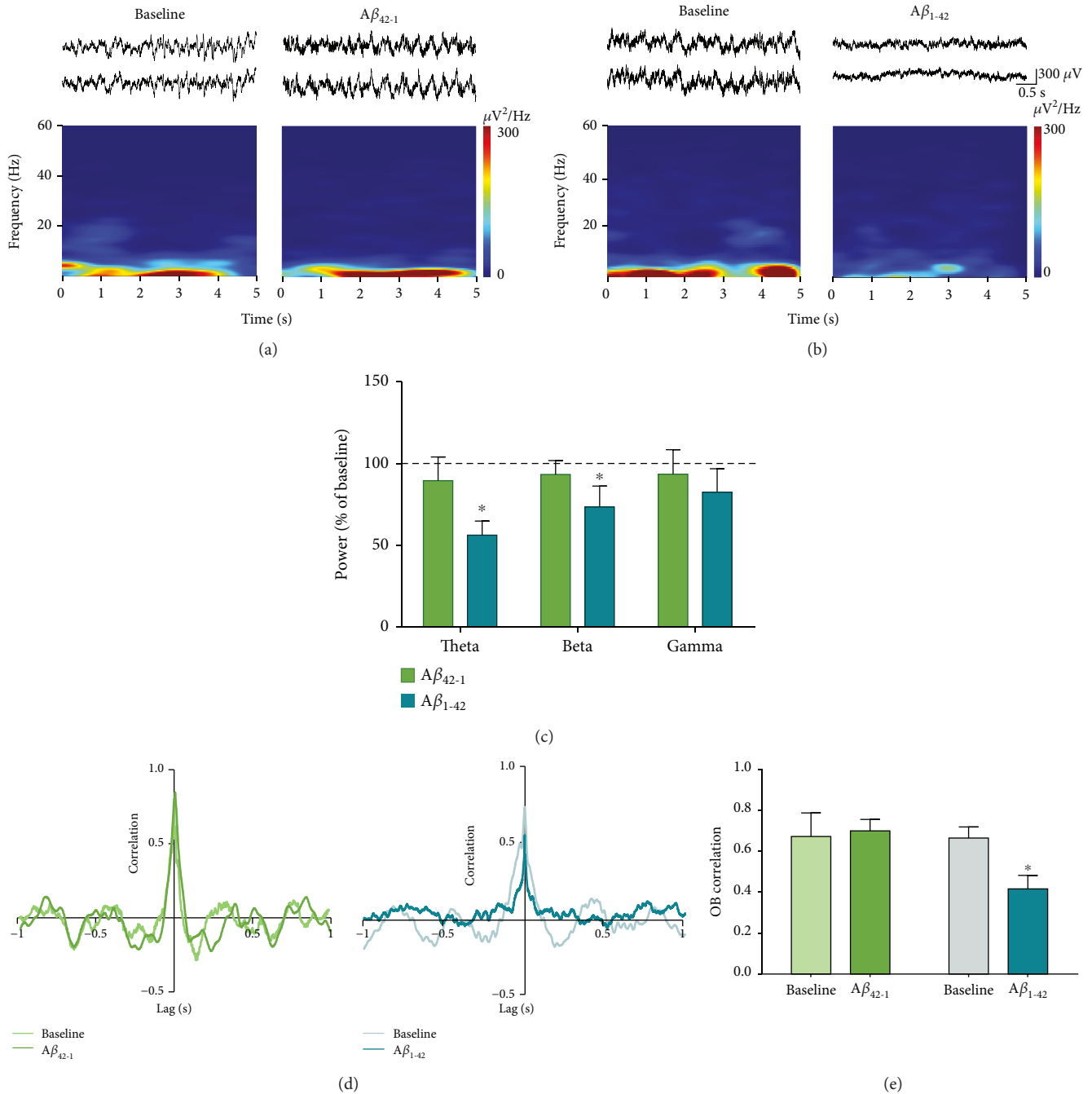


FIGURE 2: The spontaneous activity of the OB is reduced by the acute administration of $A\beta_{1-42}$. (a) Top: representative recordings of the right (upper trace) and left (lower trace) OBs before (baseline) and 60 min after the administration of the inverse sequence $A\beta_{42-1}$. Bottom: the spectrogram for the recording of one of the OBs. (b) The same as in (a), but for animals given $A\beta_{1-42}$. (c) Quantification of the power (normalized as % of baseline) of the OB activity in the following frequency bands: theta (1-12 Hz), beta (13-35 Hz), and gamma (36-59 Hz), 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ ($n = 6$) or $A\beta_{1-42}$ ($n = 8$). The dotted line represents baseline. (d) Representative cross-correlograms of the activities of both OBs before (baseline) and 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ (left cross-correlograms) or $A\beta_{1-42}$ (right cross-correlograms). (e) Quantification of the peak correlation (at zero lag) of OB activities before and 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ ($n = 4$) or $A\beta_{1-42}$ ($n = 6$). * denotes a significant difference compared to baseline ($p < 0.05$).

conditions and in the presence of odors. GraphPad Prism (6.01) was used for statistical analysis. In all cases, data are presented as the mean \pm S.E.M. For the comparisons of power quantifications, a Friedman test followed by a Wil-

coxon test was performed. The maximum cross-correlation values at zero lag were compared with a Wilcoxon test. The same test was used to compare the latency to find the hidden food. Finally, linear regression analyses were performed to

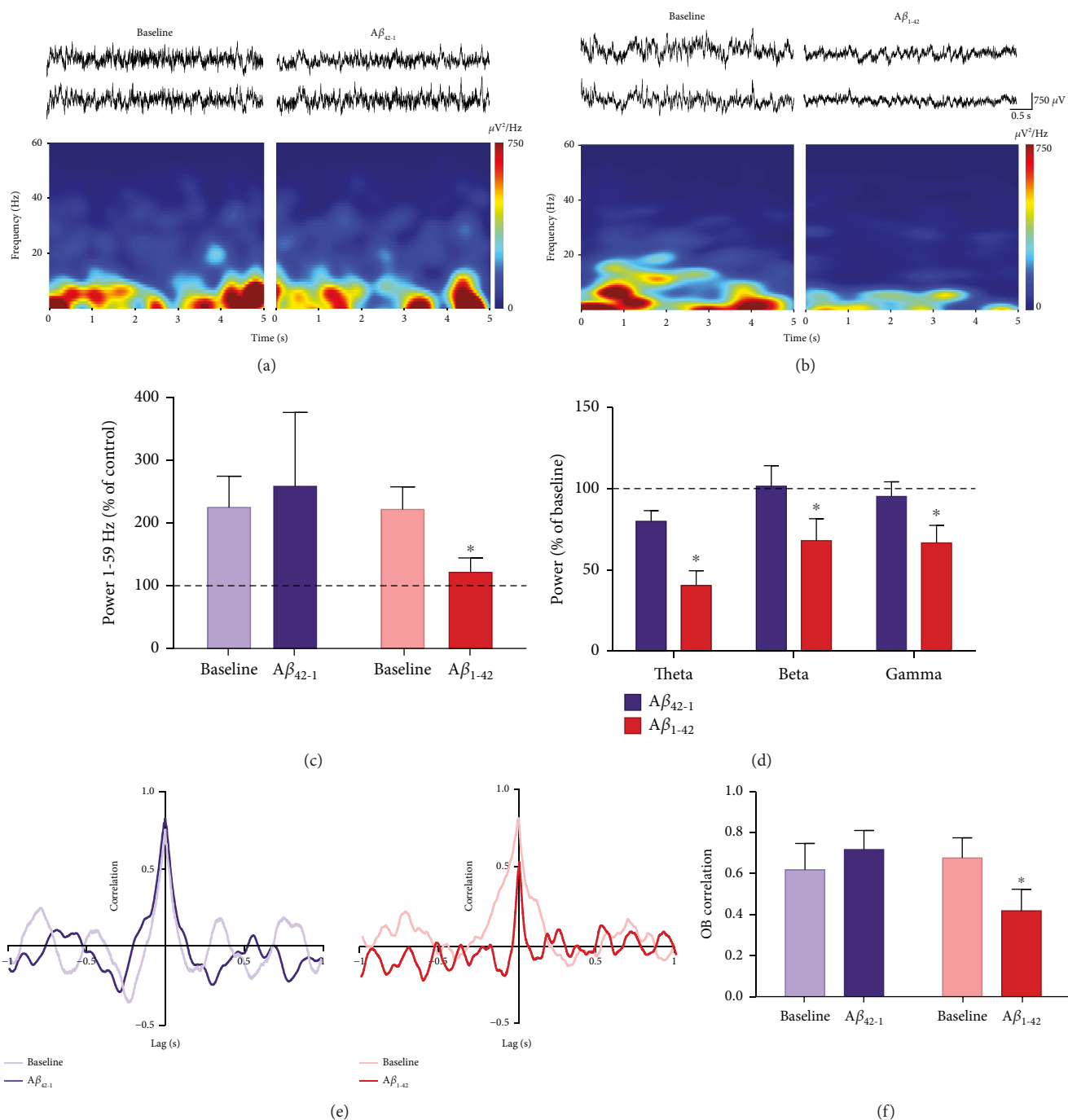


FIGURE 3: The activity of the OB in the presence of odors is reduced by the acute administration of $A\beta_{1-42}$. (a) Top: representative recordings of the right (upper trace) and left (lower trace) OBs in the presence of odors before (baseline) and 60 min after the administration of the inverse sequence $A\beta_{42-1}$. Bottom: the spectrogram for the recording of one of the OBs. (b) The same as in (a), but for animals given $A\beta_{1-42}$. (c) Quantification of the change in power (normalized as % of control; i.e., period before odor presence) of OB activity in the presence of odors and in broad-band frequency (1-59 Hz) before (baseline) and 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ ($n=6$) or $A\beta_{1-42}$ ($n=8$). The dotted line represents control levels. (d) Quantification of the power (normalized as % of baseline) of OB activity in the presence of odors in the following frequency bands: theta (1-12 Hz), beta (13-35 Hz), and gamma (36-59 Hz), 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ ($n=6$) or $A\beta_{1-42}$ ($n=8$). The dotted line represents baseline. (e) Representative cross-correlograms of the activities of both OBs in the presence of odors before (baseline) and 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ (left cross-correlograms) or $A\beta_{1-42}$ (right cross-correlograms). (f) Quantification of the peak correlation (at zero lag) of OB activities in the presence of odors before and 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ ($n=4$) or $A\beta_{1-42}$ ($n=5$). * denotes a significant difference compared to baseline ($p < 0.05$).

measure the relationship between the latencies to find the hidden food with the maximum correlation values and the power of the OB activity in the different frequency bands.

3. Results

3.1. Acute $A\beta$ Inhibits OB Spontaneous Network Activity and Decreases the Functional Connectivity between OBs. Histological confirmation of the precise location of cannula tips in both OB superficial layers (at the limits between the glomerular and external plexiform layers) and microinjectors in the GCL (Figure 1(a)) was necessary to include the animals in their respective experimental groups. In one-third of the experiments (5/14), the quality of the recordings (i.e., signal-to-noise ratio) was not optimal in one OB (Figure 1(c)), but the other was properly recorded (also considered minimal for inclusion). In this case, the OB cross-correlation was not performed, but the rest of the quantifications (power and buried tests) were included.

The activity of the OBs, recorded in freely moving rats under resting conditions, exhibited a combination of oscillatory components in a broad frequency range (Figure 1(c)) dominated by slow oscillations, although fast oscillations were also present with less power (Figure 1(c)). The power of this spontaneous network activity in the OBs was reduced by $A\beta_{1-42}$ (Figures 1(c) and 2(b)), but not by its inverse sequence $A\beta_{42-1}$ (Figures 1(c) and 2(a)). The intrabulbar administration of $A\beta_{1-42}$ induced an inhibition of the activity of the OBs, which when quantified after 60 min of its application is reflected in a decrease in theta band power to $56.24 \pm 8.55\%$ of baseline ($p < 0.05$, $n = 8$; Figures 2(b) and 2(c)) and beta band power to $73.42 \pm 12.79\%$ of baseline ($p < 0.05$, $n = 8$; Figures 2(b) and 2(c)). In contrast, OB activity in the gamma band remained unaltered after $A\beta_{1-42}$ administration ($82.40 \pm 14.41\%$ of control, $p = 0.19$, $n = 8$; Figures 2(b) and 2(c)). The reduction of OB activity in the presence of $A\beta_{1-42}$ was not observed after the administration of the same dose of its inverse sequence $A\beta_{42-1}$ (Figures 2(a) and 2(c)). In the presence of the inverse sequence $A\beta_{42-1}$, OB activity remained unchanged when quantified in the theta band ($89.54 \pm 14.49\%$ of control, $p > 0.05$, $n = 6$), beta band ($93.36 \pm 8.47\%$ of control, $p > 0.05$, $n = 6$), and gamma band ($93.47 \pm 15.03\%$ of control, $p > 0.05$, $n = 6$; Figures 2(a) and 2(c)). The peak cross-correlation between the spontaneous activities of both OBs at zero lag had a significant reduction compared to baseline (0.41 ± 0.06 vs. 0.66 ± 0.05 , $p < 0.05$, $n = 6$) after application of $A\beta_{1-42}$. In contrast, no change in the peak cross-correlation between spontaneous activities of both OBs at zero lag was observed in the presence of the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ compared to baseline (0.70 ± 0.05 vs. 0.67 ± 0.11 , $p = 0.4$, $n = 4$) (Figures 2(d) and 2(e)).

3.2. Acute $A\beta$ Inhibits OB Activity in the Presence of Odors and Decreases the Correlation between OBs. Immediately after evaluating the OB network activity under resting conditions, animals were evaluated in the buried food test, which involved the presence of novel odors in the environment. After the application of either $A\beta_{1-42}$ or its inverse sequence

$A\beta_{42-1}$, a second olfactory test was performed (Figure 1(b)). Thus, we also evaluated OB network activity in the presence of novel odors before and after $A\beta$ administration (Figure 1(b)). The activity of the OBs, recorded in the presence of novel odors, exhibited a combination of oscillatory components in a broad frequency range (Figure 3) dominated by slow oscillations, although fast oscillations were also present with low power (Figures 3(a) and 3(b)). OB power increased in the presence of novel odors under baseline conditions (Figure 3(c)). When compared to the period immediately before the presence of novel odors, defined here as “control,” the power of the OB significantly increased to $225.00 \pm 50.01\%$ of control in the group subsequently injected with $A\beta_{1-42}$ ($p < 0.05$, $n = 8$) or to $222.00 \pm 35.88\%$ of control in the group subsequently injected with inverse sequence $A\beta_{42-1}$ ($p < 0.05$, $n = 6$). This was expected, since both groups shared the same experimental conditions before being injected with one of the two $A\beta$ sequences. The increase in power induced by the presence of novel odors was absent after the application of $A\beta_{1-42}$ ($121.60 \pm 22.98\%$ of control, $p = 0.2$, $n = 8$) but remained after the application of its inverse sequence $A\beta_{42-1}$ (to $259.00 \pm 117.60\%$ of control, $p < 0.05$, $n = 6$) (Figure 3(c)). When examining for the different frequency bands used to assess OB activity under resting conditions, OB activity in the presence of novel odors exhibited a reduction in all frequency bands after $A\beta_{1-42}$ application, but not after the application of its inverse sequence $A\beta_{42-1}$ (Figures 3(a)–3(d)). Compared to the activity of the OBs during the first buried food test before $A\beta_{1-42}$ application (baseline), a reduction in the power of the OB activity for the theta band (to $40.80 \pm 9.12\%$ of baseline, $p < 0.05$, $n = 8$; Figures 3(b)–3(d)), beta band (to $68.59 \pm 13.60\%$ of baseline, $p < 0.05$, $n = 8$; Figures 3(b)–3(d)), and gamma band (to $67.21 \pm 10.82\%$ of baseline, $p < 0.05$, $n = 8$; Figures 3(b)–3(d)) was observed during the second olfactory test performed 60 min after $A\beta_{1-42}$ application. In contrast, rats administered with the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ did not show any change in OB power for the theta band ($80.53 \pm 6.69\%$ of baseline, $p > 0.05$, $n = 6$; Figures 3(a) and 3(d)), beta band ($102.30 \pm 12.74\%$ of baseline, $p > 0.05$, $n = 6$; Figures 3(a) and 3(d)), and gamma band ($96.09 \pm 8.99\%$ of baseline, $p > 0.05$, $n = 6$; Figures 3(a) and 3(d)) during the second olfactory test. To determine if the described effects on power are related to changes in the functional connectivity between OBs, we performed a cross-correlation analysis (Figures 3(e) and 3(f)) and found a significant decrease in the peak correlation of OB activity in the presence of novel odors after $A\beta_{1-42}$ administration (0.41 ± 0.10 , $p < 0.05$, $n = 5$) during the second buried food test, compared to the first (0.72 ± 0.10). No decrease in peak correlation was found in the second test after the injection of the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ (0.68 ± 0.1 , $p < 0.05$, $n = 4$), compared to the first test (0.62 ± 0.13) (Figures 3(e) and 3(f)).

3.3. Acute $A\beta$ Inhibits Odor Detection, Which is Related to Changes in OB Activity and Correlation. To assess the effect of acute administration of $A\beta_{1-42}$ on olfaction, we performed the buried food test before and after its administration (Figures 1(b) and 4(a)). Under baseline conditions,

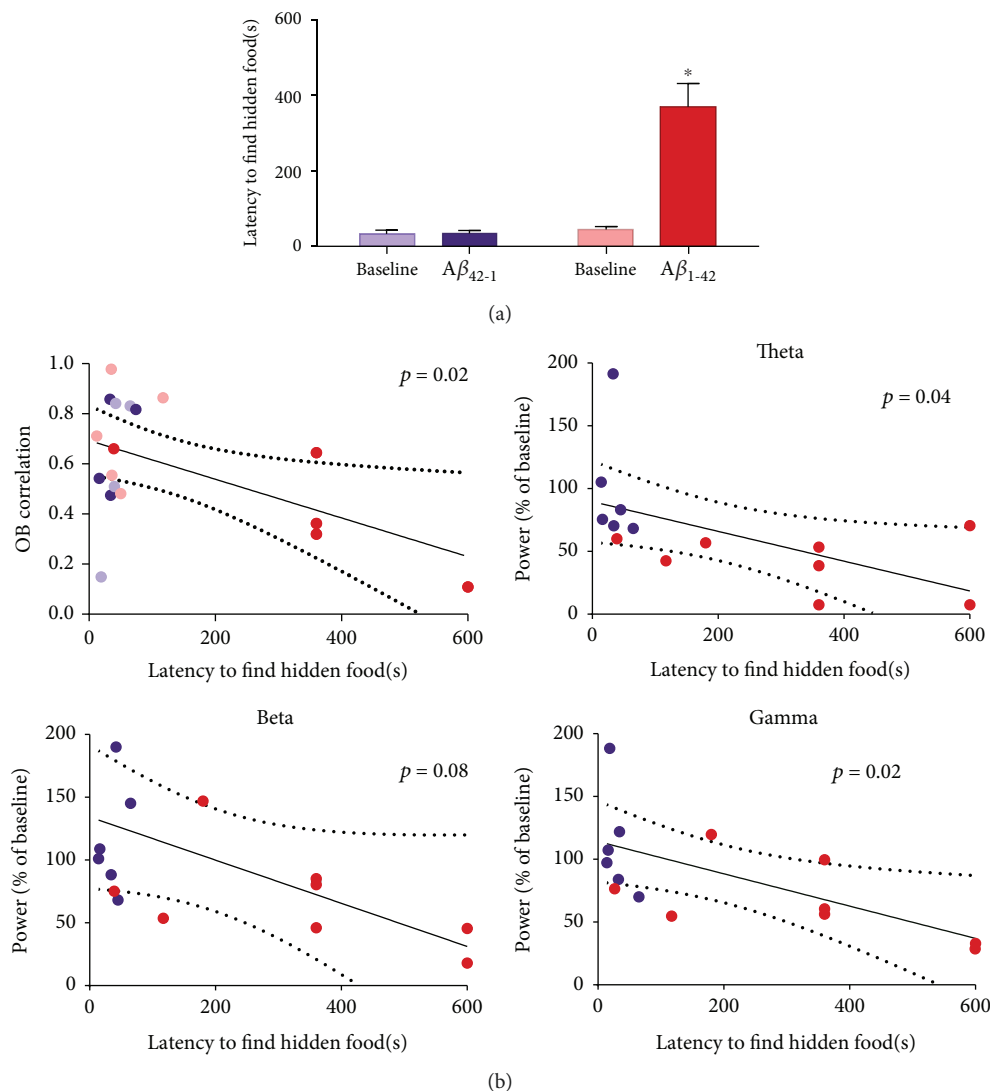


FIGURE 4: Olfaction is reduced by the acute administration of $A\beta_{1-42}$, which is related to the deterioration of the OB activity and cross-correlation. (a) Quantification of the time to reach a hidden piece of smelly food before (Baseline) and 60 min after the administration of either the inverse sequence $A\beta_{42-1}$ ($n = 6$) or $A\beta_{1-42}$ ($n = 13$). (b) Linear regression analyses to evaluate the relationship between olfactory function, measured as the latency to find a hidden piece of smelly food, and the activity of the OB in the following frequency bands: theta (1-12 Hz; top right), beta (13-35 Hz; bottom left), and gamma (36-59 Hz; bottom right), as well as the correlation between the activities of both OBs (top left). * denotes a significant difference compared to a control test ($p < 0.05$).

the animals reached the hidden food in 32.83 ± 24.40 s in the group subsequently injected with $A\beta_{1-42}$ ($n = 13$) or 44.54 ± 8.00 s ($n = 6$). This was expected, since both groups shared the same experimental conditions before being injected with one of the two $A\beta$ sequences. The application of $A\beta_{1-42}$ increased the latency to find the hidden food to 369.20 ± 61.76 s ($p < 0.05$, $n = 13$; Figure 4(a)). In contrast, the latency remained unaltered after the application of the inverse sequence $A\beta_{1-42}$ (34.50 ± 19.00 s, $p = 0.3$, $n = 6$; Figure 4(a)). Finally, we also observed that the latency to find the hidden food is related to the level of correlation between OBs ($p < 0.05$; Figure 4(b)) and the power of OB activity during the olfactory test in the theta and gamma bands ($p < 0.05$; Figure 4(b)) but not in the beta band, which only shows a

trend of correlation with the olfactory function ($p = 0.08$; Figure 4(b)).

4. Discussion

Our results show that a sudden intrabulbar increase in $A\beta$ oligomers induces a reduction in the OB spontaneous network activity and in the correlation between OBs, which are associated with a notorious impairment in olfactory detection. Thus, our findings provide direct evidence of the relationship between $A\beta$ -induced OB activity deterioration and olfactory dysfunction, which has been previously suggested by independent experiments showing disturbances in OB activity and olfaction in transgenic animal models of AD

[5, 8, 9, 34, 35], and indirect evidence in AD patients [36]. This pathological relationship was also suggested by the observation of acute $A\beta$ -induced alterations in the electrical activity of the OB *in vitro* [17, 18] and chronic $A\beta$ -induced alterations in the electrical activity of the OB *in vivo* [19] correlating with $A\beta$ -induced olfactory impairment [17, 19], always in independent experiments. The relevance of our observation is that both pathological phenomena were observed simultaneously and their quantifications correlated.

The function of the OB depends largely on the orchestrated activity of its neural components [26, 37, 38], which is expressed through the generation of a variety of oscillatory patterns under resting conditions and in response to odor stimulation [26, 37, 38]. Consequently, alterations in OB neurons affect both the coordinated OB network function and olfactory performance [9, 39–42]. As mentioned, this seemed to be the case for $A\beta$ accumulation in the OB [5, 9].

Here, we corroborated previous findings showing that $A\beta$ oligomers reduce neural network activity in OB slices [17], and *in vivo* [19], this inhibition seems to rely on $A\beta$ -induced alterations in mitral/tufted cell firing [9, 18] and the reduction in lateral inhibition within this circuit [18]. Coincidentally, a reduction in dendrodendritic inhibition has also been observed in an AD transgenic mouse model [9]. Although changes in mitral/tufted excitability and synaptic inhibition are likely candidates for $A\beta$ -induced inhibition of OB neural network activity, the specific effects of $A\beta$ on other OB cell populations (i.e., granular cells) and synaptic interactions (i.e., dendrodendritic excitation) need to be evaluated to determine the exact sources of the inhibitory action of $A\beta$ on OB network activity and, consequently, on olfaction.

Neuronal interactions within the OB originate different oscillatory patterns, including theta rhythm (1–12 Hz), which was the oscillatory activity most affected by a sudden increase of $A\beta$ in our experiments. In the OB, theta activity is mostly driven by rhythmic inputs from the olfactory epithelium produced by the mechanotransduction of the inspiratory air inflow to the nose [25, 43]. We have evidence that local application of $A\beta$ in the OB does not affect the breathing pattern in anesthetized animals (data not shown), excluding the possibility that the effects observed in the OB theta rhythm could be related to changes in breathing, but are more likely the result of $A\beta$ effects on OB circuitry.

The rhythmic activity arriving at the glomeruli in theta frequency recruits local inhibition from juxtglomerular interneurons innervating mitral/tufted cells, which amplifies theta activity within the OB [23]. Considering that OB activity interneurons seem to be affected by $A\beta$ [9, 18], it is likely that OB theta rhythm is deteriorated by the inhibitory actions of $A\beta$ on juxtglomerular interneurons or its targets, which is similar to the mechanisms proposed to be involved in $A\beta$ -induced degradation of theta activity in other circuits, including the hippocampus [15, 44, 45]. Here, we found that $A\beta$ -induced deterioration of theta activity closely correlates with olfactory dysfunction, which is similar to the relationship between the $A\beta$ -induced reduction of hippocampal theta activity and memory impairment [17]. Considering that restoration of hippocampal theta rhythm can recover cognitive function [46], it would be interesting to

test whether restoration of OB theta rhythm can recover olfaction as well [5].

The other OB rhythm highly affected by $A\beta$ is beta activity. Beta rhythm has been associated with odor discrimination and learning [26, 27, 47] and relies on the centrifugal innervation to the OB and on interbulbar connections [26, 27]. Our finding that $A\beta$ induces beta activity deterioration agrees with the observation by Liu and colleagues (2013) of AD transgenic mice exhibiting a reduction in beta coherence between the OBs [35]. We also found that the correlation between both OBs is reduced after the administration of $A\beta$. This observation is relevant considering that coherent activity between OBs is required for proper olfactory information processing [47–49]. As mentioned, OB beta rhythm also relies on the centrifugal feedback from the piriform cortex and other forebrain structures [26, 27]. The interaction between the OB and forebrain structures is also relevant for proper olfactory information processing [50–52]. Additionally, our findings indicate that $A\beta$ applied into the OB might affect local centrifugal terminals, as we have shown for hippocampal terminals located in the prefrontal cortex [53].

On the other hand, OB gamma oscillations, which are mildly affected by $A\beta$ administration, are related to a variety of olfactory functions including odor detection, odor perceptual processing, olfactory learning, and discrimination, as well as fine odor discrimination [25, 27, 28, 47, 54]. Considering that OB gamma oscillations mostly rely on the activity of granule interneurons [55–58] and their dendrodendritic interactions with mitral/tufted cells [59, 60], it is likely that $A\beta$ -induced deterioration of synaptic inhibition in the OB [18], which might include the one from granule cells, is the source of $A\beta$ -induced reduction of OB gamma activity. In fact, the OB granule cell layer is a preferential site for $A\beta$ accumulation [5, 7, 20, 61], which is related to the level of olfactory dysfunction [20]. Interestingly, the reduction of $A\beta$ accumulation in the OB by pharmacological means reverses olfactory dysfunction [5, 20].

The OB network suffers a reconfiguration process while transiting from the spontaneous network activity in the absence of odors to the odor-induced neural network activity [62], which involves not only an increase in activity power [22, 26, 37, 43, 63–66] but also changes in cellular elements and synaptic interactions required for the transition from one activity pattern to the other [62]. This reconfiguration process seems to be necessary for proper olfactory information processing [26, 37]. Coincidentally, here, we show that $A\beta$ administration affects the change in the OB activity pattern induced by the presence of odors, at least with respect to the increase in overall power. A similar reduced increase in power has been observed in AD transgenic mice [5, 35]. Thus, the $A\beta$ -induced reduction in olfaction not only might be related to the alterations in the generation of the different oscillatory patterns discussed here but may also involve an interference with the reconfiguration of the OB network in response to the presence of odors.

A core finding of this study is that the OB network dysfunction is the main source of $A\beta$ -induced olfactory dysfunction, which opens the possibility of understanding the cellular basis of the hyposmia observed in AD [2, 67–

70] and identifying molecular targets to treat it. This is particularly relevant considering that olfactory dysfunction has been closely related to the cognitive deficits in AD [71] and predicts the clinical transition from mild cognitive impairment to AD and mortality in AD patients [68, 72]. Moreover, it is likely that correcting the alterations in the olfactory circuits would improve olfaction in AD patients and contribute to correcting cognitive impairment [73–75].

5. Conclusion

Our results provide direct evidence of a close relationship between A β -induced OB network activity disruption and olfactory impairment, which indicate that some of the pathological manifestations observed in AD can be originated by disturbances in the activity of a variety of neural networks including the OB. Thus, it is likely that restoring normal neural network activity in the OB could restore olfaction and also be beneficial for the functional recovery of other neural networks closely related to the OB such as the entorhinal cortex or the hippocampus. Consequently, it is probable that the alterations in OB network activity induced by A β are responsible for the hyposmia observed in AD and impact other cognitive processes relying on related neural networks.

Data Availability

Data sets of the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Disclosure

The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest. Rebeca Hernández-Soto is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Authors' Contributions

FPO conceived and designed the experiments. HSR and RGKD performed the experiments. HSR and RGKD analyzed the data. FPO contributed with the reagents/materials/analysis tools. HSR, RGKD, and FPO wrote the paper. FPO supervised the project. Rebeca Hernández-Soto and Keila Dara Rojas-García contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Grant # A1-S-7540) and by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA; Grant # IN202018). CONACyT also provided scholarships for Rebeca Hernández-Soto (No. 664903) and Keila Dara Rojas-García (No. 612138). The authors would like to thank Dr. Benito Ordaz for the technical support, as

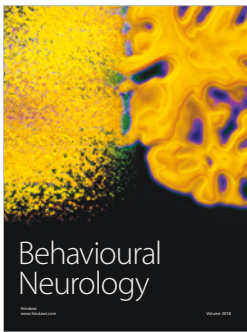
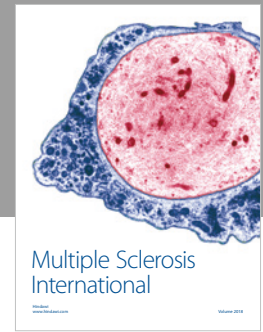
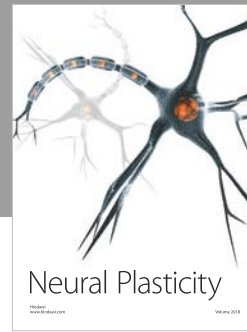
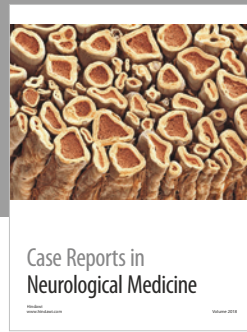
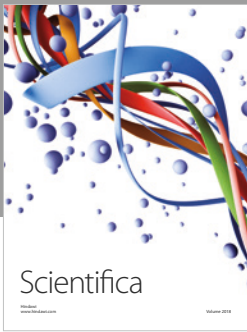
well as Jessica González-Norris and Anaid Antaramian for the editorial comments.

References

- [1] C. Patterson, C. Lynch, A. Bliss, M. Lefevre, and W. Weidner, "World Alzheimer Report 2018," in *The State of the Art of Dementia Research*, pp. 1–46, New Frontiers, 2018.
- [2] T. Kovacs, N. J. Cairns, and P. L. Lantos, " β -amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in the olfactory bulb in ageing and Alzheimer's disease," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 25, no. 6, pp. 481–491, 1999.
- [3] S. E. Arnold, E. B. Lee, P. J. Moberg et al., "Olfactory epithelium amyloid- β and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease," *Annals of Neurology*, vol. 67, no. 4, pp. 462–469, 2010.
- [4] J. Attems, L. Walker, and K. A. Jellinger, "Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases," *Acta Neuropathologica*, vol. 127, no. 4, pp. 459–475, 2014.
- [5] D. W. Wesson, A. H. Borkowski, G. E. Landreth, R. A. Nixon, E. Levy, and D. A. Wilson, "Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an Alzheimer's β -amyloidosis mouse model," *The Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 44, pp. 15962–15971, 2011.
- [6] L. Cao, B. R. Schrank, S. Rodriguez et al., "A β alters the connectivity of olfactory neurons in the absence of amyloid plaques *in vivo*," *Nature Communications*, vol. 3, no. 1, p. 1009, 2012.
- [7] W. Xu, S. Fitzgerald, R. A. Nixon, E. Levy, and D. A. Wilson, "Early hyperactivity in lateral entorhinal cortex is associated with elevated levels of A β PP metabolites in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease," *Experimental Neurology*, vol. 264, pp. 82–91, 2015.
- [8] N.-A. Xiao, J. Zhang, M. Zhou et al., "Reduction of glucose metabolism in olfactory bulb is an earlier Alzheimer's disease-related biomarker in 5XFAD mice," *Chinese Medical Journal*, vol. 128, no. 16, pp. 2220–2227, 2015.
- [9] W. Li, S. Li, L. Shen et al., "Impairment of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb of APP/PS1 mice," *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 11, p. 2, 2019.
- [10] D. W. Wesson, E. Levy, R. A. Nixon, and D. A. Wilson, "Olfactory dysfunction correlates with amyloid- β burden in an Alzheimer's disease mouse model," *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 2, pp. 505–514, 2010.
- [11] N. Wu, X. Rao, Y. Gao, J. Wang, and F. Xu, "Amyloid- β deposition and olfactory dysfunction in an Alzheimer's disease model," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 37, no. 4, pp. 699–712, 2013.
- [12] C. Babiloni, G. B. Frisoni, M. Pievani et al., "Hippocampal volume and cortical sources of EEG alpha rhythms in mild cognitive impairment and Alzheimer disease," *NeuroImage*, vol. 44, no. 1, pp. 123–135, 2009.
- [13] A. Adaya-Villanueva, B. Ordaz, H. Balleza-Tapia, A. Márquez-Ramos, and F. Peña-Ortega, "Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides," *Peptides*, vol. 31, no. 9, pp. 1761–1766, 2010.
- [14] H. Balleza-Tapia, A. Huanosta-Gutiérrez, A. Márquez-Ramos, N. Arias, and F. Peña, "Amyloid β oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner," *Current Alzheimer Research*, vol. 7, no. 5, pp. 453–462, 2010.

- [15] L. V. Colom, M. T. Castañeda, C. Bañuelos et al., “Medial septal β -amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function,” *Neurobiology of Aging*, vol. 31, no. 1, pp. 46–57, 2010.
- [16] F. Peña-Ortega, “Amyloid beta-protein and neural network dysfunction,” *Journal of Neurodegenerative Diseases*, vol. 2013, Article ID 657470, 8 pages, 2013.
- [17] R. Alvarado-Martínez, K. Salgado-Puga, and F. Peña-Ortega, “Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, article e75745, 2013.
- [18] B. Hu, C. Geng, and X. Y. Hou, “Oligomeric amyloid- β peptide disrupts olfactory information output by impairment of local inhibitory circuits in rat olfactory bulb,” *Neurobiology of Aging*, vol. 51, pp. 113–121, 2017.
- [19] J. M. Cornejo-Montes-de-Oca, R. Hernández-Soto, A. G. Isla, C. E. Morado-Urbina, and F. Peña-Ortega, “Tolfenamic acid prevents amyloid β -induced olfactory bulb dysfunction in vivo,” *Current Alzheimer Research*, vol. 15, no. 8, pp. 731–742, 2018.
- [20] Z. G. Yao, H. Y. Jing, D. M. Wang et al., “Valproic acid ameliorates olfactory dysfunction in APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer’s disease: ameliorations from the olfactory epithelium to the olfactory bulb,” *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 144, pp. 53–59, 2016.
- [21] Z. G. Yao, F. Hua, H. Z. Zhang, Y. Y. Li, and Y. J. Qin, “Olfactory dysfunction in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer’s disease: morphological evaluations from the nose to the brain,” *Neuropathology*, vol. 37, no. 6, pp. 485–494, 2017.
- [22] G. Lepousez and P. M. Lledo, “Odor discrimination requires proper olfactory fast oscillations in awake mice,” *Neuron*, vol. 80, no. 4, pp. 1010–1024, 2013.
- [23] I. Fukunaga, J. T. Herb, M. Kollo, E. S. Boyden, and A. T. Schaefer, “Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb,” *Nature Neuroscience*, vol. 17, no. 9, pp. 1208–1216, 2014.
- [24] L. M. Kay, “Olfactory system oscillations across phyla,” *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 31, pp. 141–147, 2015.
- [25] D. Rojas-Líbano and L. M. Kay, “Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system,” *Cognitive Neurodynamics*, vol. 2, no. 3, pp. 179–194, 2008.
- [26] C. Martin and N. Ravel, “Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks?,” *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 8, p. 218, 2014.
- [27] N. Fourcaud-Trocmé, E. Courtiol, and N. Buonviso, “Two distinct olfactory bulb sublamina networks involved in gamma and beta oscillation generation: a CSD study in the anesthetized rat,” *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 8, p. 88, 2014.
- [28] O. Gschwend, N. M. Abraham, S. Lagier, F. Begnaud, I. Rodriguez, and A. Carleton, “Neuronal pattern separation in the olfactory bulb improves odor discrimination learning,” *Nature Neuroscience*, vol. 18, no. 10, pp. 1474–1482, 2015.
- [29] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*, Elsevier, 2006.
- [30] F. Peña and R. Tapia, “Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 72, no. 5, pp. 2006–2014, 1999.
- [31] F. Peña and R. Tapia, “Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate-and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels,” *Neuroscience*, vol. 101, no. 3, pp. 547–561, 2000.
- [32] D. A. Edwards, B. Walter, and P. Liang, “Hypothalamic and olfactory control of sexual behavior and partner preference in male rats,” *Physiology & Behavior*, vol. 60, no. 5, pp. 1347–1354, 1996.
- [33] K. Badonnel, M. C. Lacroix, R. Monnerie, D. Durieux, M. Caillol, and C. Baly, “Chronic restricted access to food leading to undernutrition affects rat neuroendocrine status and olfactory-driven behaviors,” *Hormones and Behavior*, vol. 62, no. 2, pp. 120–127, 2012.
- [34] P. E. Cramer, J. R. Cirrito, D. W. Wesson et al., “ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models,” *Science*, vol. 335, no. 6075, pp. 1503–1506, 2012.
- [35] Q. Liu, A. Li, L. Gong, L. Zhang, N. Wu, and F. Xu, “Decreased coherence between the two olfactory bulbs in Alzheimer’s disease model mice,” *Neuroscience Letters*, vol. 545, pp. 81–85, 2013.
- [36] J. M. Peters, T. Hummel, T. Kratzsch, J. Lötsch, C. Skarke, and L. Frölich, “Olfactory function in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease: an investigation using psychophysical and electrophysiological techniques,” *American Journal of Psychiatry*, vol. 160, no. 11, pp. 1995–2002, 2003.
- [37] L. M. Kay, “Two species of gamma oscillations in the olfactory bulb: dependence on behavioral state and synaptic interactions,” *Journal of Integrative Neuroscience*, vol. 2, no. 1, pp. 31–44, 2003.
- [38] T. Imai, “Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb,” *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 35, pp. 180–188, 2014.
- [39] Z. Nusser, L. M. Kay, G. Laurent, G. E. Homanics, and I. Mody, “Disruption of GABA_A receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 86, no. 6, pp. 2823–2833, 2001.
- [40] C. E. Le Pichon, M. T. Valley, M. Polymenidou et al., “Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice,” *Nature Neuroscience*, vol. 12, no. 1, pp. 60–69, 2009.
- [41] L. M. Kay and P. Lazzara, “How global are olfactory bulb oscillations?,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 104, no. 3, pp. 1768–1773, 2010.
- [42] G. Lepousez, A. Mouret, C. Loudes, J. Epelbaum, and C. Viollet, “Somatostatin contributes to in vivo gamma oscillation modulation and odor discrimination in the olfactory bulb,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 3, pp. 870–875, 2010.
- [43] L. M. Kay, “Chapter 9 - Circuit Oscillations in Odor Perception and Memory,” *Progress in Brain Research*, vol. 208, pp. 223–251, 2014.
- [44] F. Peña-Ortega and R. Bernal-Pedraza, “Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations,” *International Journal of Peptides*, vol. 2012, Article ID 236289, 8 pages, 2012.
- [45] A. I. Gutiérrez-Lerma, B. Ordaz, and F. Peña-Ortega, “Amyloid beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms in vitro,” *International Journal of Peptides*, vol. 2013, Article ID 328140, 11 pages, 2013.

- [46] N. McNaughton, M. Ruan, and M. A. Woodnorth, "Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze," *Hippocampus*, vol. 16, no. 12, pp. 1102–1110, 2006.
- [47] N. Ravel, P. Chabaud, C. Martin et al., "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," *European Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 2, pp. 350–358, 2003.
- [48] A. A. Li, L. Gong, Q. Liu, X. Li, and F. Xu, "State-dependent coherences between the olfactory bulbs for delta and theta oscillations," *Neuroscience Letters*, vol. 480, no. 1, pp. 44–48, 2010.
- [49] A. Li, D. H. Gire, and D. Restrepo, "Y spike-field coherence in a population of olfactory bulb neurons differentiates between odors irrespective of associated outcome," *The Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 14, pp. 5808–5822, 2015.
- [50] C. L. Kiselycznyk, S. Zhang, and C. Linster, "Role of centrifugal projections to the olfactory bulb in olfactory processing," *Learning & Memory*, vol. 13, no. 5, pp. 575–579, 2006.
- [51] B. H. Singer, S. Kim, and M. Zochowski, "Binaral interaction and centrifugal input enhances spatial contrast in olfactory bulb activation," *European Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 2, pp. 576–586, 2007.
- [52] A. Nunez-Parra, R. K. Maurer, K. Krahe, R. S. Smith, and R. C. Araneda, "Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 36, pp. 14777–14782, 2013.
- [53] E. Flores-Martínez and F. Peña-Ortega, "Amyloid β peptide-induced changes in prefrontal cortex activity and its response to hippocampal input," *International Journal of Peptides*, vol. 2017, Article ID 7386809, 9 pages, 2017.
- [54] E. K. Mwilaria, C. Ghatak, and K. C. Daly, "Disruption of GABA_A in the insect antennal lobe generally increases odor detection and discrimination thresholds," *Chemical Senses*, vol. 33, no. 3, pp. 267–281, 2008.
- [55] K. R. Neville and L. B. Haberly, "Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat," *Journal of Neurophysiology*, vol. 90, no. 6, pp. 3921–3930, 2003.
- [56] B. Bathellier, S. Lagier, P. Faure, and P. M. Lledo, "Circuit properties generating gamma oscillations in a network model of the olfactory bulb," *Journal of Neurophysiology*, vol. 95, no. 4, pp. 2678–2691, 2006.
- [57] T. Cenier, F. David, P. Litaudon, S. Garcia, C. Amat, and N. Buonviso, "Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb," *European Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 5, pp. 921–930, 2009.
- [58] B. L. Osinski and L. M. Kay, "Granule cell excitability regulates gamma and beta oscillations in a model of the olfactory bulb dendrodendritic microcircuit," *Journal of Neurophysiology*, vol. 116, no. 2, pp. 522–539, 2016.
- [59] F. Pouille and M. Scanziani, "Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition," *Science*, vol. 293, no. 5532, pp. 1159–1163, 2001.
- [60] S. Nagayama, R. Homma, and F. Imamura, "Neuronal organization of olfactory bulb circuits," *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 8, p. 98, 2014.
- [61] C. De la Rosa-Prieto, D. Saiz-Sanchez, I. Ubeda-Banon, A. Flores-Cuadrado, and A. Martinez-Marcos, "Neurogenesis, neurodegeneration, interneuron vulnerability, and amyloid- β in the olfactory bulb of APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 10, p. 227, 2016.
- [62] D. Friedman and B. W. Strowbridge, "Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb," *Journal of Neurophysiology*, vol. 89, no. 5, pp. 2601–2610, 2003.
- [63] E. D. Adrian, "The electrical activity of the mammalian olfactory bulb," *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, vol. 2, no. 1-4, pp. 377–388, 1950.
- [64] W. Rall and G. M. Shepherd, "Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb," *Journal of Neurophysiology*, vol. 31, no. 6, pp. 884–915, 1968.
- [65] S. L. Bressler, "Changes in electrical activity of rabbit olfactory bulb and cortex to conditioned odor stimulation," *Behavioral Neuroscience*, vol. 102, no. 5, pp. 740–747, 1988.
- [66] W. J. Freeman, *Mass Action in the Nervous System (Vol 2004)*, Academic Press, New York, NY, USA, 1975.
- [67] D. R. Royall, L. K. Chiodo, M. J. Polk, and C. J. Jaramillo, "Severe dysosmia is specifically associated with Alzheimer-like memory deficits in nondemented elderly retirees," *Neuroepidemiology*, vol. 21, no. 2, pp. 68–73, 2002.
- [68] J. Djordjevic, M. Jones-Gotman, K. De Sousa, and H. Chertkow, "Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 29, no. 5, pp. 693–706, 2008.
- [69] D. P. Devanand, M. H. Tabert, K. Cuasay et al., "Olfactory identification deficits and MCI in a multi-ethnic elderly community sample," *Neurobiology of Aging*, vol. 31, no. 9, pp. 1593–1600, 2010.
- [70] P. W. Schofield, H. Ebrahimi, A. L. Jones, G. A. Bateman, and S. R. Murray, "An olfactory 'stress test' may detect preclinical Alzheimer's disease," *BMC Neurology*, vol. 12, no. 1, p. 24, 2012.
- [71] Q. Yu, P. Guo, D. Li et al., "Olfactory dysfunction and its relationship with clinical symptoms of Alzheimer disease," *Aging and Disease*, vol. 9, no. 6, pp. 1084–1095, 2018.
- [72] I. Ekström, S. Sjölund, S. Nordin et al., "Smell loss predicts mortality risk regardless of dementia conversion," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 65, no. 6, pp. 1238–1243, 2017.
- [73] A. M. Ward, M. Calamia, E. Thiemann, J. Dunlap, and D. Tranel, "Association between olfaction and higher cortical functions in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy older adults," *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, vol. 39, no. 7, pp. 646–658, 2017.
- [74] W. Birte-Antina, C. Ilona, H. Antje, and H. Thomas, "Olfactory training with older people," *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 33, no. 1, pp. 212–220, 2018.
- [75] O. Glachet, M. C. Gandolphe, K. Gallouj, P. Antoine, and M. El Haj, "Effects of olfactory stimulation on autobiographical memory in Alzheimer's disease," *Gériatrie et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillessement*, vol. 16, no. 3, pp. 311–320, 2018.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com

