

Para ver esta película, debe  
disponer de QuickTime™ y de  
un descompresor .

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**



**EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN OLFATIVA SOBRE LA PLASTICIDAD  
FENOTÍPICA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS Y DE LAS NEURONAS  
POSITIVAS A CALRETININA EN LA CAPA GLOMERULAR DEL BULBO  
OLFATORIO**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**  
**PRESENTA:**

**José Felipe Esquivelzeta Rabell**  
No. Cuenta 301501554

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina**  
**Investigador Titular "B" T.C.**  
**Departamento de Biología Celular y Fisiología**

**Septiembre 2009**  
**México, D.F.**



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.

## **Agradecimientos**

A Miguel ya que este trabajo fue posible por él, por ser un excelente amigo, profesor y colega.

A lo largo de mi estancia en el laboratorio fui construyendo mi forma de hacer ciencia y el tipo de científico que quiero ser, gracias a todos los que contribuyeron al trabajo y a mi formación (Miguel, Estela, Claudio, Marco, Olga, Denisse, Ivan, Lalo, Luis, miembros de mi laboratorio, Renan, Manuel, Amanda, Daniela, Viridiana, Daniel, Marcia, Rafael, Nayeli y todos aquellos que mi ingrata memoria no pudo recordar).

A a mi familia quien me sostuvo emocional, intelectual y monetariamente.

A Gabriel por la gran oportunidad de hacer ciencia y aprender.

**Aquel que posee ciencia y arte también tiene  
religión, aquel que no posee ambos tiene religión.**

**Johan Wolfgang von Goethe**

---

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Integrativa del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas con presupuesto otorgado por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (PAPIIT No. IN210105; IXTLI 372318701) y por el programa IMPULSA-02. La Fundación Lorena Alejandra Gallardo (FLAG) otorgó una beca para la realización de sus estudios de licenciatura. Fondos adicionales fueron obtenidos de proyectos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (38615N y 45872M).

En la presente tesis se hace un reconocimiento a la Maestra en Ciencias Químicas Patricia Padilla Cortés por el apoyo técnico-administrativo ofrecido durante el desarrollo del trabajo.

## INDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
<b>Antecedentes</b> .....	4
Notas sobre la plasticidad neuronal .....	4
Consideraciones sobre la plasticidad fenotípica neuronal .....	6
Plasticidad fenotípica neuronal y el Bulbo olfatorio .....	7
Generalidades sobre la anatomía del Bulbo olfatorio.....	9
<b>Objetivo</b> .....	14
<b>Hipótesis</b> .....	14
<b>Materiales y métodos</b> .....	15
Animales .....	15
Procedimiento de estimulación olfativa .....	15
<i>Condicionamiento operante olfativo</i> .....	16
<i>Habitación al lugar</i> .....	17
<i>Inyección de BrdU</i> .....	17
Obtención de las muestras .....	19
Inmunofluorescencias .....	19
Conteos celulares .....	20
<i>Conteos estereológicos</i> .....	20
<i>Conteos mediante Meander Scan</i> .....	21
Análisis estadístico.....	21
<b>Resultados</b> .....	23
Estimulación olfativa .....	23
Inmunofluorescencias .....	25
Conteos celulares .....	25
Meander Scan.....	27
<b>Discusión</b> .....	28
<b>Conclusiones</b> .....	31
<b>Referencias</b> .....	32
Anexo 1.....	35

## Resumen

La plasticidad neuronal es un proceso que permite al sistema nervioso reconfigurar los circuitos que lo constituyen. Una de las modalidades de este proceso se conoce como plasticidad fenotípica, y en parte se caracteriza por el cambio en la expresión del mensajero químico que identifica a cada neurona y que es considerado como el neurotransmisor principal en condiciones normales. En general, estas modificaciones son el resultado de exigencias microambientales.

El presente trabajo evaluó, mediante el uso de inmunofluorescencias y conteos estereológicos, los efectos de la estimulación sensorial olfativa sobre el fenotipo de dos de las principales subpoblaciones de interneuronas de la capa glomerular del bulbo olfatorio. Nuestros resultados muestran que las ratas adultas estimuladas durante 30 días presentan un aumento del número de interneuronas positivas para calretinina. Este cambio no fue documentado en ratas estimuladas por 90 días. La modificación descrita no involucró a las neuronas generadas *de novo* pues su número no fue alterado por la manipulación experimental en ninguno de los periodos evaluados. Los cambios celulares reportados no se relacionan directamente con la estimulación olfativa o proceso de condicionamiento, pues dichos cambios también fueron observados en los animales que no fueron expuestos al estímulo olfativo pero fueron habituados al lugar. De esta forma, los resultados presentados sugieren que las interneuronas periglomerulares preexistentes inmunoreactivas para calretinina son capaces de experimentar una plasticidad fenotípica transitoria ante condiciones ambientales cambiantes.

## Introducción

En el cerebro se asientan los procesos senso-perceptuales y motores que permiten la interacción de los organismos con el medio ambiente. Uno de los requerimientos para la consecución de esta interacción es que el organismo adquiera información del ambiente circundante. Los sistemas biológicos llevan a cabo esta tarea a través de los órganos de los sentidos. Es la interpretación de la información sensorial lo que permite la integración y generación de respuestas conductuales. La conducta, sin embargo, está lejos de ser estereotipada, incluso aquella considerada como innata. De hecho, la conducta es una expresión individual, actualizada y modificada constantemente dependiendo del contexto inmediato del organismo y de sus experiencias pasadas. De esta manera, la flexibilidad conductual pudiese ser el reflejo de la flexibilidad anatomo-funcional de los sistemas sensoriales.

En concordancia con la idea expresada anteriormente, muchos estudios han mostrado que la flexibilidad o también denominada plasticidad neuronal puede observarse en distintos niveles de organización a lo largo de las vías sensoriales (Kandel, 2000). Así, se han reportado modificaciones mayores en la expresión genética como respuesta a cambios en los estímulos ambientales. A nivel sináptico, fenómenos como la facilitación, la potenciación y la depresión sináptica permiten a las neuronas modificar minuto a minuto, y con base en su estado funcional previo, la transferencia de información entre los elementos sensoriales que constituyen a los circuitos correspondientes. Los cambios plásticos no solo tienen una expresión funcional sino también anatómica. Por ejemplo, el crecimiento o acortamiento de los procesos axónicos y dendríticos, así como la disminución o aumento del número de sinapsis eléctricas o químicas, son respuestas plásticas comúnmente documentadas en los circuitos neuronales sensoriales (Kandel, 2000).

En años recientes, se han descrito otros mecanismos que podrían conducir a un cambio plástico en las vías sensoriales del sistema nervioso. De ellos, la restitución de poblaciones neuronales a través de procesos de neurogenesis, la transdiferenciación de precursores neurales y la plasticidad del fenotipo de las neuronas preexistentes son quizás las posibilidades más interesantes por su importancia biológica y su potencial terapéutico. En el presente trabajo evaluamos la tercera de estas posibilidades utilizando como modelo al bulbo olfatorio (BO) debido a que esta zona del cerebro muestra una capacidad plástica muy alta, a que prácticamente la totalidad de los mecanismos plásticos descritos ocurren en él, y a que en fechas recientes se ha

mostrado que en pacientes con enfermedad de Parkinson el número de células dopaminérgicas incrementa en esta estructura, sin que se conozca el mecanismo. Si bien es probable que este último cambio sea el producto de modificaciones de los procesos de diferenciación de células generadas de *novo*, también es posible que sea la expresión de la plasticidad fenotípica de las neuronas preexistentes. Es por ello que evaluamos esta última posibilidad en el BO de la rata adulta mediante un modelo de estimulación olfativa. En el presente trabajo, los conteos estereológicos de interneuronas pertenecientes a dos de los linajes principales de las células periglomerulares, mostraron un aumento transitorio del número de interneuronas que expresan calretinina (CR) a los 30 días de iniciada la estimulación. Esta observación no se repitió a los 90 días. Debido a que los cambios descritos no afectaron a las neuronas recién integradas ni se asociaron con la estimulación olfativa solamente, los resultados indican que las neuronas preexistentes del BO son capaces de experimentar estados de plasticidad fenotípica transitorios ante condiciones ambientales cambiantes.

## **Antecedentes**

### **Notas sobre la plasticidad neuronal**

Una de las características más notables de los organismos vivos es la capacidad para generar modificaciones de su estructura y de sus funciones en respuesta a los cambios de las condiciones fisiológicas del medio interno, y de aquellas físicas y ecológicas del medio externo, sin que dichas modificaciones pongan en riesgo su vida. En términos generales, a esta capacidad de reorganización se le ha denominado plasticidad. Si bien la plasticidad es una propiedad de todos los sistemas biológicos, es en el estudio del cerebro en el que quizás se ha utilizado más el término. El cerebro, como la fuente de la conducta, es moldeado por cambios y presiones del medio ambiente, por modificaciones fisiológicas y por la experiencia (Pascual-Leone *et al.*, 2005).

William James (1890) fue el primero en introducir el término plasticidad al campo de la psicología refiriéndose a la susceptibilidad de modificar la conducta humana. El primer investigador en adoptar formalmente el término de plasticidad neuronal para el sistema nervioso central fue el español Santiago Ramón y Cajal. En 1914, Cajal reconoció en su libro “Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del Sistema Nervioso” que los axones de neuronas centrales tenían propiedades plásticas, pero sólo en circunstancias restringidas (Pascual-Leone *et al.*, 2005).

La plasticidad cerebral se define actualmente de manera general como la capacidad del cerebro para cambiar su estructura y su función a lo largo de la ontogenia del individuo. Los cambios plásticos del cerebro involucran varios niveles de organización que van desde las moléculas a los sistemas, y afectan no solo a los elementos neuronales sino también a aquellos de soporte como las células gliales o los vasos sanguíneos (Lledo, Alonso y Grubb, 2006). Los mecanismos de plasticidad en el sistema nervioso pueden involucrar cambios mayores en la morfología y función neuronal tanto a nivel individual como colectivo, y desde el nivel sináptico hasta el regional.

A nivel de la sinapsis, son dos los mecanismos a través de los cuales éstas pueden modificarse funcionalmente, a saber, la facilitación y la depresión sinápticas. El que un cambio inducido en la transmisión sináptica sea una facilitación o una depresión sináptica depende principalmente: 1) del tipo y la frecuencia de estimulación aplicada sobre la terminal nerviosa, 2) de la magnitud del cambio en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y 3) de las cascadas enzimáticas activadas en la neurona postsináptica



(Mayford, 2007). A nivel celular, la plasticidad se expresa como cambios de la morfología celular, por ejemplo, al elongar o ramificar el axón o las dendritas. También sucede a nivel molecular en el que gracias a la actividad neuronal se modifica la expresión genética y se producen cascadas de señalización que pueden resultar en modificaciones de los receptores en membrana (Mayford, 2007). A nivel del circuito, podemos observar cambios plásticos en el número de elementos (ya sea por muerte celular o por neurogénesis), aunado a los cambios morfológicos, sinápticos y funcionales a nivel celular los cuales producen un cambio en la forma y en ocasiones, en la función del circuito.

Una de las ideas que ha permanecido por largo tiempo es que la actividad neuronal asociada con la experiencia sensorial o con la actividad física promueve el crecimiento neuronal y la formación y consolidación de sinapsis. De hecho, se cree que aquellos axones, dendritas y sinapsis que no se utilizan se perderán irremediamente a lo largo de la ontogenia (Yuste y Sur, 1999). El impacto de esta idea ha sido tal, que el enriquecimiento ambiental, la estimulación temprana y la actividad física entre otros son considerados por los psicólogos, pedagogos y neurofisioterapeutas como procedimientos útiles para promover el crecimiento neuronal e incrementar el número de sinapsis, tanto en los cerebros de infantes y adolescentes durante la ontogenia normal, como en pacientes pediátricos y adultos que sufren deficiencias neurológicas de diversa índole (Duffau, 2006).

Existen al menos cuatro argumentos que fundamentan la visión de la plasticidad como un proceso para generar compensaciones y ajustes morfofuncionales que permiten una mejor adaptación del organismo a su entorno. El primero de ellos, se relaciona con la idea de que los rasgos fenotípicos y sus modificaciones poseen un valor intrínsecamente adaptativo. El segundo se apoya en la evidencia clínica y experimental que parece sugerir que la recuperación funcional neuronal después de un daño sufrido o infringido al sistema nervioso o cuerpo, ayuda a compensar las funciones nerviosas erosionadas o perdidas. El tercer argumento se basa en estudios de individuos que perdieron una de sus modalidades sensoriales y que muestran una aparente mejora de las habilidades sensoriales relacionadas con los órganos de los sentidos que se suponen intactos. Finalmente, el cuarto argumento se relaciona con las ideas que se tienen sobre los mecanismos que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria.

A pesar de los argumentos y evidencias que apoyan la idea de que la plasticidad neuronal juega un papel importante en la adaptación de los organismos a su entorno, existen diversos ejemplos que nos indican que la plasticidad neuronal no posee necesariamente un carácter adaptativo intrínseco (Pascual-Leone *et al.*, 2005).

Como se puede ver, la relación entre la modificación conductual (William James) y la plasticidad cerebral (Santiago Ramón y Cajal) no es de uno a uno. Por lo tanto, dependiendo de las circunstancias, es posible que la plasticidad no confiera un cambio perceptible en las eferencias del cerebro, promueva cambios demostrados bajo determinadas circunstancias, o cause cambios conductuales negativos para el funcionamiento normal del individuo. Puede haber una pérdida de una capacidad conductual, aparición de conductas inhibidas, reorganización funcional de circuitos cercanos, o finalmente, la emergencia de conductas dañinas (Pascual-Leone *et al.*, 2005). Las características y consecuencias de los cambios plásticos del cerebro son diversas y algunas de ellas aún desconocidas.

### **Consideraciones sobre la plasticidad fenotípica neuronal**

La plasticidad fenotípica en el sistema nervioso a nivel celular puede definirse como la habilidad que presentan las neuronas maduras para modificar sus rasgos morfológicos y fisiológicos en respuesta a condiciones microambientales cambiantes generalmente asociadas con las alteraciones en los patrones de activación aferente, las relaciones tróficas entre las neuronas y sus órganos blanco, o de la disponibilidad de hormonas, citocinas y otros factores solubles endocrinos y paracrinós. En general, las modificaciones referidas resultan de alteraciones en la expresión de genes (Halayko *et al.*, 2008), y conducen a cambios transitorios o permanentes del tipo de neurotransmisor originalmente producido por la extirpe neuronal afectada (Cao *et al.* 1996). A continuación se describen algunos ejemplos que ilustran este tipo de mecanismo de plasticidad neuronal.

Los estudios realizados por Gómez-Lira *et al.* (2005) en el hipocampo de la rata mostraron que la activación simultánea de receptores glutamatérgicos y de receptores asociados a tirosina cinasa (TrkB) en un grupo de neuronas granulares glutamatérgicas, induce la expresión de un fenotipo GABAérgico en estas neuronas. La expresión del fenotipo dual por parte de las neuronas granulares no depende del periodo del desarrollo ni de la incorporación de neuronas nuevas, por lo que su origen está relacionado con la plasticidad fenotípica de las neuronas preexistentes por

factores ambientales.

Calas *et al.* (1994) encontraron que las neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular de roedores, son capaces de sintetizar y liberar simultáneamente oxitocina, vasopresina y galanina cuando son estimuladas mediante retos osmóticos o como consecuencia de la activación de terminales nerviosas localizadas en los pezones durante la succión asociada con la lactancia. Sin embargo, en condiciones normales, estos péptidos son sintetizados por diferentes grupos de neuronas magnocelulares.

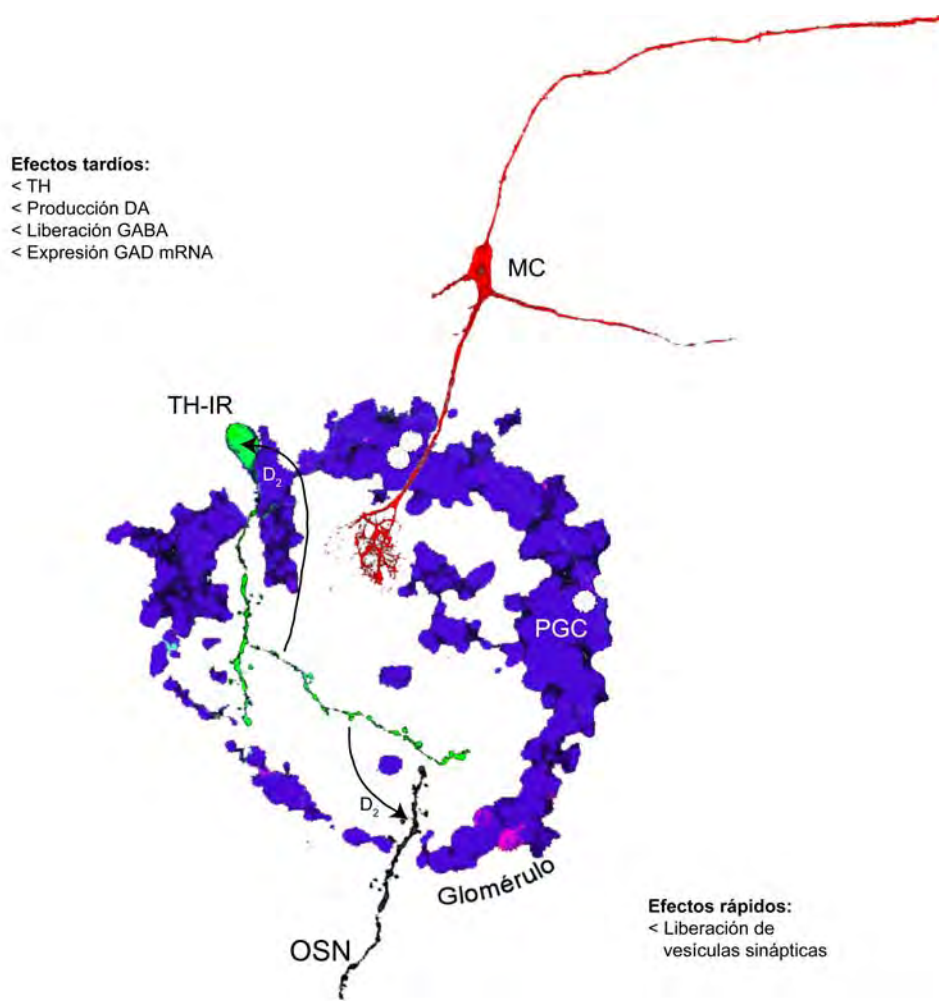
Finalmente, también se ha documentado que si bien las neuronas ganglionares dorsales expresan *in situ* diversos neuropéptidos como calcitonina, sustancia P, colecistoquinina y neuropéptido Y, estas mismas células expresan serotonina, hormona estimulante de la tiroides y GABA cuando son cultivadas. Dichas observaciones sugieren que la definición y plasticidad de su fenotipo depende de las condiciones ambientales (Chauvet, Drian y Privat, 1995).

### **Plasticidad fenotípica neuronal y el Bulbo olfatorio**

El bulbo olfatorio (BO) es una de las regiones cerebrales que muestra mayor plasticidad. Los circuitos de esta estructura son remodelados constantemente a través de la restitución de algunos de los elementos neuronales que los conforman. Por ejemplo, las aferentes olfativas primarias nacen en células neuroepiteliales receptoras especializadas que se encuentran en la mucosa olfatoria en el techo de la cavidad nasal (Astic y Saucier, 2001). Dichas células receptoras se recambian frecuentemente a través de un proceso coordinado que involucra la muerte de ellas y la consecuente sustitución de las células muertas mediante la incorporación de elementos celulares nuevos. Con la muerte de las células receptoras preexistentes, las aferentes correspondientes son también eliminadas por lo que las nuevas células receptoras deben dar origen a aferentes que crezcan hacia el BO en sustitución de las previamente removidas. Un fenómeno semejante ocurre en el interior del BO en el que las poblaciones de interneuronas, conocidas como granulares o glomerulares, son constantemente renovadas por medio de la proliferación de precursores neuronales originados en la zona subventricular de los ventrículos laterales y el ventrículo olfatorio, y por la migración subsecuente de los neuroblastos hacia las capas granular y glomerular del bulbo. Si bien en general se piensa que ambos fenómenos de remodelación están relacionados y concertados, esta idea aún espera ser confirmada.

Tampoco sabemos si todos los subtipos de células receptoras, neuronas glomerulares y neuronas granulares son sujetas a este recambio, aunque existen datos que apoyan un mayor o menor recambio de acuerdo a la edad en distintas subpoblaciones de neuronas granulares olfativas (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). Podría esperarse que existan grupos de interneuronas olfativas cuyo recambio es muy bajo o inexistente, lo cual no sería sorprendente ya que no existe evidencia de que las neuronas de proyección del BO sean renovadas. ¿Cuál sería la opción de plasticidad para estas células de poco o nulo recambio? La plasticidad fenotípica podría ser una respuesta adecuada. A través de redefinir transitoria o permanentemente sus fenotipos, estas células preexistentes de bajo o nulo recambio podrían constituir una memoria de la experiencia olfativa previa que pudiera utilizarse para dirigir la diferenciación de los elementos integrados *de novo*, actualizando así las funciones sensoriales de los circuitos olfativos.

En este contexto, existen dos subpoblaciones de interneuronas glomerulares que podrían ser blancos susceptibles para desarrollar plasticidad fenotípica con el fin descrito anteriormente. El primero de ellas corresponde al subtipo que expresa la proteína calretinina (CR-IR) la cual es una proteína de regulación de calcio. En otros circuitos neuronales, se ha sugerido que este subtipo de interneurona podría modular el proceso de facilitación sináptica necesario para el desarrollo de conductas de aprendizaje y memoria (Schurmans *et al.*, 1997). Por otro lado, las interneuronas dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa – inmunoreactivas, TH-IR) glomerulares inhiben presinápticamente la transmisión de información olfativa por parte de las aferentes primarias (ver figura 1) (Maher y Westbrook, 2008). Dado que el efecto es inhibitorio, un incremento en el número de estas células podría explicar la anosmia observada en pacientes con enfermedad de Parkinson (Doty y Risser, 1989; Hsia, Vincent y Lledo, 1999; Huisman *et al.*, 2004; Berkowicz y Trombley, 2000)



**Figura 1:** Efectos presinápticos de la dopamina en el procesamiento olfativo. La dopamina liberada por las neuronas periglomerulares (PGC en azul) se difunde en el espacio extrasináptico a los receptores D2 ubicados en las terminales del nervio olfatorio (OSN) y a autoreceptores en el soma de las neuronas PGC. Lo anterior produce una reducción de la liberación de vesículas y disminución de la actividad de las neuronas mitrales (MC). A largo plazo disminuye la expresión de TH y de la glutamato descarboxilasa (GAD), lo cual reduce GABA en las neuronas PGC y produce un aumento de la actividad sináptica entre el nervio y las neuronas mitrales (adaptado de Berkowicz y Trombley, 2000).

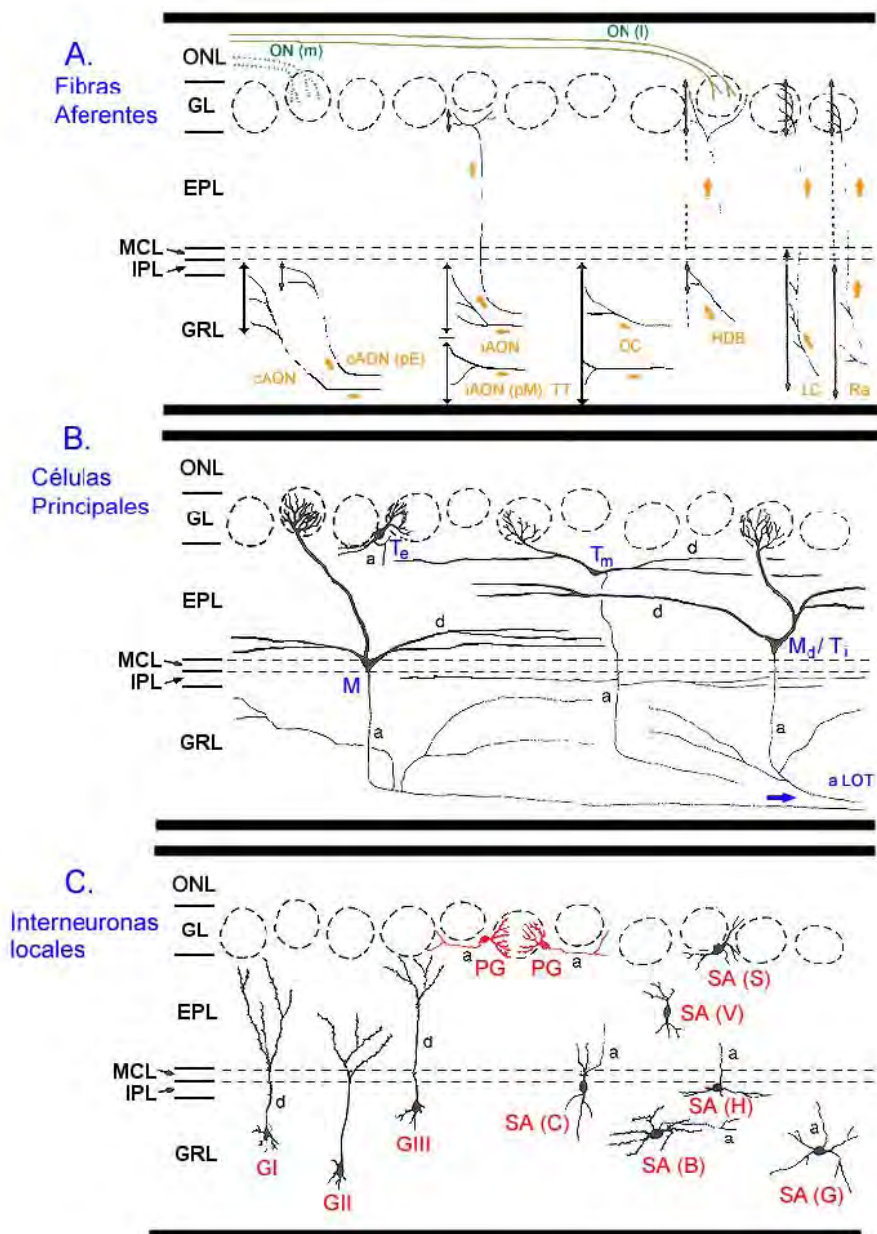
Con base en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue el de evaluar si la activación neuronal crónica conduce a un cambio en el fenotipo de las interneuronas positivas para calretinina o para tirosina hidroxilasa, la enzima limitante de la vía de síntesis de la dopamina.

### Generalidades sobre la anatomía del Bulbo olfatorio

El sistema olfativo está constituido por un conjunto de estructuras y vías nerviosas responsables de transducir señales moleculares a potenciales de acción a partir de los cuales se genera la experiencia olfativa. De esta forma, la entrada sensorial primaria está dada por los axones de las neuronas sensoriales olfatorias (OSN), cuyo neurotransmisor principal es el glutamato. En mamíferos, entre seis y diez

millones de ellas forman un neuroepitelio o mucosa olfatoria (Firestein, 2001), que recubre una serie de láminas cartilaginosas situadas en la parte superior de la cavidad nasal, llamadas turbinas. Si bien la estructura de la mucosa olfatoria aparenta ser homogénea, las células que la forman muestran una gran heterogeneidad molecular con relación a los receptores que expresan. Las OSN de la mucosa olfatoria poseen cilios en cuya superficie se localizan los receptores odoríferos, los cuales pertenecen a una gran familia multigénica cuyos miembros codifican en la rata para aproximadamente 1000 subtipos (Buck y Axel, 1991). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Topográficamente, la mucosa olfatoria puede ser dividida en cuatro cuadrantes dependiendo del tipo de receptor que expresan las OSN (Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993).

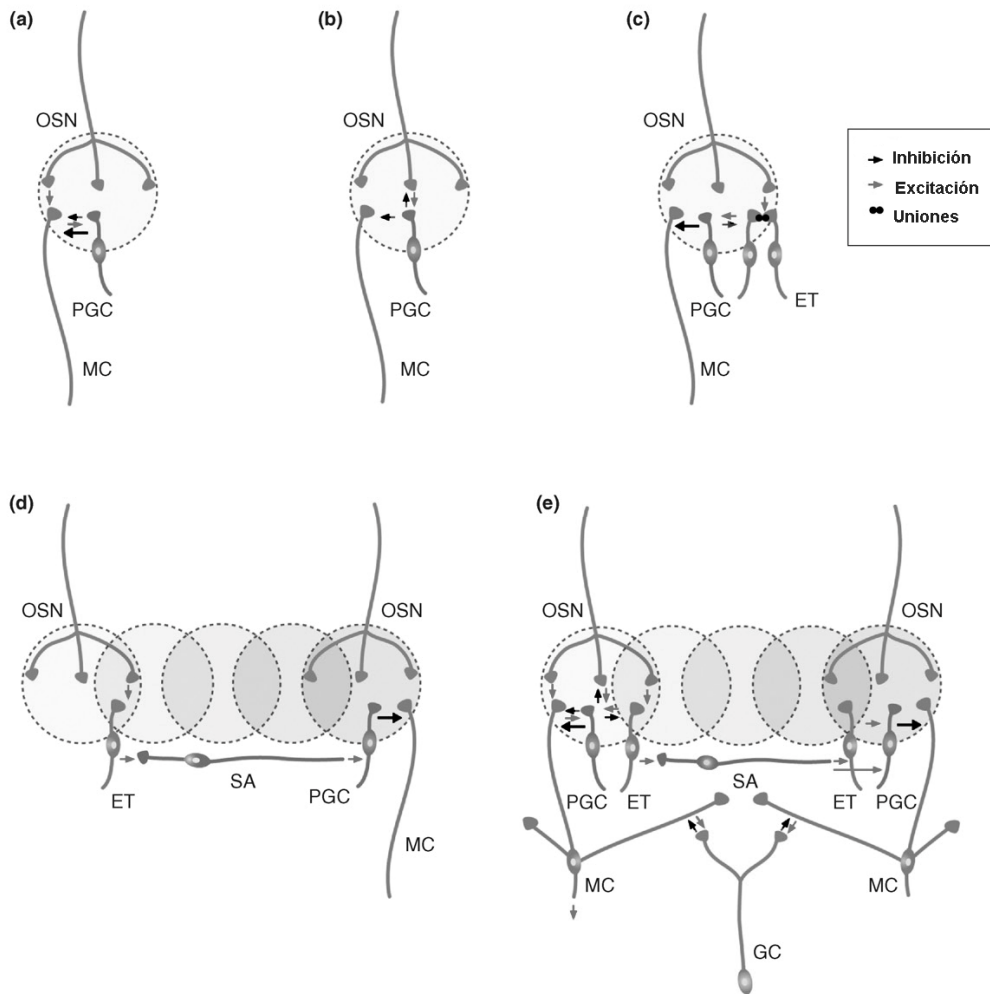
Una vez que los axones de las OSN atraviesan la lámina basal del neuroepitelio olfatorio, atraviesan la lámina cribosa, entran al BO y llegan a los glomérulos olfatorios (~2000 glomérulos; ver fig. 2A) para formar parte de los mismos. Los glomérulos son estructuras esféricas ricas en neuropilo que tienen entre 40 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro que, además de recibir a la aferencia sensorial primaria, contienen las dendritas apicales de las neuronas mitrales. Los axones de las OSN no contactan a cualquier glomérulo sino que proyectan de manera específica a ciertos glomérulos, en los que incluso el RNA mensajero de su subtipo de receptor se expresa.



**Figura 2** Esquema de los elementos neuronales del BO de mamíferos identificados como fibras aferentes, células principales e interneuronas locales. Abreviaturas para las capas: ONL, capa del nervio olfatorio; GL, capa glomerular; EPL, capa plexiforme externa; MCL, capa de células mitrales; IPL, capa plexiforme interna; GRL, capa granular. Cada uno de los elementos se describe en el texto (adaptado de (Shepherd y Greer, 1998).

Alrededor de los glomérulos se encuentra un grupo heterogéneo de neuronas que en conjunto se conocen como neuronas yuxtglomerulares (JGC). Las JGC se clasifican en tres tipos distintos de neuronas: 1) células periglomerulares (PGC); 2) células superficiales de axón corto y 3) células en penacho externas. De las JGC, las PGC y las células en penacho externas mandan dendritas hacia el interior de los glomérulos, mientras que las células superficiales de axón corto mandan sus dendritas

hacia la región glomerular, mas no hacia los glomérulos (figura 3d y e).



**Figura 3:** Esquema de los microcircuitos glomerulares. En a) OSN → MC → PGC; b) OSN → PGC → MC; c) OSN → ET → PGC → MC. En d) y e) se muestran circuitos interglomerulares; d) OSN → ET → SA → PGC → MC; Y e) MC → GC → MC. OSN: neurona sensorial olfatoria; MC: neurona mitral; PGC: neurona periglomerular; GC: neurona granular; ET: neurona en penacho ; SA: neuronas de axón corto (Lledo, Merkle y Álvarez-Buylla, 2008).

Las PGC son interneuronas con tamaño similar a las neuronas granulares (GRC; 6-8  $\mu\text{m}$  de diámetro). Cada PGC posee una pequeña y tupida dendrita que arboriza dentro de un glomérulo; siendo muy raras las PGC que inervan a dos glomérulos. Sus ramas dendríticas se conectan con otras PGC, las terminales de los axones olfatorios o las ramas de las células mitrales y en penacho (figura 2C, 3c, d y e). El axón de las PGC se distribuye lateralmente dentro de regiones extraglomerulares, extendiéndose hasta aproximadamente cinco glomérulos posteriores.

Las PGC son neuronas GABAérgicas que presentan una gran heterogeneidad química y anatómica (Panzanelli *et al.*, 2007). Se han descrito once sustancias



presentes en ellas (Kishimoto *et al.*, 1993; Kosaka *et al.*, 1995; Brinon *et al.*, 1998; Gutierrez-Mecinas *et al.*, 2005; Kosaka y Kosaka, 2005), siete neuroactivas (GABA, dopamina, encefalina, hormona liberadora de la tirotropina, óxido nítrico, somatostatina y colecistoquinina), y cuatro proteínas que unen calcio (calbindina, calretinina, neurocalcina y parvalbúmina). Del total de PGC, 87% expresan GAD67 y 74% pueden ser clasificadas químicamente en tres grupos distintos con poco traslape entre ellos: 1) PGC positivas a calretinina (CR; 44%), 2) PGC positivas a tirosina hidroxilasa (TH;16%) y 3) PGC positivas a calbindina (14%) (Panzanelli *et al.*, 2007).

Así como las PGC son heterogéneas químicamente, también lo son estructuralmente. Para ilustrar lo anterior se puede mencionar que: 1) el número y extensión de ramificaciones dendríticas varía entre ellas; 2) los sitios en donde establecen contactos sinápticos intraglomerulares pueden estar localizados sobre los axones de las OSN y sobre las dendritas de las células mitrales (tipo 1), o exclusivamente sobre las dendritas de las células (tipo 2) (Kosaka *et al.*,1998); y finalmente, 3) pueden o no formar uniones estrechas con las dendritas de las células mitrales y en penacho.

Es importante destacar que la heterogeneidad química y estructural de las PGC, se traduce en heterogeneidad fisiológica, aunque podríamos decir que de forma general las PGC inhiben principalmente la sinapsis entre el axón de las OSN y las células mitrales (primer sinapsis de la vía olfativa).

Después del procesamiento dentro del circuito glomerular, la salida de información del BO está dada por los axones de las células mitrales y las células en penacho, ambas glutamatérgicas (figura 2B). En mamíferos, los somas de las células mitrales se localizan en una lámina delgada (capa de las células mitrales). Cada célula mitral origina una dendrita primaria la cual atraviesa la capa plexiforme externa (EPL) y termina dentro de un glomérulo elaborando un penacho. Las células en penacho están localizadas más superficialmente en la EPL (figura 2B). Todas ellas tienen en común una dendrita primaria que termina dentro de un glomérulo elaborando un penacho relativamente limitado. Además sus axones también constituyen una fracción del tracto olfatorio lateral junto a los axones de las células mitrales que forman una fracción vecina.

Debajo de la capa de células mitrales se encuentra una capa gruesa que contiene los somas de las células granulares (figura 2C), las cuales se encargan de inhibir a las células mitrales y a las células en penacho contribuyendo en los procesos

de discriminación sensorial (figura 3e). Las células granulares (GRC) poseen un proceso superficial que se extiende radialmente a través de la superficie y se ramifica y termina en la EPL. Las GRC poseen otro proceso que se ramifica discretamente dentro de la capa granular. Existe una diversidad de subtipos de las GRC, sin embargo todas poseen la característica notable de la ausencia de axón. Las GRC son GABAérgicas y glicinérgicas; su principal función es inhibir a las células mitrales.

Finalmente, en mamíferos cada BO contiene dos mapas glomerulares simétricos en forma de espejo; los glomérulos isofuncionales en cada hemisferio se conectan a través de una serie de proyecciones recíprocas intrabulbares para formar un mapa intrabulbar. Marks *et al.* (2006) mostraron, mediante el uso de modelos de privación sensorial, que el establecimiento del mapa intrabulbar no requiere de la actividad sensorial, pero que esta actividad sensorial es crucial para el refinamiento del mapa intrabulbar.

## **Objetivo**

Evaluar los efectos de la actividad sensorial crónica sobre el fenotipo de las interneuronas periglomerulares preexistentes inmunopositivas para calretinina y TH en ratas adultas.

## **Hipótesis**

La estimulación sensorial crónica olfativa conducirá a un cambio en las proporciones de las interneuronas periglomerulares positivas a CR y TH preexistentes en el área específica del Bulbo olfatorio que procesa dicho odorante.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Para realizar los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (90 días de edad) provenientes de la colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los animales se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación (12 horas luz / 12 horas oscuridad) controladas y tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*, con excepción de los grupos de ratas sometidas a la habituación al lugar y al condicionamiento operante (ver abajo). Las ratas se dividieron en tres grupos. El grupo control (C) se constituyó por ratas que no fueron sujetas a manipulación experimental alguna. El segundo grupo control, denominado grupo de habituación al lugar (H), estuvo conformado por ratas que sólo fueron trasladadas al aparato de condicionamiento. Finalmente, el tercer grupo se conformó por ratas entrenadas y condicionadas para resolver la tarea olfativa diseñada, a este grupo se le denominó grupo experimental o de exposición al odorante (E). El manejo de los animales y los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión de Ética para la Experimentación con Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y siguieron la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH).

### **Procedimientos de estimulación olfativa**

El sentido del olfato es capaz de habituarse rápidamente ante cualquier estímulo, y a su vez, se caracteriza por sufrir una activación de sus circuitos de manera directamente proporcional a la concentración del estímulo. Es debido a lo anterior que para poder evaluar los efectos de una estimulación crónica (estimulación breve y periódica durante 30 o 90 días) y específica, necesitamos de una herramienta metodológica que nos permitiera utilizar un estímulo a bajas concentraciones para aumentar la especificidad de la activación y a su vez que eliminara el riesgo de una habituación y por consiguiente, el cese de la detección del estímulo. Un modelo conductual de estimulación olfativa nos permitió estimular a bajas concentraciones, durante un periodo de tiempo y con la certeza de que estaba siendo detectado a lo largo del procedimiento de estimulación. Por lo tanto, para poder tener un correlato conductual de la activación del BO, se sometió a las ratas E (n=20) a un proceso de habituación de lugar aunado a una prueba de aprendizaje basada en el condicionamiento operante.

Para evaluar el efecto de la estimulación olfativa sobre las poblaciones neuronales, a corto y a largo plazo, los grupos H (n=20) fueron habituados y los grupos E fueron habituados y estimulados; ambos a lo largo de 30 o 90 días para posteriormente ser sacrificados.

Previo al condicionamiento de las ratas E, se llevó a cabo una semana de habituación durante la cual se redujo la cantidad de agua suministrada a los animales paulatinamente, sólo permitiéndoles beber agua durante 15 minutos por la tarde con el propósito de asociar posteriormente el estímulo odorante (hexanal) con el agua como reforzador. Se eligió el hexanal como estímulo debido a que Xu *et al.* (2003) describieron mediante fMRI de alta resolución el mapa de activación glomerular del hexanal, lo cual nos permitió delimitar la zona del BO en la que analizaríamos las poblaciones de interés.

Para llevar a cabo los procedimientos conductuales se utilizó un laberinto de acrílico de 80x80x30cm (esquemático en la figura 4b), ubicado en un cuarto aislado y con ventilación constante. El laberinto consta de un pasillo principal con tapa removible y cuatro brazos paralelos perpendiculares al pasillo principal cerrados con compuertas. El pasillo principal también tiene un sistema de ventilación constante, además de un sistema propio de extracción.

#### *Condicionamiento operante olfativo*

El condicionamiento olfativo consistió en privar a las ratas de agua para poder utilizar a este líquido como un reforzador positivo y asociar paulatinamente el hexanal a la conducta de búsqueda y detección del mismo. El esquema de condicionamiento consistió en que cada rata llevó a cabo tres sesiones diarias durante seis días a la semana bajo condiciones de oscuridad. En cada sesión se seleccionó aleatoriamente un brazo del laberinto para colocar un tubo eppendorf cerrado con una solución de 0.2% de hexanal en aceite mineral en la pared cercana a la compuerta, así como 1 mL de agua natural en una caja Petri al fondo del mismo brazo. En el resto de los brazos se colocaron tubos con aceite mineral, así como cajas Petri vacías. Momentos antes de que la rata accediera al pasillo principal, se abrió la tapa del tubo que contenía al aldehído y se cerraron las compuertas de los brazos. Una vez en el pasillo, se permitió que la rata explorara el pasillo por un lapso de un minuto. Transcurrido ese tiempo se entreabrieron simultáneamente las compuertas permitiendo que la rata introdujera su nariz y olfateara el interior de cada uno de los brazos. Cuando finalizó el tiempo de estabilización en el pasillo principal, se permitió que la rata eligiera uno de los cuatro

pasillos permitiéndole el acceso al mismo y la obtención del reforzador en el caso de acertar al pasillo que contenía el mismo o de su omisión si la rata elegía un brazo incorrecto. Todos los brazos se abrían al acabar el tiempo de estabilización en el pasillo principal. Se registraron la latencia y el número de errores por sesión y por rata. Considerábamos un error cuando la rata entraba a alguno de los pasillos sin el estímulo y el tiempo de latencia se media desde que se abrían las compuertas hasta que la rata bebiera el agua.

Para asegurar que las ratas detectaban el olor, realizamos una serie de procedimientos de manera ocasional y aleatoria. El primero consistió en presentar el estímulo en un brazo que no contuviera agua, en el segundo ningún brazo contenía agua, y en el tercero no se presentaba el hexanal. Para el primer y segundo procedimiento, la rata siempre mostraba una preferencia por el brazo que contenía el olor, y en el caso del tercer procedimiento la rata no mostraba una preferencia.

#### *Habitación al lugar*

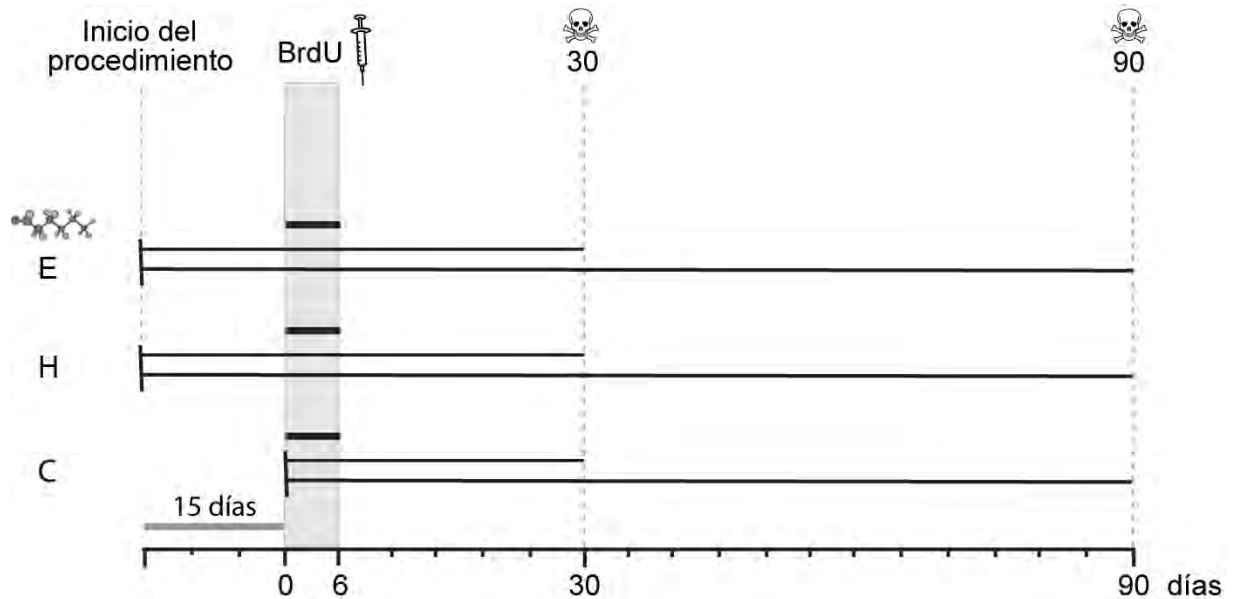
Las ratas H fueron sometidas a las mismas condiciones ambientales, con excepción de la estimulación con hexanal, es decir, la rata se colocó en el pasillo principal durante un minuto durante el cual se entreabrieron las compuertas para que pudiera insertar su nariz y olfateara el interior de los brazos. Al finalizar el minuto se abrió la compuerta del brazo frente a la cual se localizaba la rata en ese instante y se inició la cuenta del cronómetro para medir la latencia y medir el número de errores. Todos los brazos contenían tubos con aceite mineral.

#### *Inyección de BrdU*

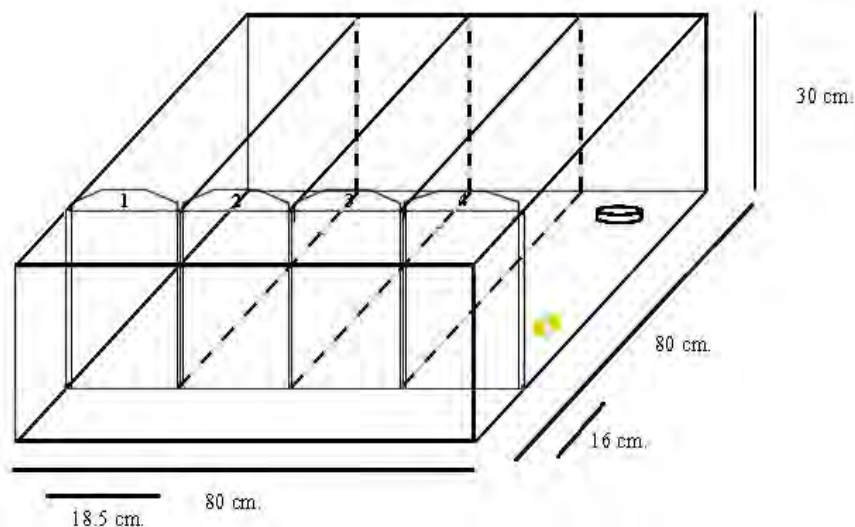
La 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) es un análogo de la base nitrogenada timidina el cuál se incorpora al material genético en la fase S del ciclo celular. La BrdU puede ser detectada mediante reacciones inmunohistoquímicas que permiten detectar a las células que sufrieron un proceso de división celular.

Después de los primeros 15 días de aprendizaje de la tarea, se inyectó BrdU intraperitonealmente (ip) durante seis días consecutivos a una dosis de 50mg/Kg. Los animales fueron sacrificados después de 30 ó 90 días después de la última inyección (ver figura 4a). La elección de estos tiempos se basó en el hecho de que estudios previos han mostrado que el pico de incorporación de nuevas interneuronas a los circuitos glomerulares ocurre un mes después de aplicada la última inyección de BrdU. A los noventa días, el número de neuronas nuevas marcadas con BrdU disminuye a los niveles basales y se conserva así hasta por seis meses (Winner *et al.*, 2002).

a)



b)



**Figura 4** a) Diseño experimental. En el primer esquema podemos observar los grupos controles (C y H) y estimulado (E), cada uno conformado por grupos de 30 y 90 días. Al grupo E y al grupo H se les sometió a la tarea conductual con la particularidad de que al grupo E se le presentó el hexanal junto con el agua. Después de la intervención se realizaron inmunofluorescencias, análisis estereológicos y el meander scan.

La barra gris representa los tiempos en los que se inyectaron a las ratas y los cráneos representan el sacrificio días después de la última inyección de BrdU (30 y 90 días). Las inyecciones de BrdU comenzaron después de dos semanas de estimulación.

b) Diagrama de la caja de acrílico utilizada para los experimentos de condicionamiento olfativo. La caja cuenta con un pasillo principal y cuatro brazos paralelos que se conectan al pasillo principal de forma perpendicular. Los cuatro brazos se separan del pasillo principal mediante puertas deslizables. Los cuatro compartimientos tienen una cubierta superior removible que soportaba el sistema purificador de aire que continuamente inyectaba y extraía el aire desde ubicaciones contrarias dentro del pasillo principal (no se muestra). Los tubos eppendorf se colocaron en la cara derecha de cada pared divisoria entre los brazos, y las cajas petri se colocaban al final de cada brazo.

## **Obtención de las muestras**

Animales de 120 ó 150 días de edad fueron anestesiados con pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso corporal) y sometidos a perfusión intracardiaca retrógrada, mediante la cual se lavó el sistema sanguíneo con 0.15M NaCl y posteriormente se fijó el tejido con 4% paraformaldehído disuelto en buffer de fosfatos (4% PFA en 0.1M PB) pH 7.4. Los animales fueron decapitados y los cerebros cuidadosamente removidos para evitar dañar los bulbos olfatorios. Se realizó un corte coronal con navaja de costilla a la altura de bregma para obtener la parte frontal de los cerebros, los cuales fueron colocados en viales con una solución de 4% PFA a 4°C. Después de una a tres semanas, se cambiaron a viales con una solución de 30% de sacarosa disuelta en 0.1M PB, con un pH 7.4 y a 4°C. Cuando las muestras descendieron al fondo del frasco fueron congeladas lentamente por inmersión en 4-metilbutano pre-enfriado con hielo seco. Después de ser congelados, se almacenaron en un ultracongelador a -74°C, hasta efectuar los experimentos morfológicos.

## **Inmunofluorescencias**

Se realizaron cortes coronales seriados (45µm de espesor) del BO en un criostato (*Modell CM 1510-3*; Leica Microsystems, Nussloch, Alemania, o *Microm CM 552*; Carl Zeiss, Gottingen, Alemania) a una temperatura de -20°C. Los cortes se colocaron en flotación en 4% PFA dentro de cajas de 96 pozos a 4°C hasta el día siguiente. Se realizaron tres lavados de 15 minutos c/u con PB adicionado con 0.3% Triton X-100 (Sigma; PBT), a temperatura ambiente. Posteriormente, para facilitar la unión de los anticuerpos a sus respectivos antígenos, se incubaron los cortes con una solución de citrato de sodio / cloruro de sodio (2X SSC) durante una hora a 70°C, seguida de tres lavados con 2X SSC a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con 2X TBS de quince minutos y dos lavados por 15 minutos con PB. Posteriormente las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario ratón α-BrdU (1:200; Roche) y los anticuerpos primarios (ambos de Millipore) -cabra α-calretinina (CR, 1:800) o conejo α-tirosina hidroxilasa (TH, 1:800)- diluidos en una solución de bloqueo que contiene 3% de suero inactivado de caballo y 0.3% Triton X-100 disueltos en PBT. Como control negativo de los experimentos se incubaron pozos omitiendo el anticuerpo primario e incubándolos sólo con suero de bloqueo. Los cortes se incubaron con los anticuerpos toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, los anticuerpos se retiraron y los cortes se lavaron tres veces con PB. Posteriormente, los cortes se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos acoplados a

fluoróforos dirigidos contra las inmunoglobulinas G (IgGs) de cabra (Alexa 647 burro  $\alpha$ -cabra, 1:300) y de conejo (Alexa 594 burro  $\alpha$ -conejo; 1:300, ambos de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Pasado ese tiempo, se retiró el exceso de anticuerpos y los cortes se lavaron dos veces con PB. Posteriormente los cortes se incubaron con el colorante fluorescente e marcaje nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) durante diez minutos para tinción nuclear. Finalmente, los cortes fueron montados en orden secuencial sobre portaobjetos, e incluidos inmediatamente en medio de montaje comercial (DAKO Fluorescent Mounting Medium; DAKO). Al final del procedimiento, se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Optiphot-2, Nikon, Tokio, Japan o BW51, Olympus, Tokio, Japan). Los conteos estereológicos fueron realizados en estaciones de trabajo equipadas con el programa StereoInvestigator (ver abajo).

## **Conteo celular**

### *Conteos estereológicos*

El conteo de las células positivas para los distintos marcadores utilizados se realizó en la zona anteroventrolateral (AVL) de la capa glomerular (CG) del BO, debido a que el estímulo utilizado (hexanal) activa predominantemente dicha zona (Xu *et al.*, 2003). La zona se determinó en relación a la estructura completa, obtenida a partir de cortes coronales seriados. Para llevar a cabo el conteo, se utilizó un procedimiento sistemático al azar con una prueba denominada “fraccionador óptico” (West *et al.*, 1991), en un equipo semiautomático de estereología (StereoInvestigator, MicroBrightField, Colchester, VT, USA). Con ayuda del sistema, se realizaron trazos que delimitan los glomérulos de la zona AVL. Para el caso de los conteos de las células positivas a TH y CR, el tamaño del cuadro de conteo fue de  $30 \mu\text{m}^2$  de la rejilla de muestreo de  $110 \mu\text{m}^2$  y la periodicidad de las secciones fue de 9. Para todos los conteos la altura de los cuadros de conteo fue de  $35 \mu\text{m}$  y las zonas de guarda fueron de  $4 \mu\text{m}$  encima y debajo de éstos.

Además de los conteos de los linajes, se realizó el conteo de núcleos marcados mediante la tinción con DAPI para determinar el número total de células en la zona AVL y poder realizar un ajuste de los estimados. El tamaño del cuadro de conteo fue de  $20 \mu\text{m}^2$ , de la rejilla  $200 \mu\text{m}^2$  y la periodicidad fue de 13. La altura del cuadro de conteo fue de  $25 \mu\text{m}$  sin zona de guarda y centrando el disector.

Las células inmunoreactivas que intersectaban la zona de guarda superior así como las líneas laterales de exclusión no fueron incluidas en el conteo. Los datos obtenidos son estimados del número total de células determinados por el programa de



estereología Stereoinvestigator 8, que considera el número de células contadas con relación al área de la región de interés trazada, y el promedio de su grosor muestreado en múltiples zonas elegidas al azar. Todos los conteos se realizaron con un aumento de 100x, y la consistencia y confiabilidad de los mismos se determinaron estimando el coeficiente de error de Gundersen, el cual siempre fue menor o igual a 0.1.

#### *Conteos mediante Meander Scan*

Para poder descartar que los cambios en los números obtenidos de cada fenotipo neuronal se deban a un aumento en la diferenciación de nuevas neuronas hacia dichos fenotipos, realizamos un procedimiento de conteo denominado Meander scan (escaneo sinuoso), mediante un microscopio con una platina motorizada pudimos realizar un escaneo secuencial de toda la zona AVL. El escaneo realizado fue de toda la zona debido a que existen pocas neuronas que llegan a la zona AVL del BO y de aquellas que llegan el número de células que se diferencian a alguno de los subtipos celulares de las neuronas PGC es aun menor. Se buscaron células BrdU-IR y células que presentaran dobles marcas (BrdU/TH y BrdU/CR). Las dobles marcas indicaban que era una nueva neurona debido a la presencia de BrdU, y que dicha neurona era dopaminérgica o calretinina positiva.

El conteo de las marcas simples y colocalizadas se llevó a cabo en un sistema de estereología DSU bajo un aumento de 100x con 1.4 N.A. Los conteos se llevaron a cabo cada dos o tres cortes con un cuadro de conteo de 35x25x45  $\mu\text{m}$ , con una zona de guarda de 4  $\mu\text{m}$  y una malla de escaneo de 50  $\mu\text{m}^2$ . Los núcleos que interceptaban los límites superiores de la zona de guarda o los bordes laterales del área de exclusión no fueron tomados en cuenta.

#### **Análisis estadístico**

Los datos conductuales fueron analizados mediante una MANOVA por efectos siendo las variables dependientes la latencia y los errores, y tomando como factores las sesiones, el grupo y un factor de interacción sesiones-grupo.

Los estimados neuronales fueron ajustados a la población total de células determinada a través del conteo estereológico de núcleos teñidos mediante DAPI (estimado poblacional/número total de células en la zona AVL). Por cada grupo se realizó el conteo de tres muestras escogidas de manera aleatoria y posteriormente se realizó un promedio de los estimados. El número total de células, medidas a través de la tinción con DAPI, se comparó entre los grupos mediante pruebas de t de Student

para muestras independientes.

Cuando los estimados neuronales se distribuyeron normalmente fueron analizados mediante una prueba ANOVA de una vía seguida por una prueba post hoc de Tukey's HSD, y en caso de no distribuirse normalmente se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis.

Los datos del Meander scan (n= 3 por cada población neuronal) fueron analizados mediante una prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis para comparar los porcentajes relativos.

Todas las pruebas se llevaron a cabo con el programa Systat 12 y tomando  $P \leq 0.05$  como el nivel de significancia.

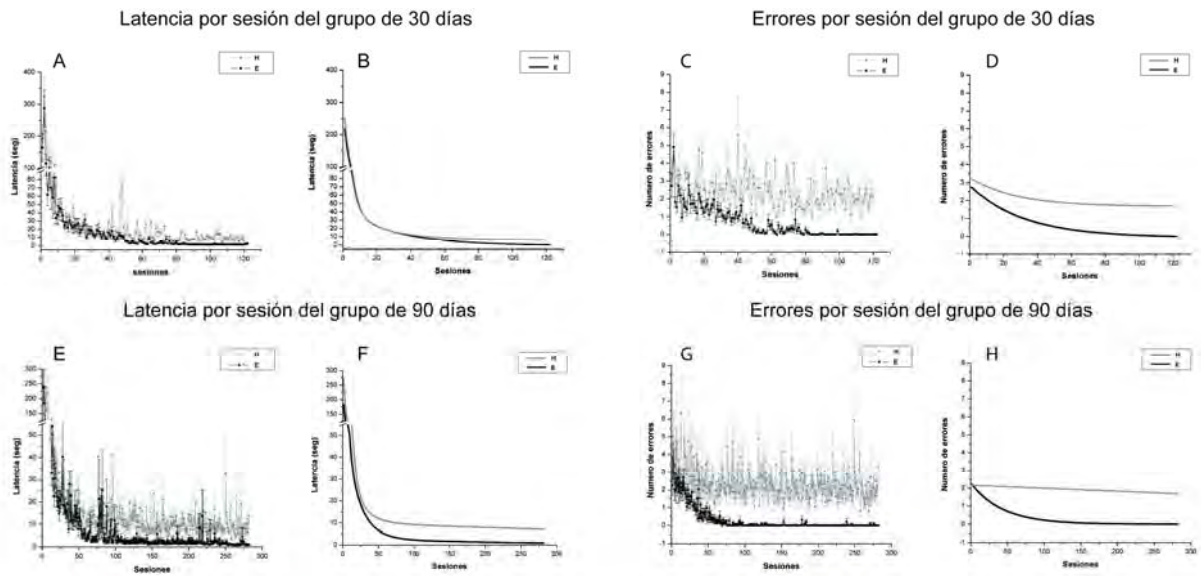
## Resultados

### Estimulación olfativa

Como ya se mencionó, para poder corroborar de manera indirecta que el procedimiento de estimulación tenía los efectos deseados (activación específica de la capa glomerular), se diseñó un protocolo de condicionamiento que permitió evaluar la consistencia de la conducta de las ratas en presencia del estímulo discriminativo (hexanal). La figura 5 muestra el tiempo de latencia y los errores por sesión de las ratas H y E sacrificadas a los 30 o 90 días.

Como se muestra en las gráficas, durante las primeras sesiones de condicionamiento las ratas de los grupos H y las E presentan una gran latencia (ver figura 5B y 5F) y un gran número de errores (ver figura 5D y 5H) para detectar el brazo del laberinto que contenía el reforzador (agua). Hasta la segunda semana de entrenamiento podemos observar diferencias en la conducta como lo reflejan las tendencias de las curvas. La curva negra (ratas E) se aproxima al origen del eje X, mientras que la curva gris (ratas H) presenta un patrón más aleatorio. Dichas tendencias se presentan en el grupo E tanto a los 30 como a los 90 días de condicionamiento, el análisis estadístico mediante la prueba MANOVA por efectos sugiere que el grupo (habitado o experimental), las sesiones y la interacción de ambos factores explican las diferencias entre la latencia y número de errores de manera diferencial entre los grupos de 30 y 90 días. A los 30 días, encontramos que el factor sesiones explica de manera significativa las diferencias en la latencia; el factor grupo en los errores y el factor de interacción en los errores (MANOVA por efectos,  $p=0.000$ ). A los 90 días, el factor sesiones explica las diferencias en los errores ( $p=0.000$ ), el factor grupo en la latencia ( $p=0.000$ ) y en los errores ( $p=0.001$ ), y el factor de interacción en la latencia ( $p=0.011$ ).

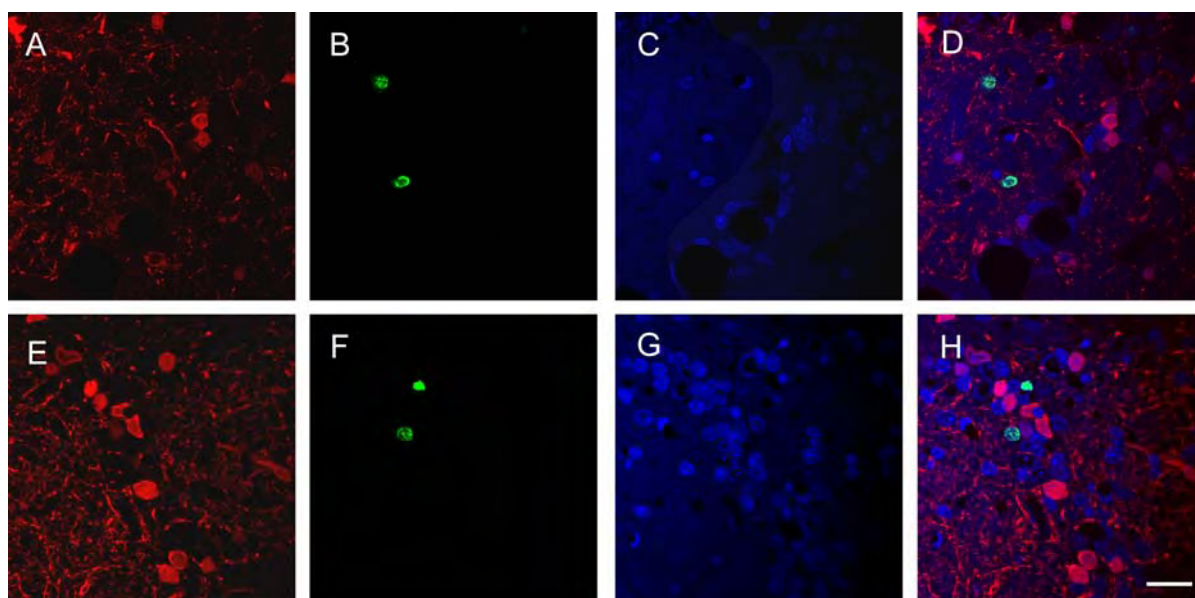
Estadísticamente, a los 30 días de entrenamiento, las ratas experimentales son más precisas pero no más rápidas, y conforme aumentan los días de estimulación, las ratas experimentales son más rápidas y más precisas que las ratas habituadas. El análisis por efectos mediante la MANOVA nos permite decir que a los 90 días, la estimulación olfativa tiene un efecto estadística y conductualmente significativo en las diferencias de la latencia y el número de errores entre el grupo habituado y el grupo estimulado.



**Figura 5.** Gráficas que ilustran la latencia (A, B, E y F) y número de errores por sesión (C, D, G y H) para los grupos de ratas H (en gris) y E (en negro) después de transcurridos 30 días (A, B, C y D) y 90 días (E, F, G y H) de entrenamiento. Las gráficas A, C, E y F muestran la media del desempeño por sesión (tres ensayos cada sesión por rata) con su respectivo error estándar ( $n=5$  por grupo); y las gráficas B, D, F y H son las curvas obtenidas mediante un ajuste no lineal ( $f(x)=e^{-1}$ ).

## Inmunofluorescencias

Posterior al condicionamiento se procesaron los cerebros para realizar inmunofluorescencias contra células BrdU-, CR- y TH-IR. Las inmunofluorescencias debían contar con la mejor definición y el menor ruido posible para poder realizar los conteos estereológicos y el Meander Scan. En la figura 6 se muestran fotomicrográficas que ejemplifican la calidad de las muestras consideradas en el estudio.



**Figura 6.** Fotomicrográficas de cortes coronales del BO inmunofluoroteñidos para TH (A), CR (E) y BrdU (B y F), y teñidos con DAPI (C y G). Las figuras D y H corresponden al sobrelape de las tres tinciones para cada caso donde se puede observar la colocación de las marcas. Todas las imágenes fueron tomadas en la capa glomerular de la zona AVL del BO mediante microscopía confocal. Escala= 25  $\mu$ m.

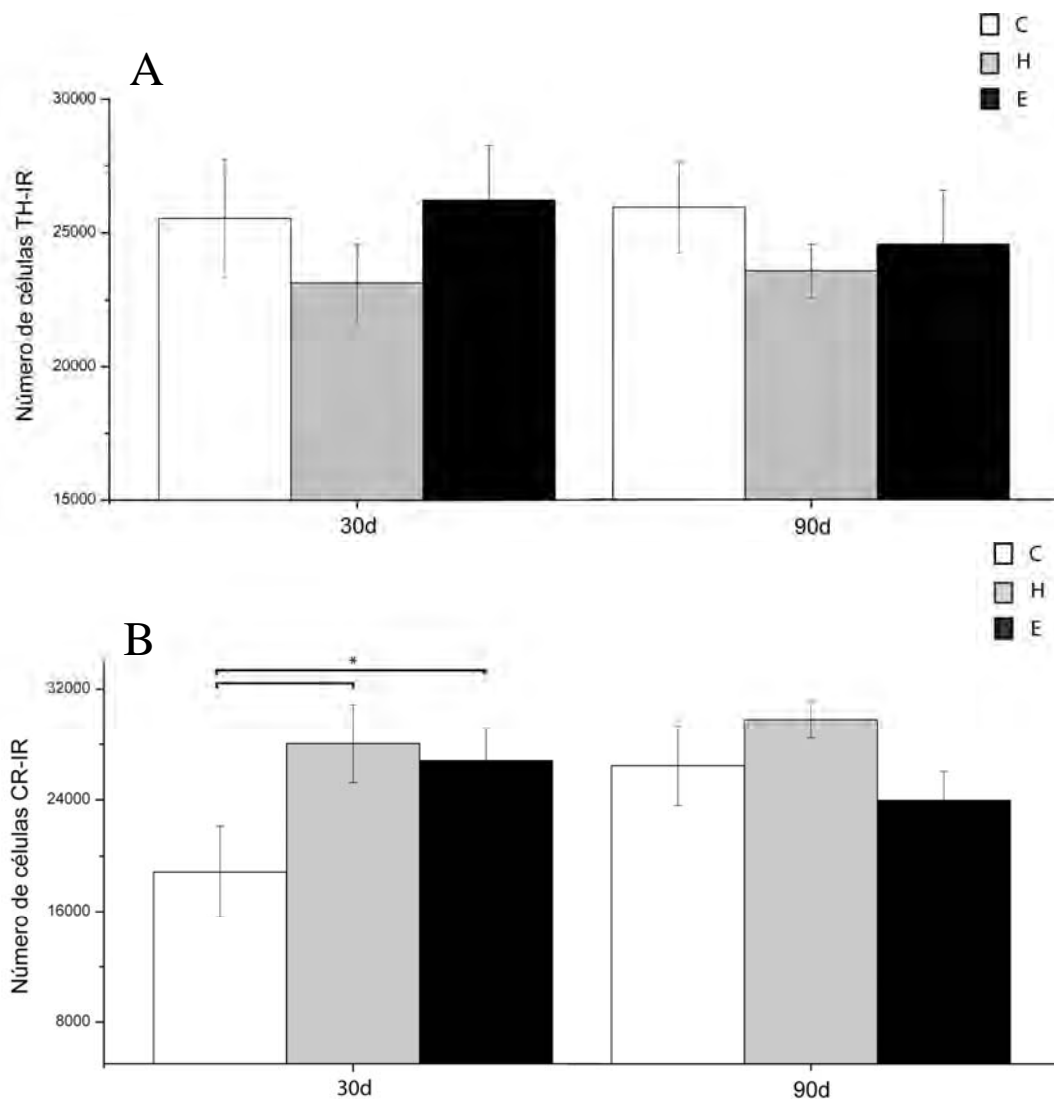
## Conteos celulares

No se encontraron diferencias significativas del número total de células teñidas con DAPI entre los grupos (ver cuadro 1;  $\alpha \leq 0.05$ , prueba t de Student para muestras independientes; C-H t= 0.368, p= 0.746; C-E t= 0.386, p= 0.735; y H-E t= 0.052, p= 0.961).

**Cuadro 1.** Número total de células por grupo (C, H y E) en la capa glomerular de la zona AVL del BO. Se realizaron tres conteos celulares y la última fila presenta la media y error estandar de los tres estimados.

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>E</b>
Conteo 1	256615.19	245414.34	213495.50
Conteo 2	270152.97	221376.73	244004.72
Conteo 3	257838.20	293818.19	298054.56
<b>Media <math>\pm</math> ES</b>	<b>261535.45<math>\pm</math> 4323.2</b>	<b>253536.42<math>\pm</math> 21302.72</b>	<b>251851.59<math>\pm</math> 24723.39</b>

La figura 7 muestra las proporciones relativas de las PGC inmunoreactivas para TH y CR. Si bien para el caso de las neuronas dopaminérgicas no se observaron diferencias entre los grupos (TH-IR, ver figura 7A; Kruskal- Wallis  $K= 1.482$ ,  $p= 0.915$ ), las neuronas CR positivas incrementaron de manera significativa para ambos grupos H y E a los 30 días al compararse contra el grupo control de la misma edad. (ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey's HSD,  $p<0.05$ ; figura 7B). Esta diferencia, sin embargo, se desvaneció a los 90 días. La diferencia entre los grupos controles de ambas edades se debe al desarrollo normal de la rata y su producción postnatal de neuronas positivas a calretinina (Hwang *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Gráficas de barras que muestran las medias y errores estandar de A) los estimados poblacionales de células TH-IR por grupo y periodo de estimulación (prueba de Kruskal- Wallis) y B) los estimados poblacionales de células CR-IR por grupo y periodo de estimulación (ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey's HSD). En las gráficas se muestran el grupo control (C en blanco), habituado al lugar (H en gris) y estimulado (E en negro). \* $p \leq 0.05$ .

## Meander scan

Para poder descartar que el aumento en el número de neuronas CR-IR se debía al aumento en la diferenciación de nuevas células hacia este fenotipo, realizamos un escaneo total de la zona AVL en busca de células BrdU-IR que colocalizaran con CR. Los datos obtenidos se presentan en el cuadro 2 como porcentajes relativos a la población total de células positivas a BrdU para cada uno de los fenotipos neuronales TH y CR en cada uno de los grupos estudiados. Los resultados muestran que no existen diferencias en el número de neuronas doblemente marcadas para BrdU y CR o para BrdU y TH, lo que sugiere que no existe mayor diferenciación de las neuronas nuevas hacia ninguno de estos fenotipos como producto de cualquiera de las manipulaciones evaluadas (prueba de Kruskal- Wallis,  $p > 0.05$ ).

**Cuadro 2.** Porcentajes relativos de nuevas interneuronas marcadas doblemente para BrdU/CR o BrdU/TH-IR en ratas control (C), habituadas al lugar (H) y estimuladas olfativamente (E). Cada porcentaje se obtuvo a partir de la media (n= 3).

		BrdU (%)	BrdU/TH (%)	BrdU/CR (%)
30d	C	60.01	8.37	13.94
	H	51.62	7.57	25.36
	E	61.65	8.42	16.86
90d	C	43.72	15.84	9.81
	H	65.25	7.98	10.67
	E	18.91	14.69	16.81

## Discusión

La plasticidad cerebral fenotípica neuronal pudiera jugar un papel central al permitir la formación y modificación de los circuitos neuronales en respuesta a la experiencia, el aprendizaje-memoria y a lesiones periféricas o centrales (Duffau, 2006). En este trabajo evaluamos si la plasticidad fenotípica neuronal puede ser un mecanismo que permita al BO hacer frente a las demandas ambientales. Con el objetivo de estudiar la plasticidad fenotípica en el BO, nos avocamos a investigar los efectos sobre el fenotipo de dos de los linajes de interneuronas periglomerulares de la activación sensorial crónica del circuito. El énfasis fue puesto en neuronas preexistentes, pues hay evidencia que apoya que las neuronas en distintas regiones del sistema nervioso central y periférico modifican la expresión de neurotransmisores y marcadores de linaje en respuesta a diversos estímulos.

Nuestros resultados muestran que si bien el número de células periglomerulares se mantiene constante entre los grupos experimentales a lo largo del periodo de experimentación evaluado, la proporción de interneuronas periglomerulares inmunoreactivas para calretinina incrementa a los 30 días como resultado de la manipulación experimental. Este incremento es transitorio pues a los noventa días no se observa. En conjunto las observaciones descritas sugieren que existe un fenómeno de plasticidad fenotípica transitoria en la población de interneuronas periglomerulares que afecta a aquellas que expresan CR y no TH en el BO de ambos grupos (H y E). El proceso plástico descrito no parece resultar de cambios de la diferenciación terminal de las interneuronas periglomerulares nuevas para ambos linajes pues su proporción también se mantiene constante a lo largo del tiempo en todos los grupos de animales. Finalmente, el hecho de que tanto el grupo de habituación al lugar como el grupo estimulado presenten modificaciones en el número de interneuronas marcadas, apoya la idea de que éste cambio no es producto de la estimulación o del condicionamiento olfativo, sino resultado de la manipulación a la que los animales fueron sujetos durante los procedimientos comunes al ensayo conductual. El análisis conductual demuestra que existe una diferencia entre los periodos de estimulación debida a la estimulación olfativa y que dicha diferencia se acrecenta a los 90 días alcanzando el criterio estadístico. A pesar de las diferencias conductuales, los resultados celulares indican que no existe ninguna diferencia entre el grupo estimulado y el habituado al lugar.

Así, es posible que el resultado observado se deba al enriquecimiento de la



estimulación sensorial general que pudiese estar ocurriendo en los animales experimentales o bien una respuesta al estrés. Ambas posibilidades deben evaluarse experimentalmente para confirmar o refutar su validez. Una posibilidad es someter a las ratas con anterioridad a las mismas condiciones experimentales (manipulación, caja, oscuridad, privación de agua, entre otros) antes de someterlas a la intervención conductual. Otra posibilidad es controlar el estrés hídrico, mediante periodos de privación más cortos.

Es interesante destacar que el hecho de que la activación de los circuitos neuronales no haya modificado el número total de nuevas interneuronas periglomerulares integradas a los circuitos glomerulares utilizados se ha mostrado en estudios previos (Alonso *et al.*, 2006). La diferencia de los resultados obtenidos en nuestro trabajo con aquellos reportados previamente pudieran deberse a que los protocolos de aprendizaje difieren, lo mismo que los modelos animales utilizados. Nuestros resultados, sin embargo, también pudieran indicar que el fortalecimiento de las conexiones neuronales relacionadas con el aprendizaje y la memoria de la tarea olfativa empleada, puedan prevenir la integración de nuevas neuronas a los circuitos neuronales que están siendo utilizados en dicha tarea. Conteos celulares llevados a cabo en sitios diferentes a aquellos utilizados en la tarea podrían ayudar a resolver este asunto; además, si los cambios se debieron al enriquecimiento ambiental, es muy probable que los efectos en la población de calretinina no se restrinjan a la zona evaluada por lo que es indispensable realizar una evaluación de distintas zonas del BO.

Otro dato interesante obtenido en el presente trabajo es que las proporciones de interneuronas glomerulares positivas para TH no se modificaron en respuesta a las manipulaciones experimentales empleadas. Esto sugiere que el incremento en el uso de los circuitos neuronales no conduce a un aumento en el número de células dopaminérgicas en el BO. Este hallazgo parecería paradójico, pues estudios previos han mostrado que el aumento de la actividad sensorial conduce a un incremento en la expresión de TH en el bulbo olfatorio (Liu *et al.*, 1999) y que la privación olfativa tiene los efectos opuestos (Couper *et al.*, 2000). Sin embargo, la regulación de la actividad de la TH por la actividad sensorial podría ser independiente del número de neuronas dopaminérgicas que constituyen al BO en un determinado momento, como parece ser el caso para las isoformas de las GAD en el BO (Salcedo *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2007). De cualquier manera, nuestros resultados sugieren que el aumento en el número de

neuronas dopaminérgicas observado en pacientes con enfermedad de Parkinson, no es producto de un aumento en la actividad aferente olfativa ni de la plasticidad fenotípica de las neuronas preexistentes.

Finalmente, una interrogante que surge a partir de nuestro trabajo es cuál sería el papel fisiológico de la plasticidad fenotípica transitoria observada en ambos grupos de animales experimentales evaluados. Es posible que la plasticidad fenotípica sea un mecanismo de adaptación a corto plazo mientras se ponen en marcha otros mecanismos en el BO para modificar la función del circuito. Adicionalmente, las células preexistentes de bajo o nulo recambio podrían constituir una memoria de la experiencia olfativa previa que pudiera utilizarse para dirigir la diferenciación de los elementos integrados *de novo*, actualizando así las funciones sensoriales de los circuitos olfativos.

Los cambios observados en calretinina carecen de cualquier explicación fisiológica fundamentada pero una posibilidad es que debido a su función de proteína amortiguadora de calcio intracelular, las nuevas neuronas CR-IR al ser neuronas tipo 2 (hacen contacto sináptico con las dendritas de las células mitrales) podrían estar inhibiendo la actividad del circuito glomerular, dicha inhibición refinaria la activación específica de los glomerulos de interes con el odorante principal, disminuyendo las posibilidades de una activación inespecifica causada por odorantes semejantes. En un futuro sería importante comprobar la función de las neuronas CR-IR en el circuito glomerular.

Aunque en este estudio el condicionamiento haya sido una herramienta metodológica para corroborar la detección del estímulo, también fue una variable que pudo haber afectado la plasticidad fenotípica. En un futuro es necesario realizar un grupo control del condicionamiento donde se controlara la asociación o contingencia entre el reforzador y el estímulo discriminativo. En el cual el estímulo odorante (hexanal) esté presente pero no asociado al brazo del laberinto que contiene el reforzador, aunque este grupo no sea del todo necesario debido a que los resultados indican que las modificaciones fenotípicas no sólo suceden en el grupo condicionado, existen antecedentes donde encuentran que no hay un aumento en la incorporación de nuevas neuronas en la zona que procesa el estímulo discriminativo y por el contrario aumenta la supervivencia en aquellas zonas que procesan el estímulo neutro (Alonso *et al.*, 2006). Lo anterior indica que dependiendo del uso, los circuitos se fortalecen y de alguna forma no permiten la incorporación de nuevos elementos. Sería interesante modificar la saliencia o intensidad de los estímulos para poder responder si la

relevancia del estímulo es la característica que detona la plasticidad fenotípica o las modificaciones en la incorporación de nuevas neuronas.

## **Conclusiones**

La plasticidad fenotípica es otro mecanismo de plasticidad del bulbo olfatorio para modificar el circuito glomerular. Este circuito mantiene el número de sus elementos celulares, pero, por otro lado, promueve el cambio de las neuronas preexistentes al aumentar transitoriamente la expresión de un fenotipo neuronal (CR-IR) ante las condiciones de exposición a un contexto distinto (habitación de lugar y estimulación).

## Referencias

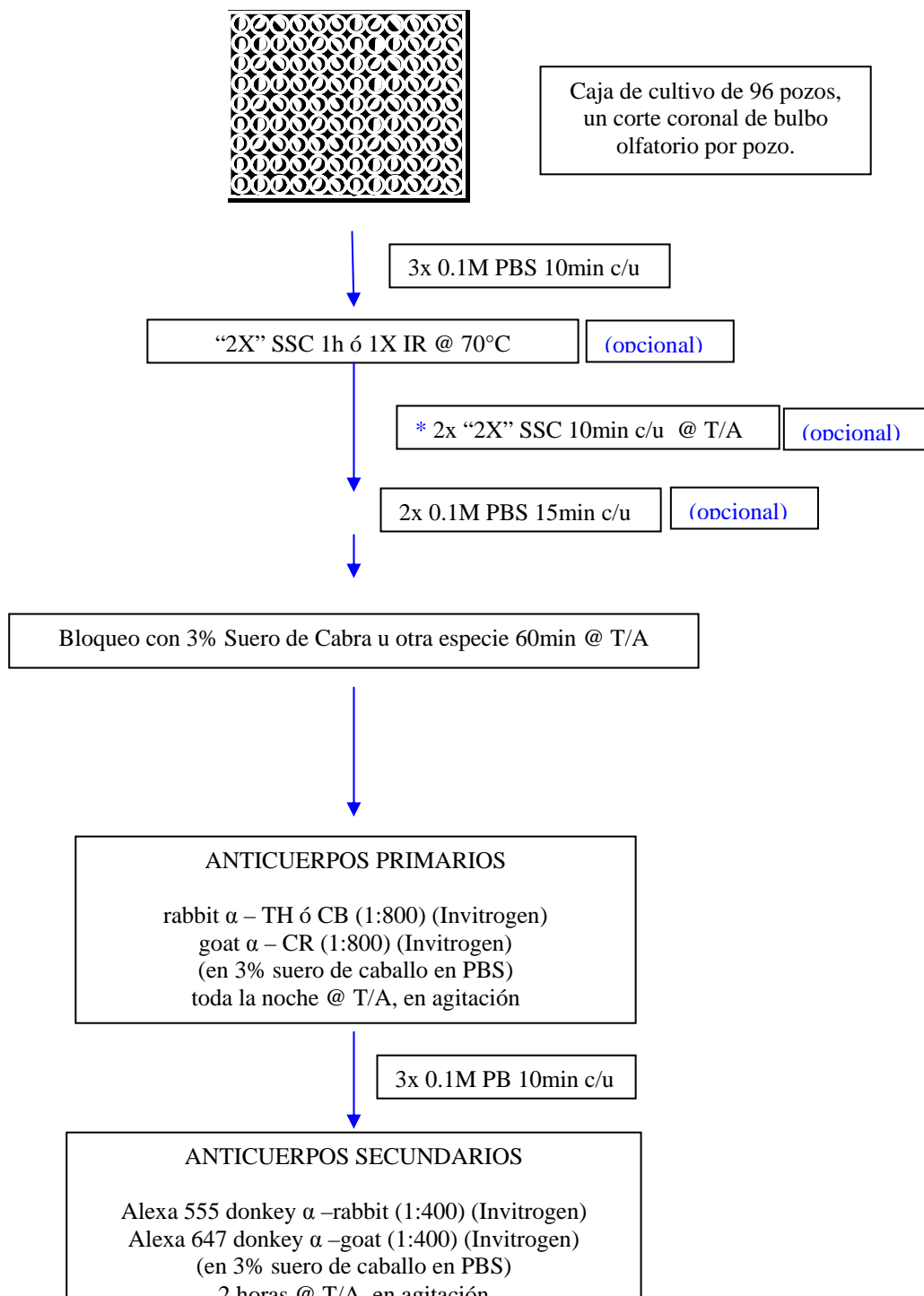
- Alonso M, *et al.* (2006). **Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb.** *J Neurosci.* 26(41): 10508-13.
- Astic L. y Saucier D. (2001). **Neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system of mammals: morphological and functional recovery following olfactory bulb deafferentation.** *Cell Mol Life Sci.* 58(4): 538-45.
- Belluzzi, O., *et al.* (2003). **Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb.** *J Neurosci.* 23(32): 10411-8.
- Berkowicz D.A. y Trombley P.Q. (2000). **Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse.** *Brain Res.* 855(1): 90-9.
- Brinon, J. G., *et al.* (1998). **Neurocalcin immunoreactivity in the rat main olfactory bulb.** *Brain Res.* 795(1-2): 204-14.
- Buck, L. y Axel R.. (1991). **A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition.** *Cell.* 65(1): 175-87.
- Calas A., Landry M., Roche D. y Trembleau A. (1994). **[A model of phenotypic plasticity: the hypothalamo-posthypophyseal neurons]** *C R Seances Soc Biol Fil.* 188(3):187-206. Review. French.
- Cao Y, *et al.* (1996). **Presence of mRNA for glutamic acid decarboxylase in both excitatory and inhibitory neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(18): 9844-9.
- Chauvet N., Drian M.J. y Privat A. (1995). **Immunocytochemical study of phenotypic plasticity of cultured dorsal root ganglion neurons during development.** *Int J Dev Neurosci.* 13(7): 673-83.
- Couper Leo J.M., Devine A.H. y Brunjes P-C. (2000). **Focal denervation alters cellular phenotypes and survival in the rat olfactory bulb: a developmental analysis.** *J Comp Neurol.* 425(3): 409-21.
- Doty R.L. y Risser J.M.. (1989). **Influence of the D-2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rats before and after spiperone administration.** *Psychopharmacology (Berl).* 98(3):310-5.
- Duffau H. (2006). **Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications.** *J Clin Neurosci.* 13(9): 885-97.
- Firestein, S. (2001). **How the olfactory system makes sense of scents.** *Nature.* 413: 211-218.
- Gómez-Lira G., Lamas M., Romo-Parra H. y Gutiérrez R. (2005). **Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells.** *J Neurosci.* 25(30):6939-46.
- Gutierrez-Mecinas, *et al.* (2005). **Characterization of somatostatin- and cholecystinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb.** *J Comp Neurol.* 489(4): 467-79.
- Halayko A.J., Tran T. y Gosens R. (2008). **Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins.** *Proc Am Thorac Soc.* 5(1):80-8.
- Hsia A.Y., Vincent J.D. y Lledo P.M. (1999). **Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb.** *J Neurophysiol.* 82(2):1082-5.
- Huisman E., Uylings H.B.M. y Hoogland P.V. (2004). **A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease.** *Mov Disord.* 29: 687-92.
- Hwang, I. K., *et al.* (2006). **Age-related changes in calretinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat main olfactory bulb.** *J. Vet. Med. Sci.* 68(5): 465-469.
- Kandel, E. (2000). **Principles of neural science.** McGraw Hill: New York. p.35.

- Kishimoto J., Keverne E.B. y Emson P.C. (1993). **Calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons.** *Brain Res.* 610(2): 325-9.
- Kosaka, K., *et al.* (1995). **Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb.** *Neurosci Res.* 23(1): 73-88.
- Kosaka K., Toida K., Aika Y. y Kosaka T. (1998). **How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells.** *Neurosci Res.* 30(2):101-10.
- Kosaka, K. y Kosaka T. (2005). **Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells.** *Anat Sci Int.* 80(2): 80-90.
- Lledo P.M., Alonso M. y Grubb M.S. (2006). **Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits.** *Nat Rev Neurosci.* 7(3):179-93.
- Lledo P.M., Merkle F.T. y Alvarez-Buylla A. (2008). **Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity.** *Trends Neurosci.* 31(8): 392-400.
- Liu N, Cigola E, Tinti C, Jin BK, Conti B, Volpe BT, Baker H. (1999). **Unique regulation of immediate early gene and tyrosine hydroxylase expression in the odor-deprived mouse olfactory bulb.** *J Biol Chem.* 274(5):3042-7.
- Maher B.J. y Westbrook G.L. (2008). **Co-transmission of dopamine and GABA in periglomerular cells.** *J Neurophysiol.* 99(3):1559-64.
- Marks C.A., Cheng K., Cummings D.M. y Belluscio L. (2006). **Activity-dependent plasticity in the olfactory intrabulbar map.** *J Neurosci.* 26(44):11257-66.
- Mayford M. (2007). **Protein kinase signaling in synaptic plasticity and memory.** *Curr. Opin. Neurobiol.* 17(3): 313-7.
- Pascual-Leone A., Amedi A., Fregni F. y Merabet L.B. (2005). **The plastic human brain cortex.** *Annu Rev Neurosci.* 28:377-401.
- Panzanelli P., *et al.* (2007). **GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb.** *J Comp Neurol.* 502(6): 990-1002.
- Petreanu L. y Alvarez-Buylla A. (2002). **Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction.** *J Neurosci.* 22(14): 6106-13.
- Ressler, K. J., *et al.* (1993). **A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium.** *Cell.* 73(3): 597-609,
- Salcedo E., Zhang C., Kronberg E. y Restrepo D. (2005). **Analysis of training-induced changes in ethyl acetate odor maps using a new computational tool to map the glomerular layer of the olfactory bulb.** *Chem Senses.* 30(7): 615-26.
- Shepherd, G. M. y C. A. Greer (1998). **Olfactory Bulb. The synaptic organization of the brain.** New York, Oxford University Press, Inc.: 638.
- Schurmans S., *et al.* (1997). **Impaired long-term potentiation induction in dentate gyrus of calretinin-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(19):10415-20.
- Vassar, R., J. Ngai, *et al.* (1993). **Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium.** *Cell.* 74(2): 309-18.
- West, M.S., *et al.* (1991). **Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.** *Anat. Rec.* 231: 482-497.
- Winner, B., C. M. Cooper-Kuhn, *et al.* (2002). **Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb.** *Eur J Neurosci.* 16(9): 1681-9.
- Yoo K.Y., *et al.* (2007). **Comparison of changes in GAD65 and GAD67**

immunoreactivity and levels in the gerbil main olfactory bulb induced by transient ischemia. *Neurochem Res.* 33(5):719-28.

- Yuste R. y Sur M. (1999). **Development and plasticity of the cerebral cortex: from molecules to maps.** *J Neurobiol.* 41(1):1-6.
- Xu, F., *et al.* (2003). **Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(19): 11029-34.

## ANEXO I Inmunofluorescencia



## ANEXO I Inmunofluorescencia

