



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**INFLUENCIA DE UN CONDICIONAMIENTO OLFATIVO OPERANTE
SOBRE LA DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA DE NUEVAS NEURONAS
EN EL BULBO OLFATORIO DE LA RATA ADULTA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Miguel Tapia Rodríguez

Director de Tesis:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Comité Tutor:

Dr. David E. García Díaz
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Horacio Merchant Larios
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

México, D.F.

2013.



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 Académicos

Al **Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina** quien fungió como director de este trabajo de tesis, que otorgó la mayor libertad de ejecución y creatividad, proveyó de la infraestructura necesaria y al cual contribuyó con sus conocimientos, ideas, estímulos, críticas y orientación.

A los miembros de mi Comité Tutorial, **Dr. Horacio Merchant Larios** y **Dr. David Erasmo García Díaz**, por su tiempo, consejos, críticas y comentarios que enriquecieron al presente proyecto.

A los sinodales y revisores: **Dr. Gabriel Roldán Roldán**, **Dra. María Magdalena Giordano Noyola**, **Dr. Víctor Ramírez Amaya**, **Dra. Julieta Griselda Torreblanca Mendoza**, y **Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina**, por la revisión, comentarios y críticas a la presente tesis.

Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por permitirme formar parte de tan prestigiosa comunidad académica de nuestro país.

Al **M. en C. José Felipe Esquivelzeta Rabell**, por su amplio soporte académico y técnico para la realización de este proyecto.

A la **M. en C. Patricia Padilla Cortés**, por el soporte técnico brindado durante gran parte del proyecto.

A la **M. en C. Abril Aldama Sáiz**, por los comentarios, sugerencias y críticas a la redacción de la presente tesis.

A los doctores **Eduardo Martínez Martínez**, **Claudio Iván Galván Hernández**, **Francisco Javier Jiménez Trejo** e **Isaac González Santoyo** por el soporte técnico y académico brindado durante la realización del presente proyecto.

A la **MVZ Georgina Díaz Herrera** y al personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el gran apoyo brindado en el cuidado de los animales de experimentación utilizados en el presente trabajo.

Al personal de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomedicas, **Lic. Lucia Brito Durán**, **Lic. Martha Cariño Aguilar**, **Lic. Erasto Brito Brito**, **María Muñoz**, **Rebeca Ramírez**, **Laura T. Velázquez** y **Julieta Cáliz** por su gran apoyo brindado para la obtención de libros y revistas utilizados para documentar el presente trabajo.

Apoyos Económicos

El presente **proyecto** fue realizado en el laboratorio del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, y en las instalaciones del Bioterio así como de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, **financiado** por las siguientes instituciones y proyectos:

DGAPA-PAPIIT, UNAM: proyecto IN210105

CONACyT: proyectos 38615N, 45872M, y 53194 (Programa de Apoyo para la formación de doctores).

UNAM: proyecto IMPULSA-02

Ixtli-DGSCA, UNAM: Convocatoria 2007, proyecto: Explorando los circuitos cerebrales: Sumerjámonos en el mundo de los olores (Un modelo anatómico y funcional de los sistemas neurales de los vertebrados).

Así mismo, **MTR** fue **becario** de las siguientes instituciones:

CONACyT: becario 186647.

DGEP: Beca complementaria para estudiantes de Posgrado.

a la memoria de mi padre,

Miguel Tapia y Tinoco

Dedicada a Miguel Khalid y al nene o nena que viene en camino, los cuales son una de las alegrías más grandes que me ha dado la vida...los quiero hijos.

Para Abril, por enseñarme que las mejores cosas de la vida llegan cuando menos las esperas, por compartir todo conmigo, todo el tiempo, y por la perseverancia que muestras día a día....te admiro y te amo *Ab.*

Dedicada a Rosalía, por todas las enseñanzas, cuidados y paciencia para con los Migueles durante todo este tiempo... te quiero madre, gracias por todo

A Sandra e Iván, cuya dedicación a la vida hace que cuando pienso en ellos, me sienta profundamente orgulloso de que sean mis hermanos.

A mis sobrinos Yael, Amanda, Alexis y Marifer, por demostrarme todo el tiempo que son unos chicos maravillosos y talentosos

A Fer y Oscar, por su amistad y su apoyo eterno que hizo que nunca me sintiera solo, especialmente durante esta etapa de mi vida

Dedicada al matriarcado Rodríguez, que siempre está apoyando incondicionalmente a todos sus elementos, yo incluido. ¡Muchas gracias familia!

Índice

	Pág.
Agradecimientos Académicos.....	2
Apoyos Económicos.....	3
Dedicatorias.....	4
Índice.....	6
Índice de Ilustraciones.....	9
Índice de Tablas.....	10
Lista de Abreviaturas.....	11
Abstract.....	15
Resumen.....	16
I. Introducción.....	17
1. Sistema Olfatorio.....	17
1.1 Mucosa Olfatoria.....	17
1.2 Receptores Odoríferos.....	18
1.3 Nervio Olfatorio.....	20
1.4 Bulbo Olfatorio.....	20
1.4.1 Glomérulos Olfatorios.....	20
1.4.2 Anatomía del Bulbo Olfatorio.....	21
1.4.2.1 Celulas granulares.....	23
1.4.2.2 Celulas yuxtglomerulares.....	24
1.4.2.3 Celulas periglomerulares.....	24
1.5 Mapas de olor en el bulbo olfatorio.....	26
2. Neurogénesis en la Zona Subventricular de animales adultos.....	28

	Pág.
2.1 Generación y migración de nuevas neuronas hacia el bulbo olfatorio.....	28
2.2 Actividad Sensorial y Neurogénesis.....	29
2.3 Conducta Olfativa y Neurogénesis.....	30
II. Planteamiento del problema.....	32
III. Hipótesis.....	33
IV. Objetivos Generales y Particulares.....	33
Objetivo General I.....	33
Objetivos particulares I.....	33
Objetivo General II.....	33
Objetivos particulares II.....	33
Objetivo General III.....	34
Objetivos particulares III.....	34
Objetivo General IV.....	35
Objetivos particulares IV.....	35
V. Materiales y Métodos.....	36
1. Animales.....	36
2. Obtención de las muestras.....	36
3. Mapeo funcional de la capa glomerular posterior a la estimulación con hexanal.....	36
4. Condicionamiento operante olfatorio.....	39
5. Tratamiento con BrdU.....	41
6. Inmunofluorescencia BrdU / marcadores de linaje celular.....	41

	Pág.
7. Conteo de Poblaciones Celulares mediante el Fraccionador Óptico.....	42
8. Conteo “Meander Scan” para las colocalizaciones BrdU / marcadores de linaje periglomerular.....	43
9. Análisis Planimétrico.....	43
10. Análisis Estadístico.....	44
VI. Resultados.....	45
1. El hexanal activa de manera preferente la región AVL de la capa glomerular.....	45
2. Las ratas condicionadas al hexanal encuentran el agua más rápido y más eficientemente que las ratas control.....	45
3. El condicionamiento operante afecta de manera diferencial a distintos linajes de PGC presentes en la zona AVL.....	49
4. La actividad sensorial incrementa el número de células BrdU / GAD 65/67 ⁺ en la zona AVL.....	52
5. El condicionamiento operante no afecta los parámetros morfométricos de la zona AVL.....	53
VII. Discusión.....	54
VIII. Conclusiones.....	59
IX. Referencias.....	60
X. Anexos.....	66
1. Chronically reinforced, operant olfactory conditioning increases the number of newborn GABAergic olfactory periglomerular neurons in the adult rat.....	67
2. Preparación de Reactivos.....	75
3. Inmunoperoxidasa para c-Fos.....	78

4. Inmunofluorescencia para BrdU / TH, CB ó GAD 65/67 / CR.....	79
5. Checklist para sesiones de condicionamiento olfativo.....	80
6. Checklist para perfusión.....	81
7. Tabla de Números Aleatorios.....	82

Índice de Ilustraciones

Fig. 1. Esquema que ilustra la localización del sistema olfatorio en la cavidad nasal de roedores.....	18
Fig. 2. Dibujo esquemático que ilustra la relación anatómica de la mucosa olfatoria (MO) y el bulbo olfatorio (BO).....	19
Fig. 3. Modelo molecular de la estructura de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).....	20
Fig. 4. Dibujo esquemático que ilustra la organización topográfica de las conexiones establecidas entre la mucosa olfatoria (MO) y el bulbo olfatorio (BO).....	21
Fig. 5. El bulbo olfatorio de mamíferos.....	22
Fig. 6. Patrones de activación global de la capa glomerular inducidos por la exposición a aldehídos alifáticos en el mismo roedor, obtenidos mediante resonancia magnética funcional de alta resolución.....	27
Fig. 7. Esquema que ilustra la generación, migración y diferenciación de nuevas neuronas en el cerebro de roedores adultos.....	28

Fig. 8. Diseño experimental.....	35
Fig. 9. Reconstrucciones tridimensionales generadas a partir de los trazos utilizados para realizar el conteo Meander Scan en la capa glomerular del bulbo olfatorio de la rata.....	38
Fig. 10. Esquema de la caja de acrílico utilizada para los experimentos de condicionamiento operante olfativo.....	39
Fig. 11. El odorante hexanal estimula de manera preferente la zona AVL de la capa glomerular de la rata.....	46
Fig. 12. Las ratas condicionadas al hexanal son más precisas y más rápidas que las ratas control.....	47
Fig. 13. Neuronas nuevas y preexistentes en los glomérulos olfatorios.....	48
Fig. 14. La actividad sensorial no afecta el número de células TH y CB, pero si el de CR positivas en la zona AVL de la capa glomerular del bulbo olfatorio.....	50
Fig. 15. La actividad sensorial no modifica la tasa de supervivencia de células nuevas en la zona AVL del bulbo olfatorio.....	51
Fig. 16. El condicionamiento olfativo operante no modifica el volumen ni el número total de células en la zona AVL del bulbo olfatorio.....	53

Índice de Tablas

Tabla 1. Total de neuronas periglomerulares doblemente marcadas en la zona AVL.....	52
--	-----------

Lista de Abreviaturas

SVZ. Zona subventricular. Estructura cerebral localizada a lo largo de las paredes laterales de los ventrículos laterales

RMS: Vía migratoria rostral. Ruta migratoria especializada localizada en la porción frontal cerebral, la cual conecta la SVZ con el bulbo olfatorio.

NSO: Neurona sensorial olfatoria. Neurona bipolar localizada en la mucosa olfatoria, la cual posee una dendrita ciliada que contiene receptores olfatorios.

MO: Mucosa olfatoria. Neuroepitelio localizado en las láminas de la parte posterior de la cavidad nasal, conformado por NSO, células sustentaculares, células basales y las glándulas de Bowman.

CSus: Célula sustentacular. Tipo particular de célula glial que se localiza en la mucosa olfatoria.

CBs: Células basales. Tipo particular de célula troncal que se localiza en la mucosa olfatoria, que da origen a las NSO y las CSus.

NO: Nervio olfatorio. Nervio craneal I, es el transductor de los estímulos olfativos de la periferia hacia las estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento de la información olfativa.

BO: Bulbo olfatorio. Estructura especializada del sistema nervioso central en el procesamiento de información olfativa, localizada en la parte baja frontal del cerebro.

GL:Capa glomerular. Una de las capas celulares anatómicas del bulbo olfatorio, donde se localizan las estructuras conocidas como glomérulos y los somas de las células yuxtglomerulares.

PGC: célula periglomerular. Interneuronas localizada en la GL, que modulan el paso de información olfativa que es procesada a través de los glomérulos.

CMt: Célula mitral. Células de proyección propias del bulbo olfatorio, forman parte del neuropilo de los glomérulos y son el relevo de la información proveniente de las NSO, innervando hacia centros de procesamiento superiores del cerebro.

GRC: Célula granular. Interneuronas localizadas en la capa granular del bulbo olfatorio, que modulan la información de fibras ascendentes y descendentes del bulbo olfatorio.

TLO: tracto olfatorio. Banda angosta de sustancia blanca que es la vía aferente del bulbo olfatorio, conformada por los axones de las CMT y las células en penacho, que inervan hacia centros superiores del cerebro.

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G. Proteínas receptoras de siete dominios transmembranales que sensan moléculas específicas afuera de las células y que transducen información hacia el interior de las mismas, generando respuestas celulares.

RO: receptor olfatorio. Tipo particular de GPCRs que se localizan en los cilios de las NSO.

AOB: bulbo olfatorio accesorio. Se localiza en la parte dorso posterior del bulbo olfatorio, está altamente especializado en el procesamiento de información promotoras de conductas instintivas y de sobrevivencia.

RNA: ácido ribonucleico. Ácido nucleico formado por una sola cadena de ribonucleótidos, que codifica la información para la síntesis de proteínas.

CPE: Capa plexiforme externa. Capa anatómica del bulbo olfatorio, situada en la porción inferior de la GL, está conformada mayoritariamente por las dendritas de las GRC y los somas de algunas CMT y células en penacho.

SNC: Sistema nervioso central. Estructura que percibe estímulos sensoriales tanto del medio exterior como el interior, y que comanda respuestas a los mismos.

JGC: Células yuxtglomerulares. Conjunto de neuronas localizadas en la GL, que agrupa a diversos tipos entre los cuales se encuentran las PGC.

CAC: Células de axón corto. Interneuronas del bulbo olfatorio, localizadas principalmente en las capas GL y CPE, cuya característica notable es la presencia de un axón que llega a inervar regiones relativamente distantes del sitio donde se localiza su soma.

GABA: Acido γ -amino butírico. Neurotransmisor inhibitorio que regula la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso.

GAD: Glutamato Descarboxilasa. Enzima que cataliza la descarboxilación de glutamato para dar origen al neurotransmisor GABA. Existen dos isoformas en el SNC (65 y 67 kiloDaltons) de la misma enzima, codificadas por distintos genes.

DA: Dopamina. Neurotransmisor y hormona que modula la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso y que además ejerce funciones en el sistema neuroinmunoendocrino.

CB: Calbindina-D28k. Proteína de unión al ion calcio, asociada con neuronas inhibitoras.

CR: Calretinina. Proteína de unión a calcio, asociada al igual que CB, con neuronas inhibitoras.

TH: Tirosina hidroxilasa. Enzima que cataliza la conversión de L-tirosina hacia L-3,4-dihidroxifenilalanina, la cual es el paso limitante en la síntesis de las catecolaminas.

2-DG: 2-deoxiglucosa. Molécula de glucosa que tiene un grupo hidroxilo sustituido por hidrógeno en la posición 2, impidiendo así que continúe el proceso de glucólisis. Es utilizada como marcador de actividad metabólica.

fMRI: Imagenología por resonancia magnética funcional. Procedimiento que mide actividad cerebral al detectar cambios asociados en el flujo sanguíneo de la zona de interés.

COE: Conducta olfativa espontánea. Grupo de paradigmas conductuales que engloba aquellos que se refieren a la presentación de un aroma nuevo y la medición del tiempo que el animal lo olfatea

CER: Conducta etológicamente relevante. Grupo de paradigmas conductuales que engloba aquellos involucrados en procesos fisiológicos tales como embarazo, conductas de apareamiento, materna y agresiva, entre otras.

AOA: Aprendizaje olfativo asociativo. Grupo de paradigmas conductuales que engloba aquellos que evalúan la capacidad del animal de asociar un olor con una recompensa alimentaria o estímulo nocivo, y el cual puede ser operante o pasivo.

ADM: Antero dorso medial.

ADL: Antero dorso lateral

AVM: Antero ventro medial

PDM: Postero dorso medial

PDL: Postero dorso lateral

PVM: Postero ventro medial

PVL: Postero ventro lateral

MC: Pasillo lateral principal (de la caja de condicionamiento)

mg: Miligramo

kg: Kilogramo

BrdU: 5-bromo 2'-deoxi-uridina. Nucleósido sintético análogo a la timidina, el cual es utilizado comúnmente para detectar células proliferativas en tejidos vivos.

PB: Amortiguador químico a base de fosfatos.

PFA: Paraformaldehído.

PBT: Amortiguador a base de fosfatos adicionado con Triton X-100

SSC: Solución elaborada a base de citrato de sodio y cloruro de sodio, que a altas temperaturas es utilizada para desenmascarar antígenos para un procedimiento de inmunotinción.

HCl: Ácido clorhídrico.

TBS: Tampón a base de Tris

N.A.: Apertura numérica (del objetivo). Cono de aceptación de luz propio de cada objetivo; a mayor valor, mayor la cantidad de luz que permite pasar.

ANOVA: Análisis de varianza. Método matemático creado para probar la hipótesis de que las medias aritméticas de más de dos grupos poblacionales son iguales.

HSD: Diferencia estadística honestamente significativa (en prueba de Tukey). Procedimiento de comparaciones múltiples y prueba estadística utilizada en conjunción con la ANOVA para encontrar medias aritméticas que sean significativamente diferentes de las otras.

Abstract

At this time, it is widely accepted that, in adult mammals, there are two main neurogenic areas, the larger of them is located in the walls of subventricular zone (SVZ) including the rostral migratory stream, and the other is located in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. Adult newborn cells generated in the SVZ migrate towards the olfactory bulb (OB) where they are able to integrate -or not- to a preexistent neuronal network.

It has been suggested that the permanency of adult newborn neurons in the OB depends on their degree of activity associated with olfactory stimulation. However, it is also well known the positive effect of sensorial activity on the neuronal circuits that are being used. In the present study, we combined an olfactory operant conditioning with stereological counting to explore the influence of specific stimulation in the survival of both preexistent and adult newborn periglomerular (PG) cells and in differentiation of adult newborn neurons in the glomerular zone that process such stimulus. We didn't find influence of our behavioral task in survival of adult newborn cells, but we found that chronic sensory stimulation promotes the differentiation of adult newborn cells towards a specific gabaergic subtype. Also, we found a transitory increment in calretinin cells in rats subjected to our behavioral task; this indicates that sensory stimulation can modulate the relative proportions of at least one PG cell subtype, in specific conditions.

Key words: neurogenesis, periglomerular cells, glomerular layer, olfactory bulb, olfactory neurons, neuron integration, stereology.

Resumen

Durante la década de los 70 del siglo pasado, Joseph Altman realizó una serie de estudios que sugerían la existencia de zonas de proliferación de precursores neurales en el cerebro de roedores adultos. En décadas posteriores, estas observaciones fueron confirmadas y extendidas a otras especies de aves, [1], roedores [2] y primates [3-4]. Actualmente es aceptado que en los mamíferos existen dos áreas neurogénicas localizadas a lo largo de la zona subventricular (SVZ) rostral y en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Los neuroblastos generados en la zona subgranular maduran en células granulares y son incorporados al giro dentado. En cambio, aquellos originados en la SVZ migran hacia el bulbo olfatorio a través de la vía migratoria rostral (RMS) y se diferencian en neuronas granulares y periglomerulares [5].

Aunque se ha avanzado sustancialmente en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la generación y posterior migración de las nuevas neuronas hacia sus localizaciones finales, el papel de la experiencia sensorial sobre la determinación del fenotipo de las nuevas neuronas es aun controvertido [6]. Es por ello que en el presente estudio se combinó un condicionamiento operante olfatorio con métodos de conteo estereológicos para investigar la influencia de la estimulación olfativa específica y crónica sobre la supervivencia y la determinación fenotípica de las neuronas periglomerulares nuevas y preexistentes en la región de la capa glomerular que procesa dicho estímulo. Con esta estrategia, no se documentaron modificaciones de la sobrevivencia de las neuronas periglomerulares adultas nuevas, pero sí de su determinación fenotípica en respuesta al condicionamiento operante olfatorio. Además, el condicionamiento operante olfativo promovió el incremento transitorio de células periglomerulares positivas a calretinina. Estos resultados apoyan que la estimulación sensorial condicionada puede modular las proporciones relativas de al menos un subtipo de células periglomerulares.

I. Introducción

1. Sistema Olfatorio

El **sistema olfatorio** está encargado de la detección de moléculas químicas difusibles que se encuentran en el medio ambiente. Actualmente sabemos que está constituido por varios subsistemas localizados en la cavidad nasal y que están enfocados a discriminar distintos aspectos de la olfacción [7]. Una de sus principales características radica en el notable grado de plasticidad neuronal que presenta, ya que diversos elementos de este sistema presentan la capacidad de regeneración, incluso dentro del cerebro. Esto además de ser interesante genera ciertas interrogantes, ya que una proporción importante de las neuronas que se producen en el cerebro adulto tienen que incorporarse a circuitos neuronales previamente establecidos en este sistema. Los neuroblastos que son generados constitutivamente en la zona subventricular de los ventrículos laterales migran hacia el bulbo olfativo, en donde aproximadamente la mitad de ellos sobrevive durante largo tiempo. Como se verá más adelante, el papel de la actividad neuronal inducida por la olfacción parece ser decisivo en la incorporación de las nuevas neuronas sobrevivientes. Debido a la estrecha relación funcional que guarda cada uno de los elementos del sistema olfatorio, en este apartado se presenta una breve descripción anatómica y fisiológica de cada uno de ellos. Además, se describirá el concepto de los mapas de olor y su importancia para la olfacción.

1.1 Mucosa Olfatoria

Las moléculas químicas difusibles son detectadas por un tipo especial de neurona, las **neuronas sensoriales olfatorias** (NSO) las cuales están situadas dentro de la cavidad nasal. Las NSO son bipolares, siendo el glutamato su neurotransmisor principal. Poseen una única dendrita que se extiende hacia la superficie y que termina en una estructura parecida a una bolsa desde la cuál emanan de 20 a 30 cilios. Alrededor de 6-10 millones de ellas forman el neuroepitelio de la **mucosa olfatoria** (MO), la que recubre a una serie de láminas cartilagosas situadas en la parte posterior superior de la cavidad nasal, llamadas **turbinales** (Fig. 1). Las NSO que

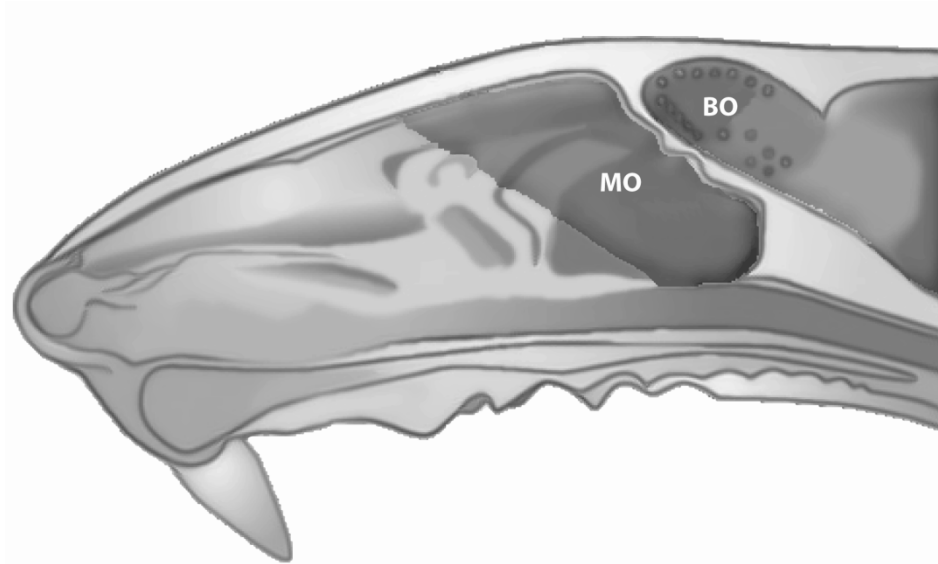


Figura 1 Esquema que ilustra la localización del sistema olfatorio en la cavidad nasal de roedores. Corte sagital de cabeza de rata donde se ilustra el epitelio o mucosa olfatoria (MO) y el bulbo olfatorio (BO). La mucosa olfatoria se localiza en la región posterior de la cavidad nasal recubriendo las estructuras conocidas como turbinas. El bulbo olfatorio se localiza en el polo frontal del cerebro. Ambas estructuras están divididas físicamente por la placa cribiforme. No obstante ello, se establece la comunicación neural entre ellas mediante el nervio olfatorio. Adaptado de [8].

mueren son reemplazadas a lo largo de la vida; esta característica de regeneración neuronal periférica es casi exclusiva de las NSO [9]. Además de las NSO, la MO está constituida por las células sustentaculares, las células basales y las glándulas de Bowman (Fig. 2). Las células sustentaculares son un tipo especial de célula glial que posee microvellosidades en su segmento superior. Las células basales son células troncales que generan a los tres tipos celulares de la MO. Finalmente, las glándulas de Bowman son las encargadas de la limpieza de los cilios olfatorios así como del recambio del moco del epitelio olfatorio. Si bien la estructura de la MO presenta una apariencia celular relativamente homogénea, las neuronas que la conforman muestran una gran heterogeneidad molecular con relación a los receptores odoríferos que expresan.

1.2 Receptores odoríferos

Los **receptores odoríferos** se localizan en los cilios de las NSO; todos los receptores pertenecen a una gran familia multigénica cuyos miembros codifican para alrededor de 1000 **receptores acoplados a proteínas G** [10; Fig. 3]. Actualmente se cree que cada una de las NSO expresa sólo uno o dos receptores odoríferos, los cuales son altamente específicos para pequeños fragmentos de moléculas volátiles, conocidos como *odotopos*. La mayoría de las moléculas químicas difusibles poseen al

menos un par de odotopos, lo cual sugiere que una gran diversidad de NSO es activada simultáneamente con cada inhalación. Topográficamente, la MO ha sido dividida en cuatro cuadrantes (Fig. 4). Las NSO que expresan un mismo tipo de receptor se encuentran dispersas dentro de un solo cuadrante [10-11].

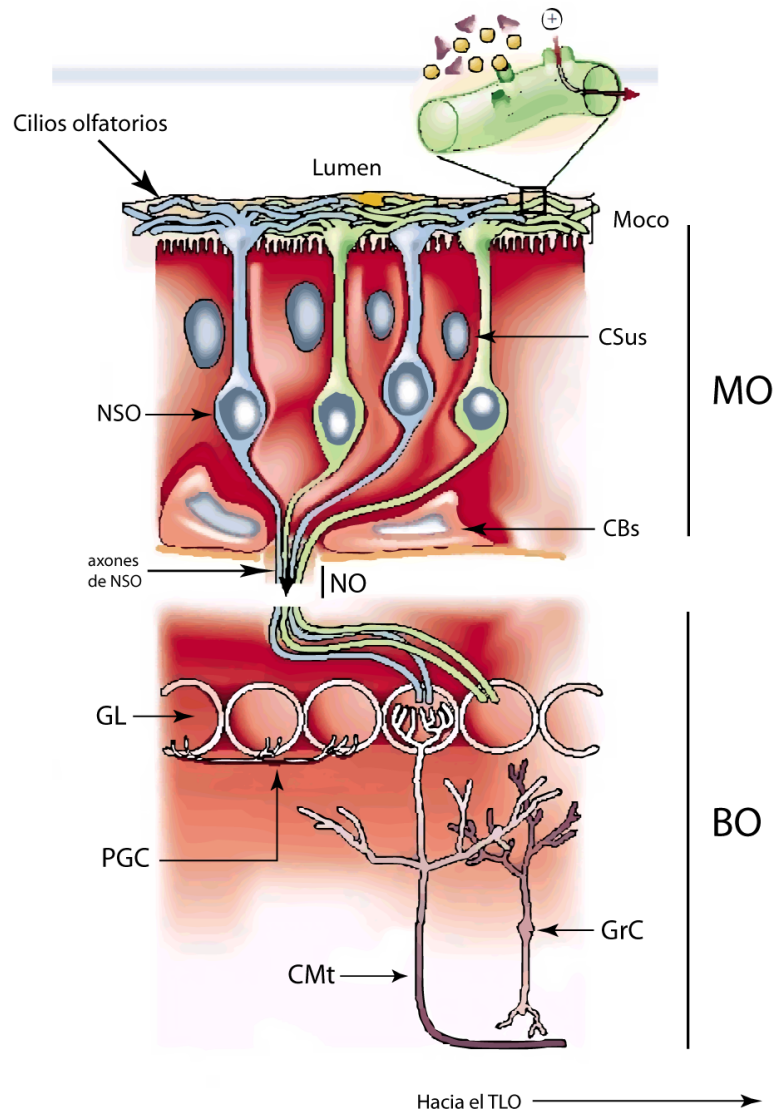


Figura 2 Dibujo esquemático que ilustra la relación anatómica de la mucosa olfatoria (MO) y el bulbo olfatorio (BO). En la mucosa olfatoria se encuentran tres tipos celulares, las neuronas sensoriales olfatorias (NSO), las células sustentaculares (CSus) y las células basales (CBs). Las NSO poseen cilios “olfatorios” que se encuentran embebidos en moco y dispersos sobre la superficie de la mucosa olfatoria. Es en los cilios donde se localizan los receptores olfatorios que interactúan con los odorantes provenientes del exterior. Las NSO proyectan sus axones hacia el bulbo olfatorio, dando origen al nervio olfatorio (NO); dichos axones establecen sinapsis con las dendritas de las células mitrales y las células en penacho (CMt), dando origen a su vez a los glomérulos olfatorios (GL). Las interacciones entre las NSO y las CMt son moduladas por las interneuronas del bulbo olfatorio, las células periglomerulares (PGC) y las células granulares (GrC). Las CMt proyectan sus axones hacia núcleos centrales del cerebro, dando origen al tracto olfatorio (TLO). Adaptado de [8]

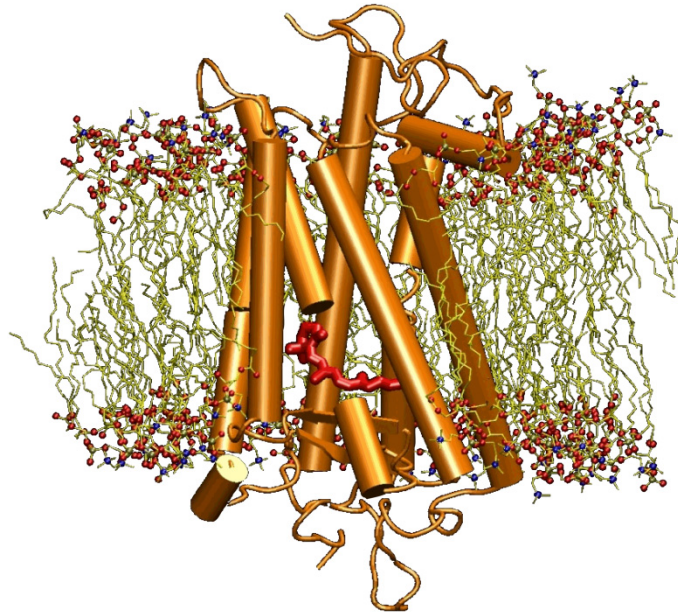


Figura 3 Modelo molecular de la estructura de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Los GPCRs se encuentran embebidos en la membrana celular; para el caso de los receptores olfatorios, estos se encuentran en la membrana ciliar. Cada receptor consta de siete dominios transmembranales así como de dominios intra y extracelulares. El dominio extracelular es el que interactúa con el odotopo, ocasionando un cambio conformacional en el receptor que desencadena una cascada de señalización intracelular que desemboca en la generación de un potencial de acción por la NSO. Existen alrededor de mil subtipos distintos de receptores olfatorios, cada uno expresado por una subpoblación de NSO. Adaptado de <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/spotlight/>

1.3 Nervio Olfatorio

Una vez que los axones de las NSO atraviesan la lámina basal del neuroepitelio olfatorio, estos fasciculan en mesaxones rodeados por células gliales envolventes especializadas, dando origen al **nervio olfatorio**. Es interesante notar que el nervio olfatorio, al igual que las NSO, es capaz de regenerarse y reconectarse, aunque se ha mostrado que los axones pueden re-inervar a regiones adyacentes a las cuales inervaban originalmente [12-13]. En este sentido, se le ha atribuido a las células gliales envolventes la capacidad de promover el crecimiento y regeneración axonal de las NSO, e incluso, de otras regiones [14]. Después de atravesar la placa cribiforme, los axones entran al **bulbo olfatorio** y desembocan en los **glomérulos olfatorios** (fig. 5A).

1.4 Bulbo Olfatorio

1.4.1 Glomérulos olfatorios

Los glomérulos son las estructuras más representativas del bulbo olfatorio. Cada

uno de ellos mide entre 40 y 100 μm de diámetro. Son estructuras esféricas ricas en neuropilo formados cada uno por los axones de miles de NSO, las dendritas de aproximadamente 50 neuronas mitrales y *en penacho*, dendritas y axones de interneuronas locales, fibras interglomerulares, fibras centrifugas, además de los proce-

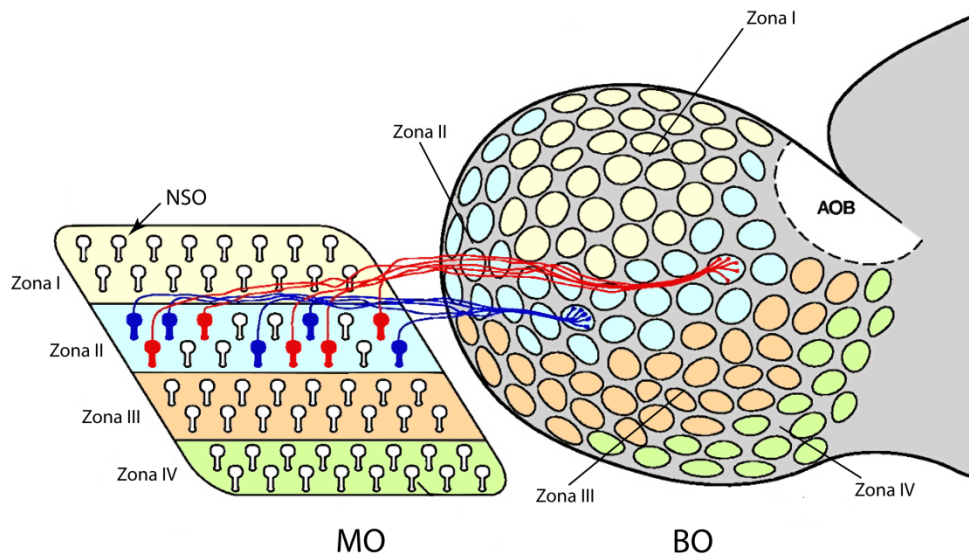


Figura 4 Dibujo esquemático que ilustra la organización topográfica de las conexiones establecidas entre la mucosa olfatoria (MO) y el bulbo olfatorio (BO). Las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) que expresan un determinado subtipo de receptor odorífero se encuentran dispersas dentro de una zona definida (Zonas I-IV). De igual manera, el BO está dividido en cuatro zonas equivalentes a aquellas presentes en la MO. Las NSO que expresan un mismo receptor convergen en un solo glomérulo olfatorio. Adaptado de [15].

sos de células gliales y vasos sanguíneos. Sin embargo, los axones de las NSO no contactan cualquier glomérulo; proyectan de manera específica a ciertos glomérulos en los que incluso el RNA mensajero de su subtipo de receptor odorífero está siendo expresado [16-17]. De manera interesante, durante el desarrollo posnatal la formación de los glomérulos es modulada por la actividad sensorial, generándose un mayor número de ellos en condiciones de estimulación exacerbada [18].

1.4.2 Anatomía del Bulbo Olfatorio

El bulbo olfatorio también recibe aferentes desde las neuronas piramidales de la corteza olfatoria las cuales terminan en la capa granular (fig. 5A). De igual manera, el

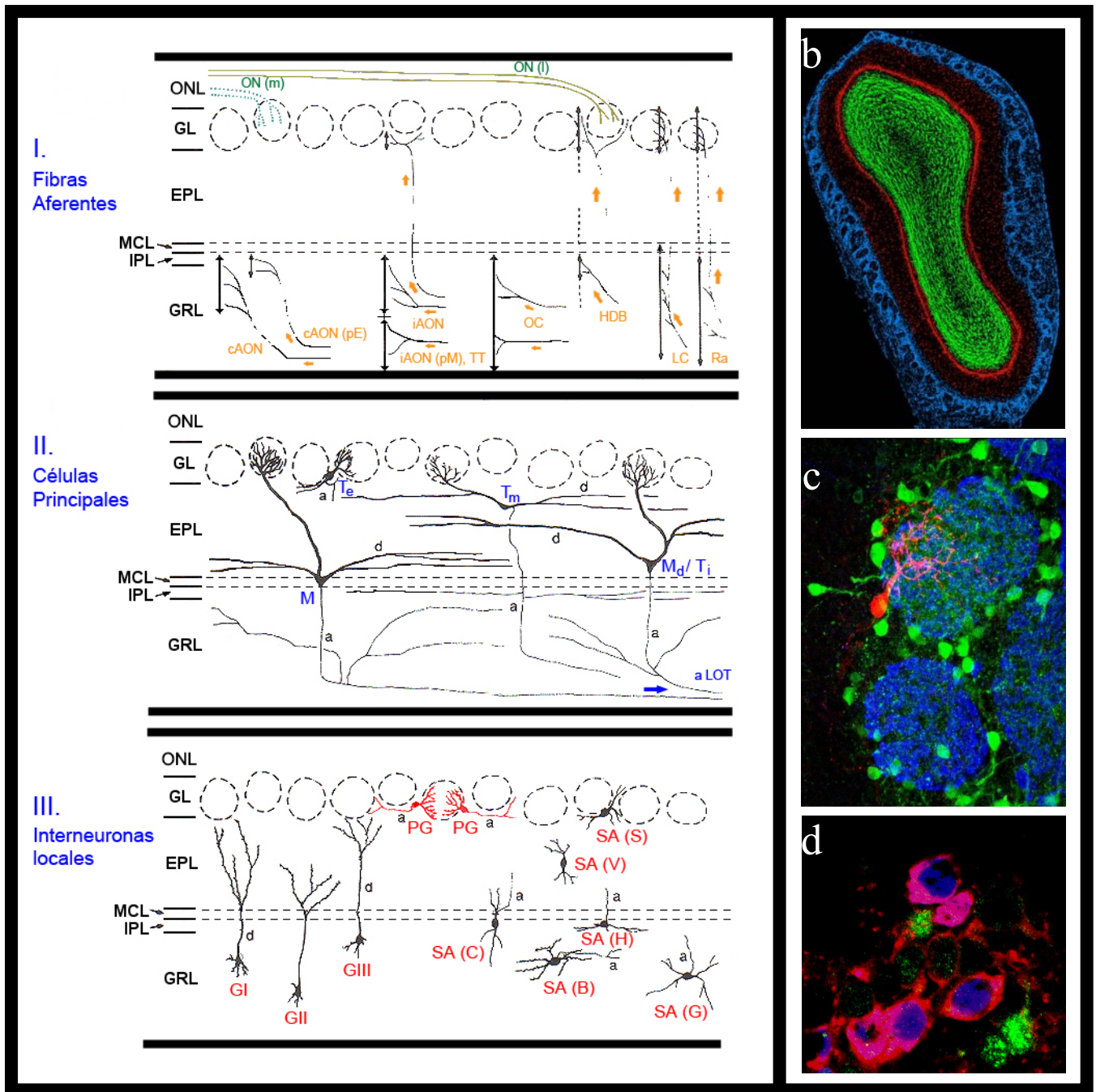


Figura 5 El bulbo olfatorio de mamíferos. a) Esquema que ilustra la citoarquitectura del bulbo olfatorio, de arriba abajo, capa del nervio olfatorio (ONL), capa glomerular (GL), capa plexiforme externa (EPL), capa de las células mitrales (MCL), capa plexiforme interna (IPL) y capa granular (GRL). Además, se ilustra la distribución de los distintos elementos neuronales presentes en el bulbo olfatorio, clasificados en (I) fibras aferentes, (II) células principales e (III) interneuronas locales; En (I), las aferencias provenientes de la mucosa olfatoria se muestran en color verde, mientras que las que provienen de centros cerebrales superiores en color naranja; en (II) se esquematizan las células mitrales (M, Md) y las *en penacho* internas (Ti), mediales (Tm) y externas (Te); en (III) se muestran las interneuronas granulares (tres subtipos, GI-III), de axón corto (SA, seis subtipos, Schwann (S), van Gehuchten (V), Hensen (H), Clandins (C), Blanes (B) y Golgi (G)) y las periglomerulares (PGC); b) corte coronal de bulbo olfatorio de roedor teñido con DAPI y pseudo coloreado para ilustrar las distintas capas

celulares, en verde se ilustra la GRL, en rojo la MCL y en azul las capas GL y ONL; los espacios oscuros corresponden a las capas EPL e IPL; c) glomérulos olfatorios marcados con la proteína marcadora olfatoria (azul), PGC positivas a tirosina hidroxilasa (verde) y una Te marcada con biocitina (rojo); d) acercamiento a PGC, se muestran interneuronas positivas a la proteína de núcleo neuronal (verde), glutamato descarboxilasa isoformas 65 y 67kDa (rojo) y calretinina (azul). Abreviaturas: (ON)m, nervio olfatorio, región medial; (ON)l, nervio olfatorio, región lateral; núcleo olfatorio anterior ipsilateral (AONi), contralateral (AONc), (pE), pars externa, (pM), pars medialis; TT, tenia tecta; OC, corteza olfatoria; HDB, porción horizontal de la banda diagonal; LC, locus coeruleus; Ra, núcleos del raphé. a) adaptado de [19]

núcleo olfatorio anterior manda proyecciones hacia esta misma capa y hacia la capa glomerular. Desde el tallo cerebral llegan fibras noradrenérgicas provenientes del **locus coeruleus**, así como serotoninérgicas provenientes del **complejo del raphé rostral**; ambas inervan principalmente a la **capa glomerular** (fig. 5A).

La salida de información del bulbo olfatorio está dada por los axones de las **células mitrales** y las **células en penacho**, ambas glutamatérgicas (fig. 5B). En mamíferos, los somas de las células mitrales (15-30 μm de diámetro) se localizan en una lámina delgada (**capa de las células mitrales**) a 200-400 μm de la capa glomerular. Cada célula mitral origina una dendrita primaria, la cual atraviesa la **capa plexiforme externa** (CPE) y termina dentro de un glomérulo elaborando un penacho. El penacho tiene un diámetro de 50-150 μm de diámetro y se extiende en todo el glomérulo. Cada célula mitral da origen a varias dendritas secundarias que se ramifican discretamente en la CPE. Los axones de las células mitrales forman parte importante del **tracto olfatorio lateral**. Dentro del bulbo olfatorio, los axones de las células mitrales dan origen a **colaterales recurrentes**, las cuales permanecen en la **capa granular** y en la **capa plexiforme interna**. Las **células en penacho** (15-20 μm de diámetro) están localizadas más superficialmente en la CPE (fig. 5B); esta denominación es genérica puesto que se han descrito diversos subtipos para estas células. Sin embargo, 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.

1.4.2.1 Células granulares

Debajo de la capa de células mitrales se encuentra una capa gruesa que contiene los somas de las **células granulares** (GRC), interneuronas cuyo tamaño (6-8 μm de diámetro) las coloca como una de las neuronas más pequeñas del SNC. Los somas de las GRC se encuentran agrupados en la **capa granular** (fig. 5C). Cada GRC da origen a un proceso superficial que se extiende radialmente a través de la superficie y se

ramifica y termina en la CPE; su campo de ramificación se extiende entre 50-200 μm . 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, y algunas GRC superficiales expresan además calretinina. Mientras que las células mitrales y las células *en penacho* se diferencian prenatalmente, las GRC son generadas también durante el periodo postnatal y durante la fase adulta, llegando a conformar aproximadamente el 90% de las interneuronas presentes en el BO [5,20-22].

1.4.2.2 Células yuxtglomerulares

Además de células gliales y vasos sanguíneos, alrededor de los glomérulos se encuentra un grupo heterogéneo de neuronas que en conjunto se conocen como **neuronas yuxtglomerulares (JGC)**. Las JGC están clasificadas en tres tipos distintos de neuronas: 1) **células periglomerulares (PGC)**; 2) **células superficiales de axón corto (CAC)** y 3) **células *en penacho* externas**. Recientemente, Kosaka y Kosaka (2011) han sugerido dos subtipos más de JGC, las JGC asociativas inhibitoras y las JGC asociativas excitadoras. De las JGC, las células periglomerulares 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, llegando a extenderse hasta glomérulos situados a grandes distancias de sus somas (se ha reportado que hasta 5000 μm).

1.4.2.3 Células periglomerulares

Las PGC son interneuronas con tamaño similar a las GRC (6-8 μm de diámetro). Cada PGC posee una pequeña y tupida dendrita que arboriza alrededor de 50-100 μm dentro de un glomérulo; siendo muy raras las PGC que inervan a dos o más glomérulos. Sus ramas dendríticas se conectan con las terminales de los axones olfatorios y/o las ramas de las células mitrales y *en penacho* (fig. 1C). Generalmente, la capacitancia de la membrana de la PGC de rata es de 7.2 ± 0.2 pF, su potencial de membrana de -52 ± 7 mV y su resistencia de 750 ± 63 M Ω [23]. El axón de las PGC se distribuye lateralmente dentro de regiones extraglomerulares, llegando a extenderse hasta cinco glomérulos posteriores.

Mediante estudios realizados con ratones transgénicos a los cuales se les indujo sobre-expresión de la enzima glutamato descarboxilasa isoforma 67 kDa (GAD 67), se ha mostrado que todas las PGC son gabaérgicas [24]. No obstante lo anterior, las PGC presentan una gran heterogeneidad química. Actualmente se han descrito doce sustancias presentes en las PGC [25-31]; siete neuroactivas (GABA, dopamina (DA), encefalina, hormona liberadora de la tirotropina, óxido nítrico, somatostatina y colecistoquinina), y cinco proteínas que unen calcio (calbindina (CB), calretinina (CR), neurocalcina, parvalbúmina y secretagogina). Del total de PGC, aproximadamente la mitad han sido clasificadas químicamente en tres grupos distintos que casi no se sobreponen: 1) PGC inmunopositivas a GABA / glutamato descarboxilasa isoforma 65 kDa (GAD 65) (20%), 2) PGC positivas a calretinina (20%) y 3) PGC positivas a calbindina (10%). Recientemente se ha sugerido que todas las PGC que expresan DA o la enzima limitante en su síntesis, tirosina hidroxilasa (TH), coexpresan GAD 67, y que deberían catalogarse como CAC debido a que muestran conexiones a glomérulos muy lejanos [32]. Del resto de los otros marcadores químicos se desconoce actualmente su porcentaje relativo, y no se descarta que existan otros subtipos más aún no descritos.

Así como las PGC son heterogéneas químicamente, también lo son estructuralmente. Unos cuantos ejemplos de lo anterior son 1) algunas PGC no presentan axón 2) las ramificaciones dendríticas varían en número y extensión de célula a célula; 3) los sitios de contactos sinápticos dentro del glomérulo pueden estar distribuidos homogéneamente entre los axones de las NSO y las dendritas de las células mitrales o pueden ser solo a los axones o solo a las dendritas; 4) las PGC pueden presentar o no uniones estrechas con las dendritas de las células mitrales y *en penacho* [33].

Como resultado de la heterogeneidad química y estructural, es probable que derive una gran heterogeneidad eléctrica; sin embargo, poco se ha podido demostrar de esto debido a la gran dificultad técnica de realizar registros electrofisiológicos a las PGC en cerebros adultos. No obstante, mediante la caracterización de diferentes conductancias de K^+ en etapas postnatales tempranas, se han logrado identificar al menos tres subpoblaciones de PGC: R, N y X [23].

Las PGC también son generadas durante el periodo perinatal y durante la fase adulta, solo que en menor proporción con relación a las GRC (1 por cada 100). De manera interesante, recientemente se ha mostrado que las PGC son generadas de manera específica en tiempo y región; se ha determinado que la gran mayoría de PGC positivas a CB son generadas desde el día 15.5 hasta el 17.5 embrionarios en la región ventral de la zona subventricular (SVZ) Las positivas a TH son generadas desde el día 15 embrionario hasta el día postnatal 30 en la región dorsal de la SVZ. Finalmente, las positivas a calretinina son generadas principalmente a partir del día 30 postnatal en la zona anteroventral de la SVZ [34-38].

1.5 Mapas de olor en el bulbo olfatorio

Los glomérulos son la unidad funcional mínima del bulbo olfatorio. Como ya se explicó anteriormente, cada glomérulo es altamente específico para porciones pequeñas de moléculas odoríferas. Así, moléculas complejas promueven la activación simultánea de distintos glomérulos, de tal manera que generan un patrón de activación espacial característico para cada olor [39-42]. Para evaluar la actividad inducida por moléculas odoríferas en el bulbo olfatorio se han utilizado distintas estrategias experimentales que incluyen marcaje con [^3H] 2-deoxiglucosa (2-DG), la activación de c-Fos, la inyección en la MO de colorantes sensibles a voltaje, la imagenología de Ca^{2+} , de señales intrínsecas, de resonancia magnética funcional de alta resolución (fMRI) y de microscopía multifotónica, así como registros electroencefalográficos y electrofisiológicos de célula única y de potencial de campo [43-51]. Un ejemplo de las técnicas de mapeo se muestra en la figura 6. En conjunto, estas estrategias han acuñado y consolidado el concepto de **mapas de olor**, denominación que engloba la actividad **espacial** y **temporal** glomerular en respuesta a estímulos odoríferos.

2. Neurogénesis en la Zona Subventricular de animales adultos

2.1 Generación y migración de nuevas neuronas hacia el bulbo olfatorio

En el cerebro de los mamíferos adultos existen **células troncales neurales** que residen a lo largo de la cavidad ventricular. Particularmente se ha descrito la **zona subventricular (SVZ)** de los ventrículos laterales como una de las que constitutivamente da origen a precursores neuronales en condiciones naturales [2,53-54]. Estos precursores migran tangencialmente formando una especie de cadenas que corren longitudinalmente a través de una estructura conocida como **vía migratoria rostral (RMS)** hacia el **bulbo olfatorio** [55]. Varios reportes han mostrado que la generación de interneuronas también se lleva a cabo en el RMS [56-59].

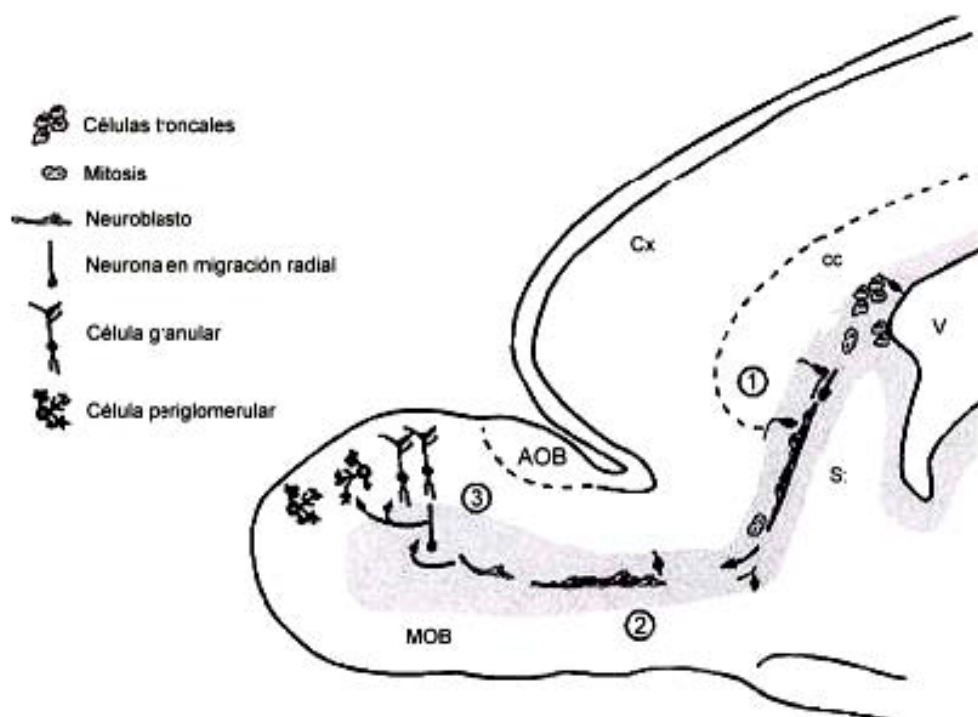


Figura 7 Esquema que ilustra la generación, migración y diferenciación de nuevas neuronas en el cerebro de roedores adultos. El centro generador de nuevas células es la **zona subventricular (SVZ)**. Las nuevas células migran a través de la **vía migratoria rostral (RMS)** hacia el **bulbo olfatorio**, estructura en donde se diferencian terminalmente en células granulares y periglomerulares. Adaptado de [60].

Una vez en el bulbo, las nuevas células ascienden radialmente hacia las capas granular y glomerular, mostrando características fenotípicas de interneuronas granulares y periglomerulares respectivamente (Fig. 7) [5,20,61].

Se ha calculado que alrededor de 10,000 células nuevas arriban al bulbo olfatorio diariamente [62], de las cuales, aproximadamente 90-97% de ellas son GRC y el resto PGC [63]. Además, se ha calculado que alrededor del 0.5% de las PGC se incorpora diariamente a la capa glomerular durante la vida adulta [64]. Es importante mencionar que una GRC presenta características morfológicas de interneurona madura después de 15 días de haberse generado [65]; en contraste, el tiempo de maduración funcional de una PGC llega a tomar de 40 hasta 90 días después de haber sido generada [63-64]. Existen reportes de que existe un alargamiento volumétrico limitado en el bulbo olfatorio a lo largo del tiempo de vida [66]. Aunque esto último puede ser explicado en parte por la continua migración de nuevas células, el alto número de nuevas neuronas generadas diariamente resultaría lo suficientemente elevado como para promover un crecimiento anatómico más importante del bulbo olfatorio, suceso que no ocurre. Dicho equilibrio debe generarse por la presencia de procesos de muerte celular en el bulbo olfatorio [62-63,65,67-68]. Se han observado comportamientos similares de eliminación en las capas granular y glomerular, en la que se muestra un decremento de alrededor del 50% del número de nuevas células a los 3 meses de haberse generado, cantidad que permanece estable al menos hasta 18 meses después [63-64].

2.2 Actividad Sensorial y Neurogénesis

Es importante mencionar que, en roedores, la mayor cantidad de interneuronas del BO son generadas durante la primera semana de vida postnatal [69]. Además, las interneuronas nacidas durante este periodo sobreviven durante más tiempo en comparación con las que son generadas durante el periodo adulto [70-71]. Sin embargo, éstas últimas son más plásticas estructuralmente, además de ser más excitables que las preexistentes incluso una vez incorporadas a la red neuronal [72]. Esto sugiere la existencia de al menos dos poblaciones de interneuronas, una constante y una dinámica. En condiciones naturales, aproximadamente la mitad de las células que se generan durante la fase adulta sobrevive durante un largo periodo y la otra mitad desaparece [63]. Uno de los factores que se ha propuesto que modula el desarrollo y la supervivencia neuronal es la actividad asociada con la estimulación sensorial [73]. Con relación al bulbo olfatorio adulto, se ha sugerido que la actividad eléctrica provocada es la encargada de modular la supervivencia de las nuevas

interneuronas. Al respecto, Yamaguchi *et al* [74] demostraron la existencia de un periodo crítico para la supervivencia de las nuevas neuronas dependiente de la actividad sensorial, cuya duración es de aproximadamente 15 días posteriores a la generación de las nuevas células. Por otro lado, Petreanu *et al* [65], utilizando un ratón anósmico, mostraron que la falta de actividad eléctrica relacionada con la estimulación olfativa en el bulbo olfatorio se asocia a una reducción en el número de nuevas neuronas en esta estructura; asimismo el área y grado de complejidad del penacho dendrítico de las células granulares fueron menores en los ratones anósmicos. El efecto de estimulación sensorial ya había sido descrito previamente para las PGC positivas a DA. En ellas, se observó que la deaferentación afecta su supervivencia, aunque de manera reversible [75-77]. En este mismo sentido, se ha confirmado ahora que las PGC (CAC) DA - GAD 67 son afectadas por la deaferentación [78]. De esta manera, las evidencias anteriores sugieren que la actividad eléctrica evocada (transmisión del estímulo odorífero) juega un papel importante sobre la supervivencia y desarrollo de las nuevas neuronas.

2.3 Conducta Olfativa y Neurogénesis

De manera complementaria a lo anterior, algunos grupos han empleado diversos tipos de pruebas conductuales para intentar dilucidar el efecto de la estimulación olfativa sobre la supervivencia de las nuevas neuronas. Actualmente, se han clasificado los diferentes paradigmas conductuales utilizados en tres grupos principales: conducta olfativa espontánea (COE), conducta olfativa etológicamente relevante (CER) y aprendizaje olfativo asociativo (AOA) [6]. La COE se refiere a la presentación de un olor nuevo y la medición del tiempo que el animal lo olfatea; la CER agrupa al estudio de olores involucrados en procesos fisiológicos tales como el embarazo, conducta de apareamiento, reconocimiento de las crías, o conducta agresiva, entre otros; finalmente, el AOA es aquel en el cual se evalúa la capacidad del animal de asociar un olor con una recompensa alimentaria o estímulo nocivo, y el cual puede ser operante o no operante (pasivo). Sin embargo los resultados que se han obtenido en los tres paradigmas han resultado ser contradictorios. Por ejemplo, para el caso de COE, diversos estudios han mostrado que existe un incremento transitorio en el número de células nuevas en el bulbo olfatorio de ratones sometidos a ambientes enriquecidos en olores [79-81]. Otras aproximaciones experimentales con tratamientos antimitóticos han

mostrado que los animales tratados presentan menos sensibilidad en el umbral de detección de los olores con relación a animales control, y que incluso la memoria olfativa de corto plazo se ve afectada [82-83], mientras que otros han descrito que dichos tratamientos no afectan la función olfativa [84].

Para el caso de CER se han reportado resultados contradictorios que parecen subyacer a la estrategia experimental utilizada. Por ejemplo, Shingo *et al* [85] describieron que el embarazo induce un incremento tanto en la proliferación en SVZ como en el número de nuevas interneuronas presentes en el BO mediado por prolactina, mientras que Feierstein *et al.* [86] irradiaron la SVZ para eliminar la generación de nuevas células y no encontraron diferencias en la conducta materna.

Finalmente, en el caso de AOA se ha documentado que algunos de estos paradigmas tienden a incrementar temporalmente la supervivencia de las nuevas células [87-89], pero otros estudios realizados en modelos genéticos en los que se eliminan neuroblastos y se les realiza AOA se ha visto que no hay diferencias funcionales entre controles y experimentales, lo que sugiere que las nuevas células no contribuyen de manera significativa en estos paradigmas [71,82,90].

Para concluir con este apartado, cabe mencionar que la mayoría de los análisis anteriores fueron hechos con GRC y no con PGC, por lo que la influencia de la experiencia sensorial sobre su supervivencia, o sobre si cambian las proporciones de sus diferentes linajes permanece prácticamente desconocido.

II. Planteamiento del problema

Por años se ha pensado que la actividad sensorial tiene efectos positivos directos sobre la neurogénesis olfativa. Si bien existe evidencia que apoya esta noción, también existe evidencia en contra. Aunado a lo anterior, se desconoce si en la capa glomerular del bulbo olfatorio, las subpoblaciones de PGC pueden ser modificadas por la actividad sensorial. Tomando en cuenta los antecedentes previamente expuestos, el presente trabajo se enfocó en evaluar el papel de la estimulación sensorial crónica asociada a un estímulo condicionado sobre la supervivencia y determinación fenotípica de PGC olfativas con el objeto de contribuir a resolver estas preguntas.

III. Hipótesis

La estimulación crónica específica de la vía olfatoria modificará la tasa de supervivencia y diferenciación de células periglomerulares nuevas y preexistentes en los glomérulos que procesan dicho estímulo.

IV. Objetivos Generales y Particulares

Objetivo General I

Realizar el mapa de actividad celular de la capa glomerular del bulbo olfatorio en ratas adultas, a partir de la estimulación con el aroma hexanal.

Objetivo particular I

1. Establecer el número y la distribución de **células periglomerulares** activadas en ocho regiones de la capa glomerular del bulbo olfatorio de ratas adultas estimuladas con hexanal, mediante marcaje inmunohistoquímico contra la proteína c-Fos, métodos de conteo estereológico y de reconstrucción tridimensional utilizando el programa NeuroLucida.

Objetivo General II

Estudiar las proporciones relativas de las neuronas nuevas y preexistentes en la zona activada con hexanal de la capa glomerular del bulbo olfatorio en ratas adultas.

Objetivos particulares II

1. Establecer el número de **nuevas células periglomerulares** en la **zona activada con hexanal** de la capa glomerular del bulbo olfatorio de ratas adultas al mes y a los tres meses posteriores a las inyecciones con **BrdU**, mediante marcaje inmunohistoquímico, utilizando microscopía de fluorescencia y técnicas de análisis estereológico.

2. Establecer la **proporción** de los distintos linajes de **neurona periglomerular** preexistentes en la zona **activada con hexanal** de la capa glomerular del bulbo olfatorio de ratas adultas al mes y a los tres meses posteriores a las inyecciones con **BrdU**, mediante inmunohistoquímica para marcadores de neurona madura periglomerular [tirosina hidroxilasa (TH), glutamato descarboxilasa (GAD), calbindina (CB) y calretinina (CR)], utilizando microscopía de fluorescencia y técnicas de análisis estereológico.

Objetivo General III

Estudiar las proporciones relativas de las neuronas nuevas y preexistentes en el bulbo olfatorio consecutivas a la activación glomerular asociada a un estímulo olfativo específico en ratas adultas.

Objetivos particulares III

1. Establecer el número de **nuevas células** periglomerulares en la zona activada por hexanal de la capa glomerular del bulbo olfatorio de ratas adultas **control** y **expuestas crónicamente a hexanal** mediante el marcaje inmunohistoquímico para BrdU al mes y a los tres meses posteriores a las inyecciones con BrdU, utilizando microscopía de fluorescencia y técnicas de análisis estereológico.
2. Establecer la **proporción** de los distintos linajes de **neurona periglomerular** preexistentes en la **zona activada por hexanal de la capa glomerular** del bulbo olfatorio de ratas adultas **control** y **expuestas crónicamente a hexanal**, mediante inmunohistoquímica para marcadores de neurona madura periglomerular [tirosina hidroxilasa (TH), glutamato descarboxilasa (GAD), calbindina (CB) y calretinina (CR)], utilizando microscopía de fluorescencia y técnicas de análisis estereológico.

Objetivo General IV

Estudiar las proporciones relativas de diferenciación de las neuronas nuevas en la zona activada por hexanal consecutivas a la activación glomerular asociada o no a un estímulo olfativo específico de la capa glomerular del bulbo olfatorio en ratas adultas.

Objetivo particular IV

1. Establecer la proporción de **nuevas células** periglomerulares que colocalicen con marcadores de neurona madura periglomerular [tirosina hidroxilasa (TH), glutamato descarboxilasa (GAD), calbindina (CB) y/o calretinina (CR)] en la zona activada por hexanal de la capa glomerular del bulbo olfatorio de ratas adultas **control** y **expuestas crónicamente a hexanal** mediante el marcaje inmunohistoquímico para BrdU y los distintos linajes al mes y a los tres meses posteriores a las inyecciones con BrdU, utilizando microscopía de fluorescencia y técnicas de análisis estereológico.

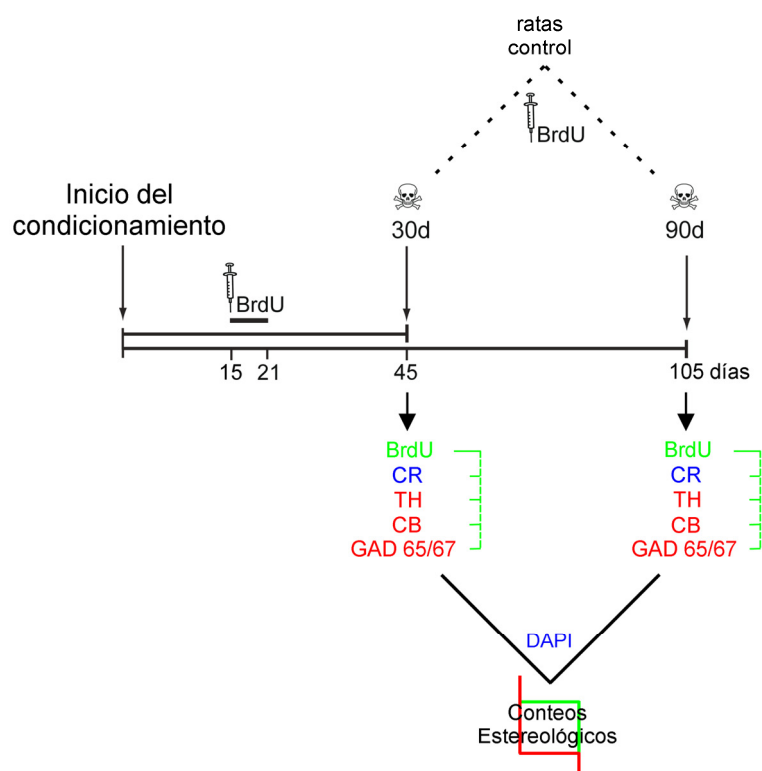


Figura 8. Diseño experimental. Se utilizaron tres grupos de ratas (control, habituado al laberinto y condicionado al odorante, ver detalles en materiales y métodos), a los cuales se les inoculó BrdU y se sacrificaron a los 30 y 90 días posteriores a las inyecciones. Se realizaron co-inmunofluorescencias contra BrdU y marcadores de linaje periglomerular (CR, TH, CB y GAD 65/67). Estas se contratiñieron con DAPI y posteriormente se cuantificaron en la zona de la capa glomerular del bulbo olfatorio que respondió al odorante.

V. Materiales y Métodos

1. Animales

Para realizar los experimentos descritos en este proyecto se utilizaron ratas macho de la **cepa Wistar** de 90 días de edad provenientes de la colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los animales se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación (12 horas luz / 12 horas oscuridad) controladas y tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*, con excepción de los grupos de ratas sometidas a condicionamiento operante (ver abajo).

2. Obtención de las muestras

Los animales utilizados para cada procedimiento (ver tratamientos abajo) fueron anestesiados con pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso corporal). Después fueron sometidos a perfusión intracardiaca retrógrada, se lavó el sistema sanguíneo con 0.15M NaCl y posteriormente se fijó el tejido con 4% paraformaldehído {4% PFA, [Sigma-Aldrich (Sigma), St. Louis, MO, EUA]} disuelto en amortiguador de fosfatos (0.1M, PB) pH 7.4. Los animales fueron decapitados y los cerebros fueron 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 1-3 semanas, se cambiaron a viales con una solución de 30% sacarosa en PB pH 7.4 a 4°C. Cuando las muestras descendieron al fondo del frasco, se congelaron lentamente por inmersión en 4-metilbutano (Sigma) pre-enfriado con hielo seco. Después de ser congeladas, se almacenaron en un ultracongelador a -74°C, hasta su procesamiento.

3. Mapeo funcional de la capa glomerular posterior a la estimulación con hexanal

Para confirmar que la región activada por hexanal fuera la reportada por Xu *et al* [41], se realizó una serie de experimentos en los cuales un grupo de ratas de 90 días de edad (n=5) fueron colocadas en un cuarto aislado equipado con un sistema de

extracción de aire constante y fueron estimuladas de manera aguda con hexanal (Sigma). Para esto se utilizó una caja estándar de bioterio a la cual se le colocó en la parte superior un aparato purificador de aire de inyección constante (Stereon, Electrónica Stereon S.A. de C.V., Ciudad de México, México). Las ratas fueron colocadas de manera individual en el interior de la caja, y se dejaron en el interior de la misma durante 10 minutos, sin estimulación alguna. Luego, se estimularon cinco veces consecutivas con 1mL de 1% hexanal diluido en aceite mineral por 30 segundos seguidos de 1 minuto de aire purificado entre cada estimulación. Pasada una hora después de la primera estimulación, las ratas fueron anestesiadas y perfundidas como se describió anteriormente. Las ratas control (n=5) fueron tratadas de manera similar a las experimentales, con la diferencia que fueron estimuladas solamente con 1mL de aceite mineral. Posteriormente se realizó una inmunoperoxidasa contra c-Fos en cortes coronales seriados de bulbo olfatorio obtenidos mediante un criostato [Microm CM 552; Carl Zeiss (Zeiss), Gottingen, Alemania]. Brevemente, después de tres lavados con amortiguador de fosfatos adicionado con Triton X-100 (Sigma) (PBT) de 10 minutos c/u, los cortes fueron incubados con 3% H₂O₂ durante 10 minutos, luego se realizó un lavado con PBT, y luego incubados con una solución de citrato de sodio / cloruro de sodio (2X SSC, ambos de Sigma) durante una hora a 70°C y luego a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente los cortes fueron incubados con el anticuerpo conejo α-c-Fos (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz CA, EUA) diluido en 3% suero de caballo/PBT durante toda la noche a temperatura ambiente. Al otro día, los cortes se lavaron 3 veces con PB (10 minutos c/u) y se incubaron con un anticuerpo secundario burro α-conejo (biotinilado, 1:5000, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) diluido en 3% suero de caballo/PB a temperatura ambiente durante 2 horas. Al término de este periodo, los cortes fueron lavados 3 veces con PB (10 minutos cada lavado) e incubados con el sistema avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante hora y media. Posteriormente se realizaron dos lavados (10 minutos cada lavado) y se revelaron con un kit que contenía al cromógeno 3,3'-diaminobencidina (Vector Laboratories) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Después de tres lavados más, los cortes fueron incubados con el fluorocromo de unión a DNA 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), luego montados en laminillas y cubiertos con medio Cytoseal (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Trazos de los contornos externos de secciones de bulbo olfatorio consecutivas fueron realizados con un microscopio epifluorescente (Nikon Labophot 2, Nikon, Tokio, Japón)

a 4X, equipado con el software Neurolucida 8 [MicroBrightField (MBF), Colchester, VT, EUA]. Posteriormente se realizaron trazos de los límites externo e interno de la capa glomerular definidos mediante DAPI a 10X. Una vez que toda la capa glomerular fue reconstruida para cada muestra, se dividió arbitrariamente en ocho zonas anatómicas: antero dorso medial (ADM), antero dorso lateral (ADL), antero ventro medial (AVM), antero ventro lateral (AVL), postero dorso medial (PDM), postero dorso lateral (PDL), postero ventro medial (PVM) y postero ventro lateral (PVL). A todas las regiones se les realizó Meander Scan, el consistió en la realización de un escaneo exhaustivo de la zona glomerular a un aumento óptico de 40X para encontrar y marcar núcleos inmunopositivos para c-Fos con ayuda del software Neurolucida 8. A partir de las reconstrucciones, Neurolucida 8 determinó el número de células marcadas y la región a la que pertenecían. Los trazos realizados con Neurolucida fueron alineados y corregidos en los ejes X, Y y Z mediante el programa Neurolucida Explorer (MBF), y se obtuvieron reconstrucciones tridimensionales que se visualizaron con la misma herramienta (en la figura 9 se muestra un ejemplo).

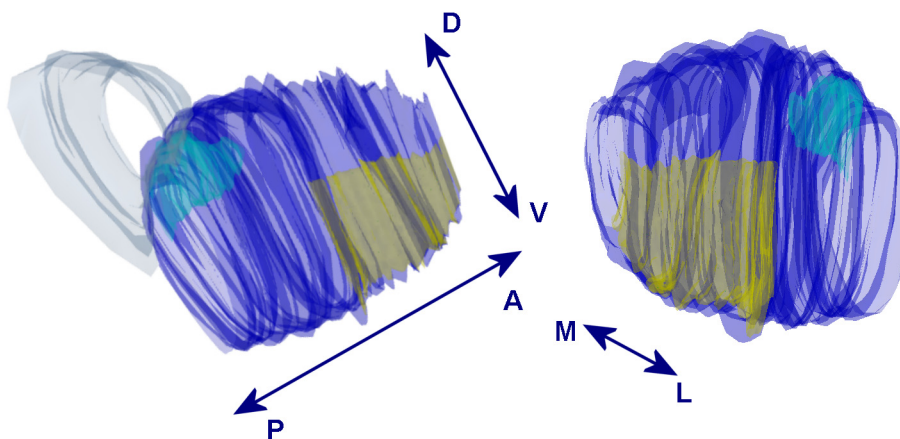


Figura 9. Reconstrucciones tridimensionales generadas a partir de los trazos utilizados para realizar el conteo Meander Scan en la capa glomerular del bulbo olfatorio de la rata. La zona glomerular del bulbo olfatorio principal se muestra en color azul marino, el bulbo olfatorio accesorio se muestra en verde turquesa y parte de la corteza frontal se muestra en blanco perla. La zona antero ventro lateral (AVL) se muestra en amarillo. Las flechas bidireccionales indican el sentido de la localización espacial. D, dorsal; V, ventral; A, anterior, P, posterior, M, medial, L, lateral.

4. Condicionamiento operante olfatorio

Animales de 90 días de edad [n=40; 20 experimentales (CD) y 20 controles (PH) por edad] fueron sometidos a un proceso de condicionamiento operante, en el cual al grupo experimental se le realizó un apareamiento conductual entre un estímulo odorífero (hexanal) y una necesidad fisiológica (beber agua), mientras que al grupo PH se le generó la necesidad fisiológica y se introdujo al laberinto, pero no se le estimuló con hexanal. Un tercer grupo en condiciones estandar de bioterio (n=20, 10 por edad) fue utilizado para comparar los efectos del condicionamiento (ver abajo). También para evaluar el efecto de la estimulación olfativa sobre la supervivencia neuronal a corto y a largo plazo, grupos PH y CD fueron condicionados durante 45 y 105 días.

Previo al condicionamiento, se aplicó una semana de adaptación en la cual se redujo la cantidad de agua que era suministrada a los animales, proporcionándoles 15 minutos de agua por la tarde. Para la realización del paradigma se utilizó una caja de acrílico de 80x80x30cm (esquemática en figura 10), que se encontraba en un cuarto aislado y con ventilación constante. La caja constaba de un pasillo lateral principal con tapa removible y cuatro compartimientos cerrados con compuertas adyacentes al pasillo principal. El pasillo principal también tenía un sistema de ventilación constante, además

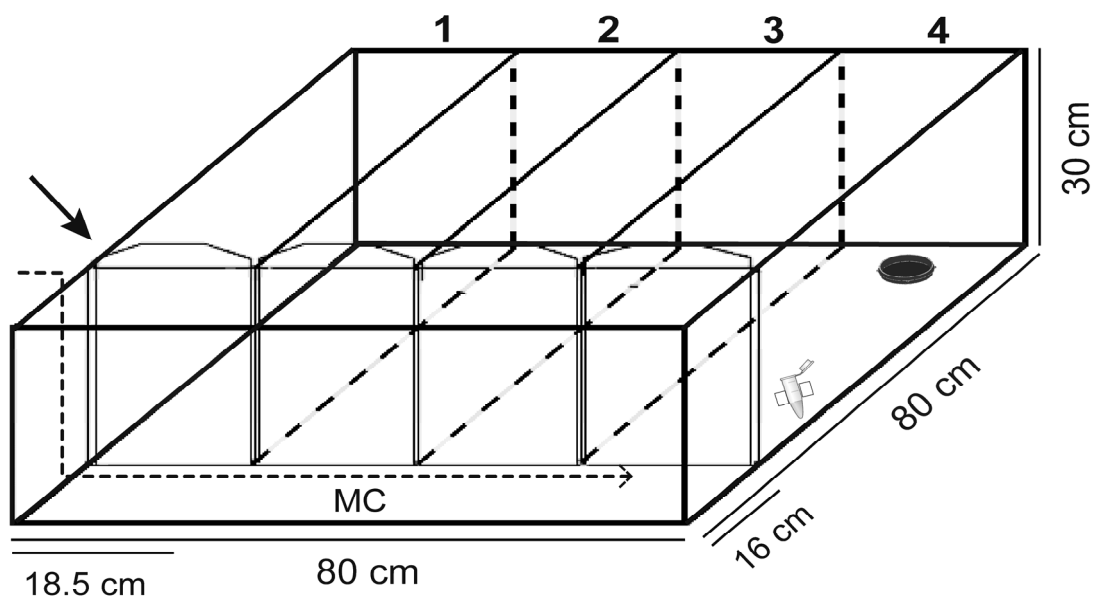


Figura 10 Esquema de la caja de acrílico utilizada para los experimentos de condicionamiento operante olfativo. Los cuatro compartimientos poseen una compuerta individual (flecha) numerada de izquierda a derecha (1, 2, 3, 4) y comparten una cubierta superior removible (no se muestra) que sella esa parte de la caja; el pasillo lateral principal (MC) tiene otra cubierta removible (no se muestra) a la cual se le coloca un purificador de aire que permanece siempre encendido. Al final del MC se localiza un extractor de aire que también está permanentemente encendido (no se muestra). Los tubos eppendorf se colocan adyacentes a las compuertas y en la parte baja de la caja. Al fondo de los compartimientos se colocan las cajas Petri (solo se muestra una).

de un sistema propio de extracción. El esquema de condicionamiento consistió en aplicar tres sesiones diarias, seis días a la semana, a cada individuo, en oscuridad. En cada sesión se seleccionaba un compartimiento aleatoriamente y se colocaba un tubo eppendorf cerrado con 0.2% hexanal en aceite mineral en la pared, cercano a la compuerta, así como 1 mL de agua natural al fondo del compartimiento en una caja Petri. Esta concentración de hexanal se determinó en una serie de pruebas piloto realizadas con ratas CD en las cuales se comenzó con una concentración de 1% hexanal y se fue disminuyendo hasta encontrar la mínima concentración de odorante que les permitiera seguir hallando el agua. En el resto de los compartimentos se colocaban tubos que contenían aceite mineral, así como cajas Petri vacías, con el fin de evitar claves visuales. Momentos antes de que la rata se colocara en el pasillo lateral, se abría la tapa del tubo que contenía al aldehído y se cerraban las compuertas. Una vez colocada la rata en el interior del pasillo lateral, se le daba un minuto de estabilización en la cual la rata exploraba el pasillo, sin mostrar preferencia aparente hacia ningún lado. Transcurrido ese tiempo se realizaba la apertura secuencial de compuertas permitiendo que la rata tuviera acceso al interior de los compartimientos; por error se contabilizaban las veces que la rata ingresara a un compartimiento donde no hubiera agua; por latencia se contabilizó mediante un cronómetro el tiempo que tardó el animal en encontrar el agua y comenzar a beber. Las ratas control fueron sujetas a las mismas condiciones con excepción de 1) la estimulación con hexanal, y 2) que cuando finalizaba el tiempo de estabilización en el pasillo principal, se le habría la compuerta sobre la que se encontrara situada al momento de sonar el cronómetro. Cuatro o cinco horas posteriores a la última sesión del día se les colocaba el bebedero de agua, el cual se les dejaba durante el resto del día (máximo 5 horas). Ocasionalmente, se realizaron tres tipos de sesiones control. La primera de ellas consistió en colocar el odorante y el agua en carriles distintos, y las ratas experimentales siempre escogieron el carril con el hexanal; la segunda de ellas fue omitir el odorante y las ratas condicionadas no mostraron preferencia por ningún carril en particular; la última sesión control fue omitir el agua y las ratas condicionadas siempre eligieron el carril con el odorante. Tanto los animales PH como CD presentaron peso similar a los controles, y comieron y excretaron de manera aparentemente normal.

5. Tratamiento con BrdU

A los 15 días posteriores al inicio del condicionamiento, se inyectó BrdU (Sigma) a los grupos PH y CD a una dosis de 50mg/kg vía intraperitoneal durante seis días consecutivos. Los animales fueron sacrificados al mes y a los 3 meses posteriores a la primera inyección con BrdU. Los cerebros fueron obtenidos y procesados para su utilización posterior. Estos tiempos de sacrificio fueron elegidos debido a que 30 días (posteriores a la inyección con BrdU) es el tiempo en el cual se reportó la mayor cantidad de células BrdU-positivas en la capa glomerular, y 90 días es cuando se alcanza una meseta en el número de células BrdU-positivas que dura al menos hasta 6 meses en esta misma capa [63].

Además de los grupos PH y CD, animales sin condicionamiento alguno (control) de 105 días de edad también fueron inoculados diariamente vía intraperitoneal con BrdU (Sigma, a una dosis de 50 mg/kg) durante seis días consecutivos. Las inyecciones se efectuaron a medio día. Los animales se sacrificaron al mes y a los tres meses posteriores a la primera inyección como se describió anteriormente.

6. Inmunofluorescencia BrdU / marcadores de linaje celular

Se realizaron cortes coronales seriados (45 µm de espesor) de bulbo olfatorio de ratas adultas en un criostato (*Modell CM 1510-3*; Leica Microsystems, Nussloch, Alemania, o Microm CM 552, Zeiss) a una temperatura de -20°C. Los cortes se colocaron en flotación en 4% PFA dentro de cajas de 96 pozos, y se colocaron a 4°C hasta el día siguiente. Se realizaron 3 lavados de 15 minutos c/u con PBT, a temperatura ambiente. Posteriormente, para facilitar la unión de los anticuerpos a sus respectivos antígenos, se incubaron con 2X SSC durante una hora a 70°C, seguida de 3 lavados con 2X SSC a temperatura ambiente. Posteriormente, para facilitar el acceso del anticuerpo a los núcleos celulares, las laminillas se incubaron con 2N HCl (Sigma) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se les aplicó una solución de 0.1M borato de sodio durante 10 minutos, seguida de una incubación con 2X TBS de quince minutos y dos lavados por 15 minutos con PB. Posteriormente las laminillas se incubaron con los anticuerpos primarios ratón α-BrdU (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, dilución 1:200), cabra α-calretinina (CR, 1:800) y conejo α-calbindina D-28K (CB, 1:800), o conejo α-tirosina hidroxilasa (TH, 1:800) o conejo α-glutamato descarboxilasa 65/67kDa

(GAD, 1:400, todos de Chemicon, Temecula, CA, EUA) diluidos en solución de bloqueo. 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 las laminillas se lavaron tres veces con PB. Posteriormente, las laminillas se incubaron por 1.30-2.00 horas a temperatura ambiente con anticuerpos acoplados a fluoróforo dirigidos contra IgGs de ratón (Alexa 488 burro α -ratón; 1:200), de cabra (Alexa 555 ó Alexa 647 burro α -cabra, 1:300) y burro α -conejo (Alexa 555 ó Alexa 594 burro α -conejo; 1:300, todos de Invitrogen). Pasado ese tiempo, se retiró el exceso de anticuerpos y las laminillas se lavaron dos veces con PB. Posteriormente las laminillas se incubaron con DAPI durante diez minutos para tinción nuclear. Finalmente, los cortes fueron montados en orden secuencial sobre portaobjetos, e incluidos inmediatamente en medio de montar comercial (DAKO Fluorescent Mounting Medium; DAKO). Al final del procedimiento, se observaron en un microscopio de epifluorescencia [Optiphot-2 (Nikon), o BX51WI, Olympus, Tokio, Japón]. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal (LSM 5 Pascal, Zeiss ó Fluoview FV1000, Olympus), y los conteos estereológicos fueron realizados en estaciones de trabajo con el programa Stereoinvestigator (ver abajo).

7. Conteo de Poblaciones Celulares mediante el Fraccionador Óptico

Debido a los resultados obtenidos con el mapeo con c-Fos, el conteo de las células positivas para los distintos marcadores utilizados se realizó en la zona anteroventrolateral (AVL) de la capa glomerular del BO. 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” [91], en un equipo semiautomático de estereología (Stereoinvestigator, MicrobrightField). Con ayuda del sistema y utilizando la tinción nuclear DAPI, se realizaron trazos que delimitaron los glomérulos de la zona AVL. Para el caso de los conteos de las células BrdU positivas, el tamaño del cuadro de conteo fue de $45 \times 35 \mu\text{m}$, de la rejilla de muestreo de $50 \times 50 \mu\text{m}$ y la periodicidad de las secciones fue de 3. Para el caso de los conteos de las células positivas a CB, TH, y CR, el tamaño del cuadro de conteo fue de $30 \times 30 \mu\text{m}$, de la rejilla de muestreo de $110 \times 110 \mu\text{m}$ y la periodicidad de las secciones fue de 9. Para el caso de los conteos de

núcleos teñidos con DAPI, el tamaño del cuadro de conteo fue de 20x20µm, de la rejilla de muestreo de 200x200µm y la periodicidad de las secciones fue de 13. Para todos los conteos, la altura de los cuadros de conteo fue de 25 µm y las zonas de guarda fueron de 4µm arriba y abajo del cuadro de conteo. Las células inmunoreactivas que intersectaron la zona de guarda superior así como las líneas laterales de exclusión no fueron incluidas en el conteo. Los datos que se obtuvieron 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 igual o menor a 0.1.

8. Conteo “Meander Scan” para las colocalizaciones BrdU / marcadores de linaje periglomerular

Las colocalizaciones de células BrdU-IR con TH-, CB-, CR- y GAD 65/67-IR de ratas sujetas a las diferentes condiciones experimentales fueron contadas en la zona AVL de la capa glomerular del BO. Dicha área se determinó de la misma forma que para los procedimientos estereológicos. El método de conteo (Meander Scan) consistió en la realización de un escaneo exhaustivo de la zona AVL mediante un microscopio Olympus BX51-WI equipado con una unidad confocal de disco giratorio (DSU) y con platina motorizada para realizar la búsqueda de células BrdU-IR solas o doblemente marcadas (BrdU/TH o /CB o /CR o /GAD65/67). El microscopio estuvo conectado a una estación de trabajo equipada con el software Stereoinvestigator 8, el cual fue utilizado para controlar la platina motorizada y para realizar el cambio de filtros de fluorescencia, así como la activación del disco giratorio confocal del DSU (objetivo de 100x, N.A. 1.4).

9. Análisis Planimétrico

A partir de las mediciones de grosor y de los trazos realizados en los conteos estereológicos descritos anteriormente, es posible obtener parámetros planimétricos de manera automática con el software Stereoinvestigator. De esta manera, se obtuvieron los valores de volumen de la zona AVL de la capa glomerular del bulbo olfatorio, para

cada una de las condiciones experimentales.

10. Análisis Estadístico

Para la evaluación estadística de los datos obtenidos mediante los procedimientos estereológicos y Meander Scan, se realizó en primer lugar estadística descriptiva, así como gráficas de box plot y de distribución. Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk y Anderson-Darling) así como pruebas de homogeneidad de varianzas (Levene). Todos los datos se distribuyeron de manera normal y sus varianzas fueron homogéneas. Posteriormente se realizaron pruebas de ANOVA de una vía, seguidas de pruebas post hoc Tukey's Honestly Significant Difference (HSD). Para los análisis estereológicos, el nivel de significancia fue establecido en 0.05; para el Meander Scan de núcleos inmunopositivos a c-Fos, se estableció en 0.01.

VI. Resultados

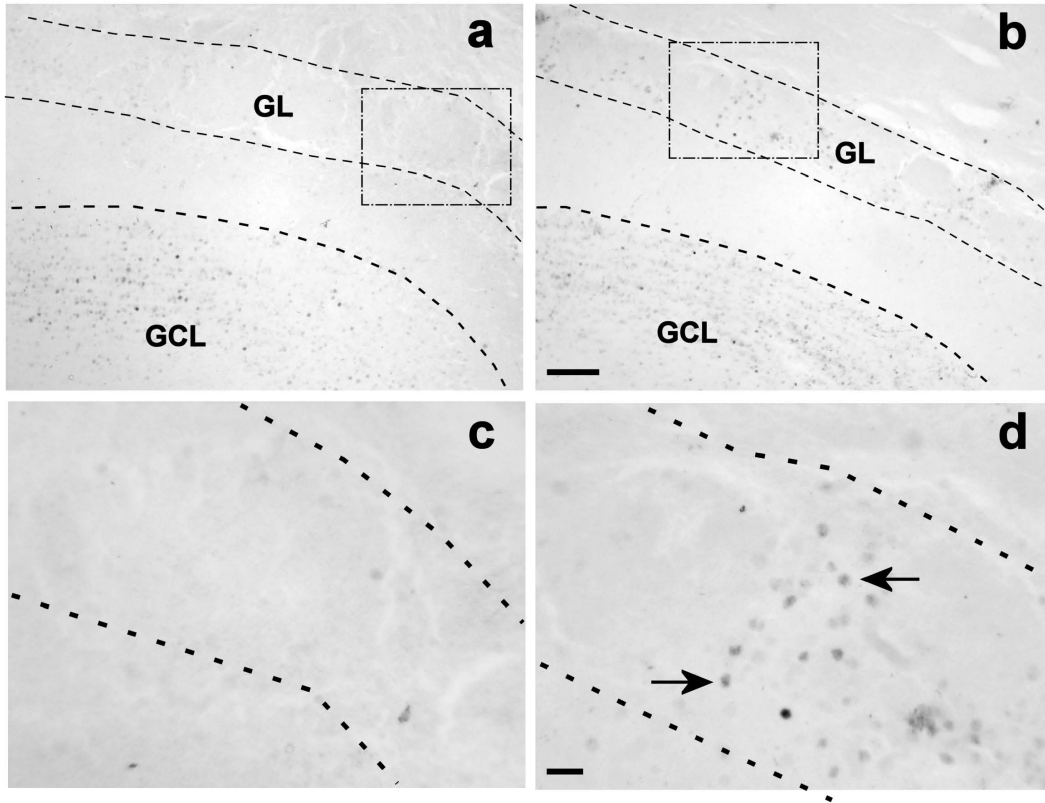
1. El hexanal activa de manera preferente la región AVL de la capa glomerular

Como se explicó en los antecedentes, el conjunto de glomérulos que procesan la información asociada con la estimulación por hexanal ya han sido identificados funcionalmente. De manera específica, las regiones a-f y h que constituyen la zona AVL del bulbo olfatorio son las que se encargan de este procesamiento [41]. Sin embargo, decidimos confirmar estos estudios mediante el marcaje con c-Fos y su posterior mapeo espacial mediante el software Neurolucida, con el fin de obtener un mapa mas detallado de la activación. Como se había mostrado previamente, se encontraron numerosas células intensamente marcadas con c-Fos en las ratas estimuladas con hexanal en la región AVL, mientras que en las ratas control existieron muy pocas células marcadas en la misma región (figura 11a). Posteriormente se realizó el marcaje mediante Meander Scan con el software Neurolucida, el cual mostró la distribución espacial de las células positivas a c-Fos (figura 11b), así como el número de células por región (figura 11c). Con estos datos, el análisis de la influencia del condicionamiento operante olfativo sobre neuronas nuevas y preexistentes se concentró en la zona AVL.

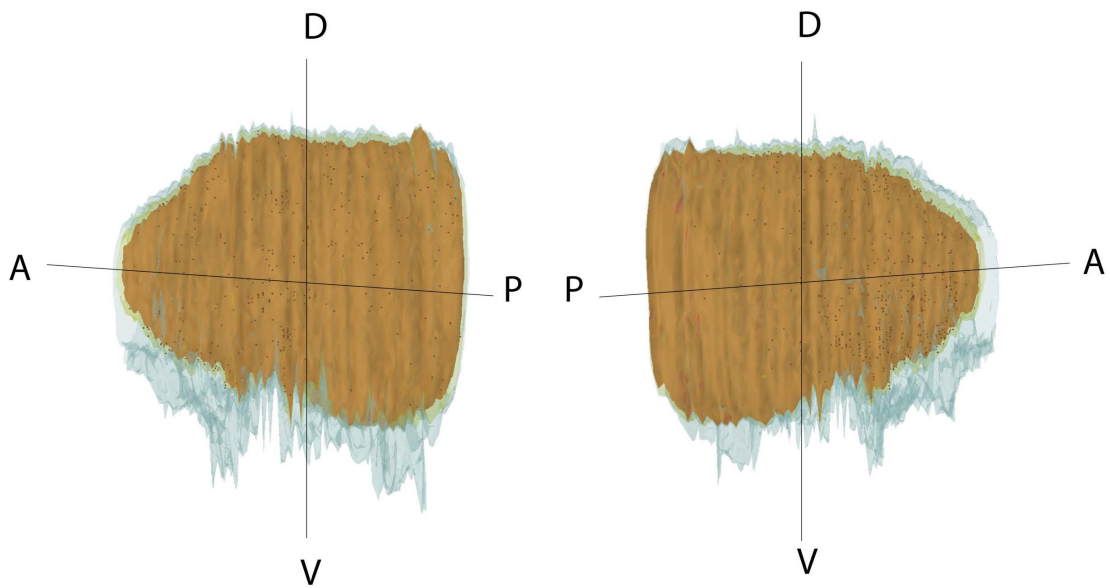
2. Las ratas condicionadas al hexanal encuentran el agua más rápido y más eficientemente que las ratas control.

En la figura 12 se muestran gráficas tridimensionales que presentan el comportamiento de animales sometidos al condicionamiento operante olfatorio y sacrificados a los 30 y 90 días posteriores a la primera inyección con BrdU. Como se puede observar en las gráficas, en las sesiones iniciales del condicionamiento existe un gran número de errores y una latencia alta para encontrar el agua en ambos grupos de ratas (PH habituado al laberinto y CD, condicionado). Sin embargo, en la tercera semana es evidente que existen cambios conductuales tal como lo ilustran las tendencias de las curvas, ya que en los animales CD se reducen tanto la latencia de resolución de la prueba así como el número de errores en su ejecución con relación a los animales PH. Estas tendencias ocurren en ambas etapas experimentales, 30 y 90 días, y confirman la eficacia del estímulo condicionante. De esta manera, conforme se

a



b



c

	Control	Hexanal-estimated
ADM	59.67±18.52	125.67±33.74
ADL	59.33±13.19	174±20
AVM	99.67±5.49	145.67±28.87
AVL	74.67±7.62	363.67±49.33 *
PDM	78.67±32.01	186.67±36.79
PDL	52.67±13.57	97±24.51
PVM	103.33±26.87	109.67±6.38
PVL	20.33±2.02	39.67±9.06

Figura 11 El odorante hexanal estimula de manera preferente la zona AVL de la capa glomerular de la rata. **a)** Imágenes representativas en campo claro de células inmunopositivas a c-Fos (flechas) en la zona AVL de ratas control (a, c) y estimuladas con hexanal (b, d). Aunque existe una clara activación de GRC tanto en controles como estimuladas, la respuesta en la capa glomerular es claramente mayor en las ratas estimuladas con hexanal. **c)** y **d)** son ampliificaciones ópticas de las zonas en recuadro de **a)** y **b)**, respectivamente. **b)** reconstrucción tridimensional obtenida mediante el software NeuroLucida que muestra la distribución de células inmunopositivas a c-Fos (puntos rojos) en la capa glomerular del bulbo olfatorio de la rata. Nótese el mayor número de puntos rojos en la zona AVL, con relación al resto de las zonas. **c)** Estimados estereológicos de núcleos inmunopositivos a c-Fos en las diferentes zonas de la capa glomerular del bulbo olfatorio, tanto de ratas control como estimuladas con hexanal. GL, Capa glomerular; GCL, capa granular; A, anterior, P, posterior, D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral. Escalas: a, b 100 μ m; c, d 20 μ m. n=5, * p<0.01, one-way ANOVA, seguida de la prueba post hoc Bonferroni.

incrementa el número de sesiones, las ratas condicionadas con hexanal son más precisas y más rápidas que las ratas PH en la ejecución de la tarea.

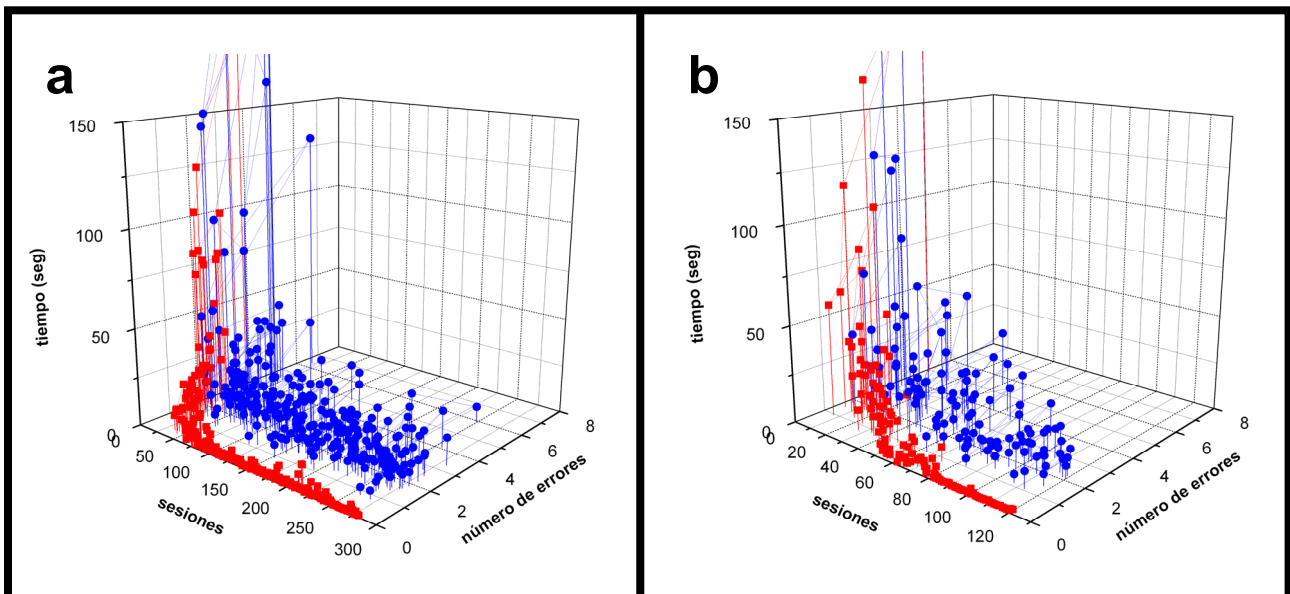


Figura 12 Las ratas condicionadas al hexanal son más precisas y más rápidas que las ratas control. Gráficas que ilustran el comportamiento de ratas sometidas a condicionamiento operante olfativo con hexanal. En el eje **x** se presenta el número de sesiones, en el eje **y** la latencia (en segundos, ver métodos) y en el eje **z** se presenta el número de errores por sesión. En **(a)** se ilustra el comportamiento de ratas sacrificadas un mes posterior a la primera inoculación con BrdU (n=20) y en **(b)** el de las ratas sacrificadas a los tres meses posteriores a la inoculación de BrdU (n=20). Como se puede apreciar, los animales condicionados al hexanal (rojo) muestran una reducción tanto de la latencia como en el número de errores para resolver la prueba a lo largo de distintas sesiones, a diferencia de los animales habituados al laberinto (azul). n=20.

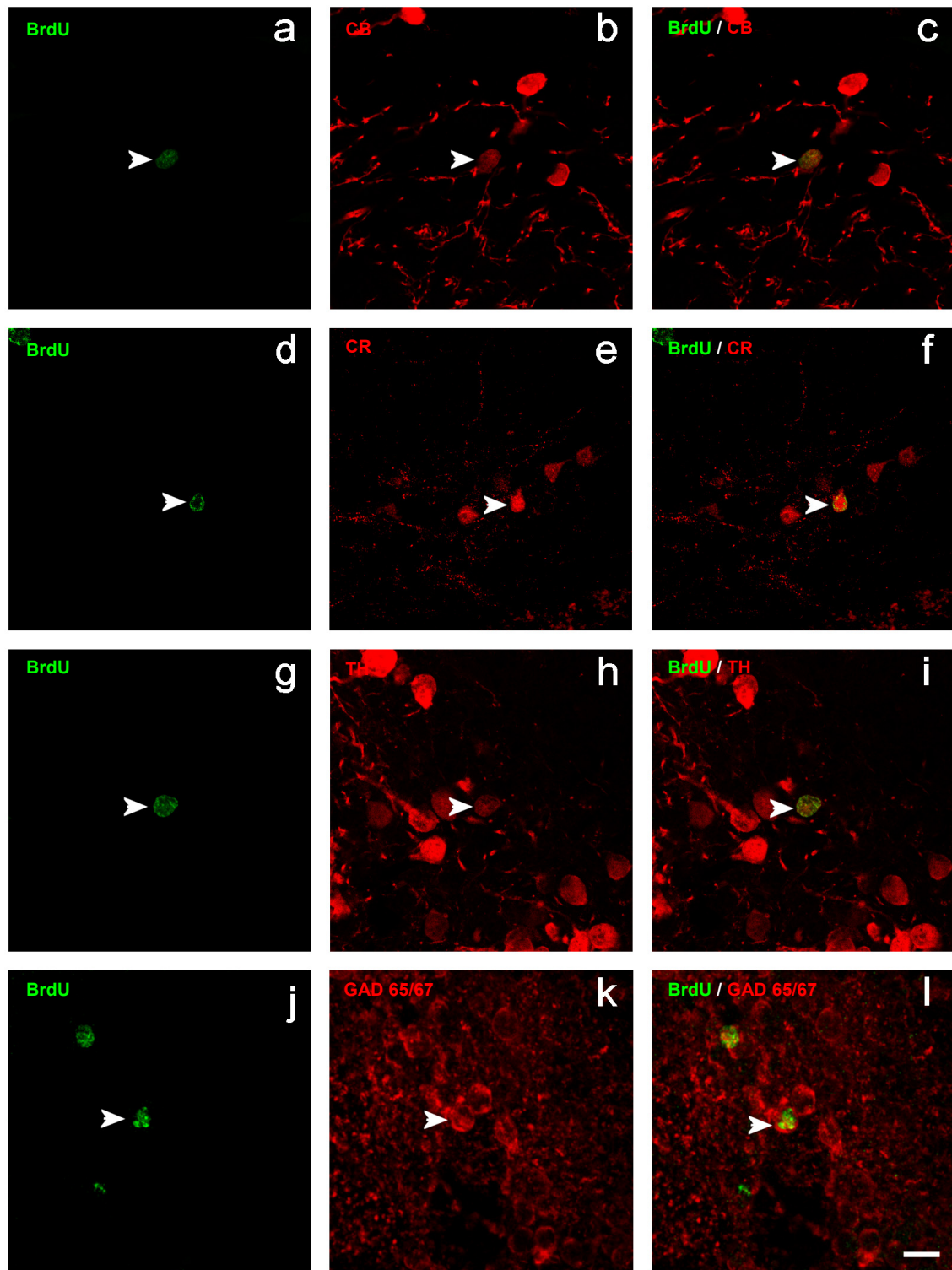


Figura 13 Neuronas nuevas y preexistentes en los glomérulos olfatorios. Imágenes que muestran los distintos linajes neuronales evaluados en la zona AVL de la capa glomerular del bulbo olfatorio de la rata. En (a, d, g, j) se muestran núcleos inmuno-positivos a BrdU; en (b) células inmuno-positivas a calbindina (CB), en (e) a calretinina (CR), en (h) a tirosina hidroxilasa (TH) y en (k) a glutamato descarboxilasa 65/67 kDa (GAD 65/67). En c, f, i, l se muestran las co-localizaciones respectivas. Las cabezas de flecha muestran las células en las que se co-localizan las marcas de BrdU y de los distintos marcadores de linaje utilizados, lo que sugiere que se trata de neuronas nuevas que se han diferenciado. Escala: 20 μ m.

3. El condicionamiento operante afecta de manera diferencial a distintos linajes de PGC presentes en la zona AVL

Con el objetivo de obtener la mayor cantidad de información a partir de una muestra biológica, especialmente de los animales condicionados, se realizaron inmunofluorescencias con BrdU/TH/CR, BrdU/CB/CR BrdU/GAD65-67/CR o BrdU/CR. Cualitativamente, se notó un mayor número de núcleos positivos a BrdU a los 30 días que a los 90 días en todas las condiciones estudiadas, y que cada uno de los linajes estudiados mostró una distribución característica en la capa glomerular; este efecto fue más pronunciado para el caso de las neuronas positivas para calbindina. En la figura 13 se muestra un ejemplo de imágenes obtenidas con microscopia confocal en la que se ilustra el patrón de las inmunotinciones en los glomérulos, mismas que sirvieron de base para realizar los conteos estereológicos así como los “meander scans”.

Debido a que un neuroblasto migra durante casi tres semanas y le toma seis semanas para madurar en una PGC [64], consideramos que nuestro protocolo de inyección de BrdU y el posterior conteo celular fueron capaces de distinguir una célula preexistente de una nueva. Así, se realizaron conteos estereológicos de células preexistentes TH, CB, CR y nuevas (BrdU) en la zona AVL en los grupos 30d y 90d para evaluar el efecto del condicionamiento sobre dichas poblaciones. En la figura 14 se muestran los resultados de los conteos estereológicos de PGC preexistentes en la zona AVL en los distintos grupos evaluados. En el caso de las PGC positivas a TH (Figura 14a) o a CB (Figura 14b), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas ($p < 0.05$, ANOVA de una vía, seguida de Tukey's HSD). Sin embargo, en el caso de las neuronas positivas a CR (Figura 14c), se encontró un incremento estadísticamente significativo en los grupos PH de 30d y 90d con relación al grupo control de 30d ($p < 0.05$, ANOVA de una vía, seguida de Tukey's HSD). De igual forma, se observó una tendencia en el resto de los grupos experimentales a estar también más elevados que el grupo control de 30d, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Por otro lado, los conteos para núcleos positivos a BrdU en la zona AVL mostraron que existe un decremento importante en el número de núcleos BrdU-IR en los grupos de 90

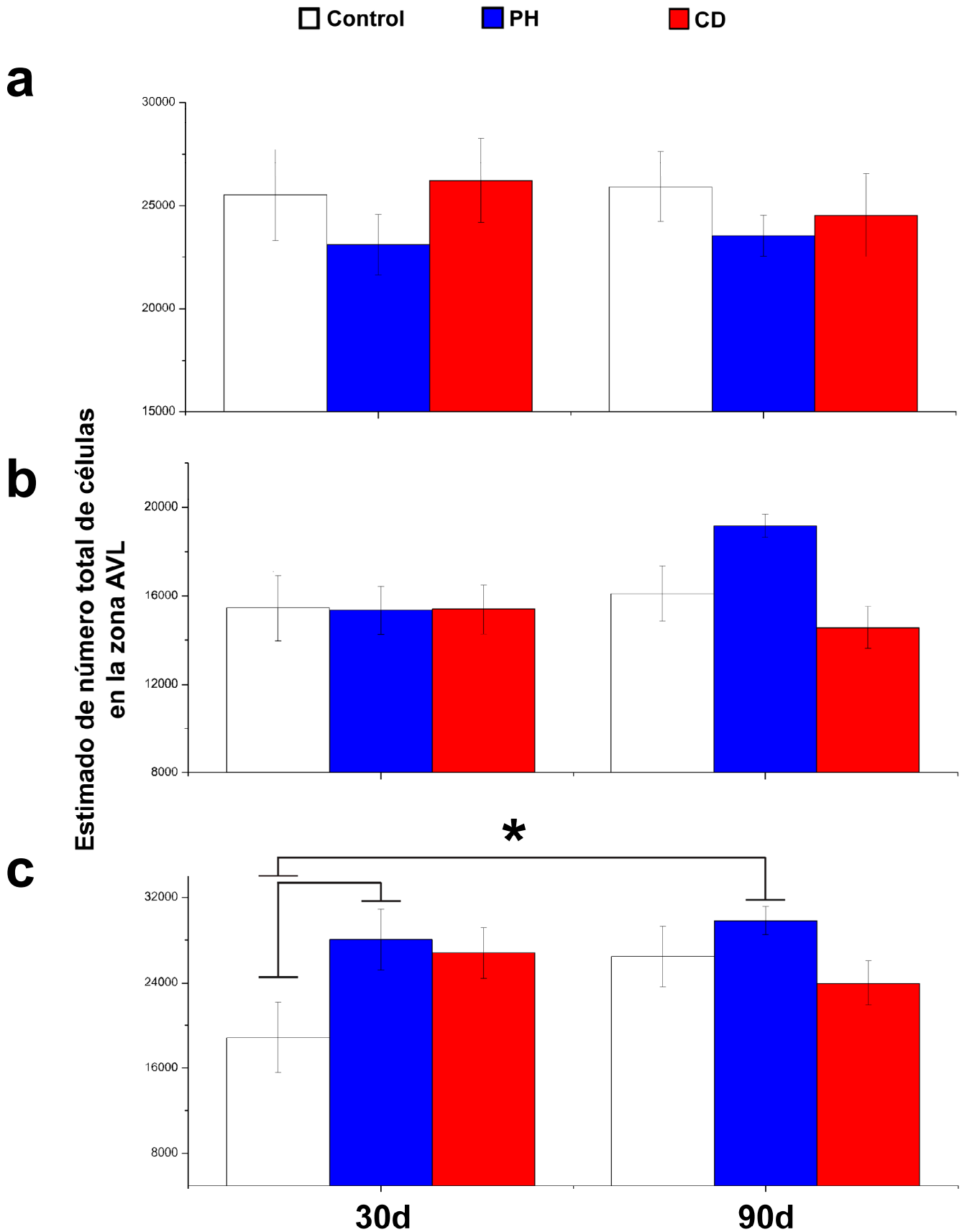


Figura 14 La actividad sensorial no afecta el número de células TH y CB, pero si el de CR positivas en la zona AVL de la capa glomerular del bulbo olfatorio. Gráficas que muestran los estimados de número total de células inmunopositivas a TH (a), CB (b) y CR (c) en la zona AVL del bulbo olfatorio de ratas adultas control (barras blancas, C), ratas habitadas al laberinto (barras azules, PH) y ratas condicionadas con hexanal (barras rojas, CD) a los 30 y a los 90 días posteriores al tratamiento con BrdU. Para el caso de TH y CB, no se presentan diferencias estadísticas (ANOVA) por la edad ni por el

condicionamiento, sugiriendo que la estimulación sensorial realizada con hexanal no parece tener un efecto sobre estas poblaciones, en cambio para el caso de CR, se presentan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control de 30 días y los PH de 30 y 90 días, además de las tendencias en el resto de los grupos con relación a dicho control. Esto sugiere que el condicionamiento y los cambios que involucra tienen efecto sobre el número de células CR positivas de la zona AVL del bulbo olfatorio, evento novedoso ya que no se habían descrito previamente cambios en las poblaciones neuronales en respuesta a un condicionamiento en el bulbo olfatorio. n=20 *ANOVA, $p \leq 0.05$ seguida de Tukey's HSD.

días, con relación a los de 30 días (Figura 15). Esta diferencia es independiente de la condición experimental, debido a que no se encontraron diferencias en el número de núcleos BrdU-IR entre los grupos control, habituado al laberinto y el grupo condicionado con hexanal, en ambos tiempos evaluados ($p < 0.05$, ANOVA de una vía, seguida de Tukey's HSD). La reducción que se observó entre ambos tiempos fue de aproximadamente 50%.

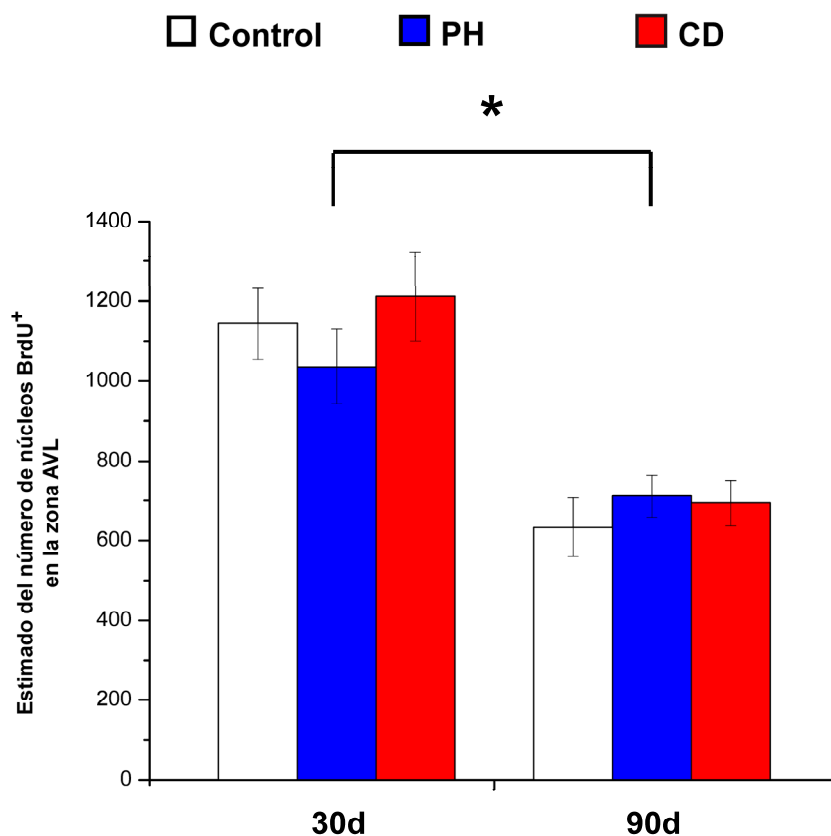


Figura 15 La actividad sensorial no modifica la tasa de supervivencia de células nuevas en la zona AVL del bulbo olfatorio. Gráficas que muestran los estimados de número total de células inmunopositivas a BrdU en la zona AVL del bulbo olfatorio de ratas adultas control (barras blancas, **C**), ratas habituadas al laberinto (barras azules, **PH**) y ratas condicionadas con hexanal (barras rojas, **CD**) a los 30 y a los 90 días posteriores al tratamiento con BrdU. Existe un decremento, estadísticamente significativo, en el número de células entre los 30 y 90 días, ampliamente documentado en la literatura, de aproximadamente 50%. Sin embargo, el número de células entre las tres condiciones evaluadas es similar en ambos tiempos estudiados, sugiriendo que la estimulación sensorial realizada con hexanal no parece tener un efecto directo sobre la supervivencia de nuevas células en la zona AVL del bulbo olfatorio. n=20 *ANOVA, $p \leq 0.05$ seguida de Tukey's HSD.

4. La actividad sensorial incrementa el número de células BrdU / GAD 65/67⁺ en la zona AVL

Con el fin de analizar si nuestro condicionamiento operante promueve la diferenciación hacia ciertos linajes específicos, se realizaron conteos de células doblemente marcadas con BrdU y cada uno de los marcadores de linaje periglomerular utilizados (TH, CB, CR y GAD 65/67). Debido a que el número de células BrdU es muy pequeño en la capa glomerular, se tuvieron que realizar escaneos completos de la zona AVL en búsqueda de las co-localizaciones. Los resultados de dichos conteos se muestran en la tabla 1. Para el caso de BrdU/TH, BrdU/CB y BrdU/CR, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones estudiadas. Sin embargo, para el caso de neuronas BrdU/GAD65/67-IR de ratas CD de 90d, se encontró un incremento estadísticamente significativo con relación al resto de las condiciones experimentales ($p < 0.05$, ANOVA de una vía, seguida de Tukey's HSD).

Tabla 1. Total de neuronas periglomerulares doblemente marcadas en la zona AVL.

		BrdU/TH	BrdU/CB	BrdU/CR	BrdU/GAD 65/67
30d	C	104±46	49±25	95±19	161±18
	PH	98±51	24±16	161±68	245±47
	CD	94±53	73±48	209±30	127±133
90d	C	111±49	62±71	65±25	123±14
	PH	50±32	33±24	65±23	111±96
	CD	108±77	49±30	124±25	303±60*

C: control; PH: ratas habituadas al laberinto; CD: ratas condicionadas con hexanal (* $p < 0.05$, one-way ANOVA, seguida de la prueba post hoc Tukey's HSD) n=5

5. El condicionamiento operante no afecta los parámetros morfométricos de la zona AVL

Debido a que existieron modificaciones tanto en las poblaciones de neuronas preexistentes CR⁺ como nuevas BrdU / GAD 65/67⁺, se decidió evaluar tanto el volumen (figura 16a) así como el número total de células (figura 16b) presentes en la

zona AVL en las distintas condiciones evaluadas. En ningún caso resultaron diferencias estadísticamente significativas (figura 16), lo que en adición a la tasa de proliferación que mostraron las células positivas a BrdU (figura 15), sugiere que los cambios observados resultaron de modificaciones que no involucraron cambios evidentes en la proliferación celular.

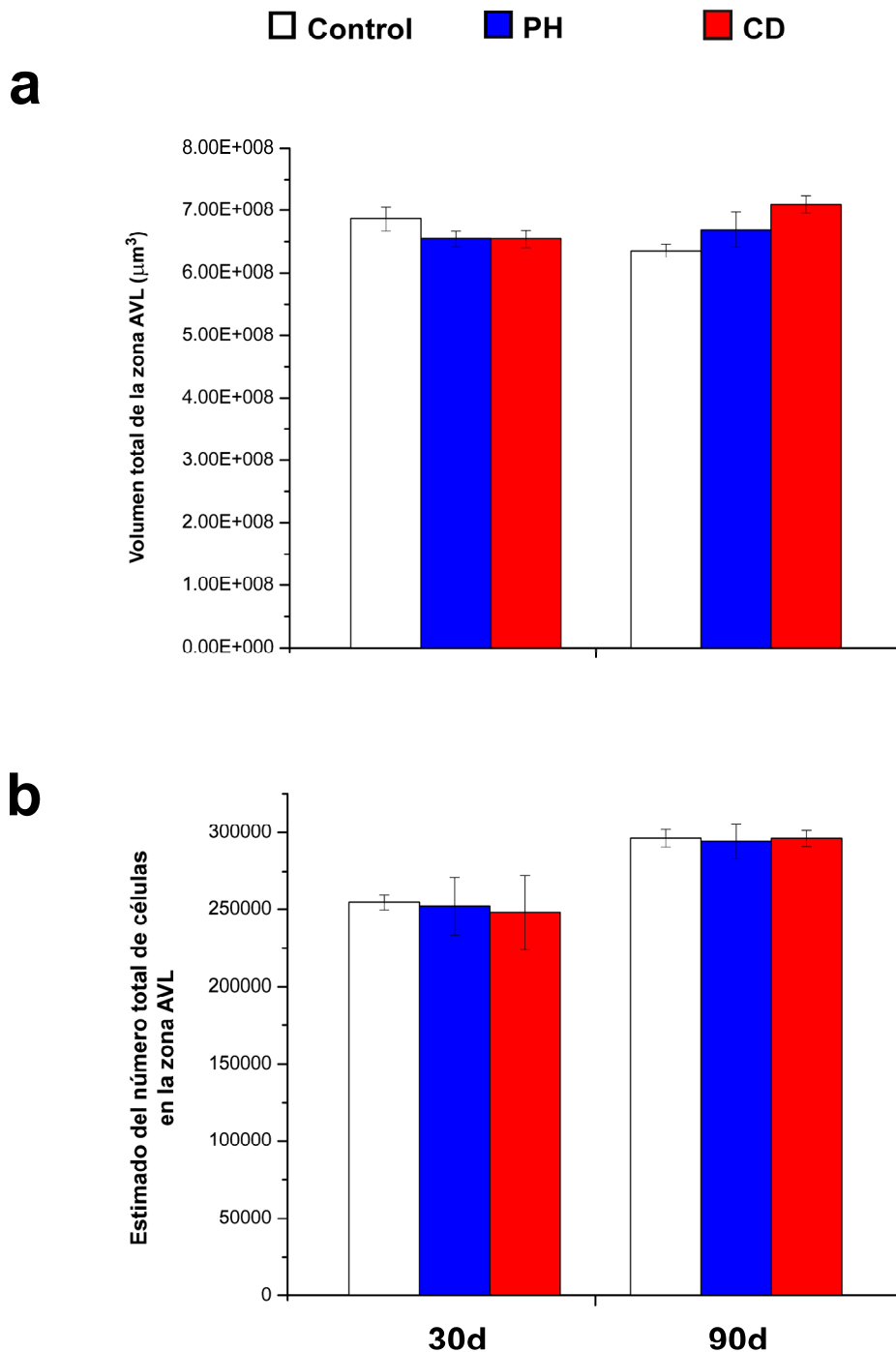


Figura 16 El condicionamiento olfativo operante no modifica el volumen ni el número total de células en la zona AVL del bulbo olfatorio. Gráficas que muestran los estimados planimétricos de a) volumen y b) número total de células de la zona AVL del bulbo olfatorio de ratas adultas control (barras blancas, **C**), ratas habituadas al laberinto (barras azules, **PH**) y ratas condicionadas con hexanal (barras rojas, **CD**) a los 30 y a los 90 días posteriores al tratamiento con BrdU. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas. n=20 *ANOVA, $p \leq 0.05$ seguida de Tukey's HSD.

VI. Discusión

Aunque hacia finales del siglo pasado todavía estaba en intenso debate, el fenómeno de neurogénesis en el cerebro adulto, actualmente es un evento ampliamente aceptado. No obstante lo anterior, con el tiempo han surgido algunas preguntas interesantes que aún permanecen abiertas. Una de estas preguntas se refiere al papel funcional de las nuevas neuronas en las conexiones del bulbo olfatorio y la modulación de su producción y diferenciación por la actividad sensorial. Varios estudios han mostrado que las nuevas neuronas son capaces de madurar, convertirse en neuronas completamente funcionales e integrarse a las redes neuronales preexistentes [35,72,92-94]. Sin embargo, no todos los neuroblastos que son generados durante la vida adulta sobreviven y se integran a los circuitos; la mitad de ellos muere entre uno y tres meses después de haber sido generados, ante la aparente influencia de un periodo crítico determinado por la actividad sensorial que se presenta a los quince días después de su nacimiento [62-63]. Diversos grupos han evaluado el efecto de la actividad sensorial sobre la supervivencia de las neuronas nuevas con diversos paradigmas conductuales y de estimulación, obteniendo resultados contradictorios [71,82,87-90]. Esto sugiere que el sentido del olfato, al menos en roedores, presenta un alto grado de plasticidad funcional para generar una diversidad de respuestas ante diversos cambios ambientales a los cuales pudieran estar expuestos.

En el presente trabajo, se evaluó la influencia que la actividad sensorial olfatoria tiene sobre la supervivencia de las neuronas nuevas y preexistentes, así como sobre la diferenciación de las nuevas neuronas en los glomérulos. Para esto se decidió combinar un modelo de condicionamiento olfativo operante con conteos estereológicos de las neuronas nuevas y preexistentes en la región que procesa la información sensorial relacionada con el hexanal. El condicionamiento operante tiene la ventaja experimental de que el observador puede tener evidencia conductual confirmatoria de que el estímulo ha sido senso-percibido y que posee un significado fisiológico para el animal estudiado. De esta forma, se desarrolló un protocolo conductual que tiene las siguientes características: 1) el condicionamiento se obtiene con la menor concentración de odorante capaz de promover una respuesta conductual (en este caso fue 0.2% hexanal disuelto en aceite mineral); 2) el reforzador positivo (en este caso, agua) es inodoro por lo que no interfiere con la estimulación de la vía olfatoria, 3) en la ejecución de la prueba no interviene el uso de claves visuales, auditivas o

somestésicas y 4) los animales se observan físicamente sanos como las ratas control sin condicionamiento. Los resultados conductuales mostraron que el condicionamiento olfativo operante es un método efectivo para evaluar la detección de odorantes en una prueba conductual, particularmente a bajas concentraciones. En nuestras pruebas conductuales, el despliegue conductual tanto de los grupos habituados al lugar (PH) como de los condicionados (CD) fue similar en las primeras sesiones del condicionamiento. Sin embargo, una vez aprendida la tarea, los animales CD la resolvieron de manera más eficiente que los animales PH, asumiendo por eficiencia el que cometieran menos errores y presentaran una latencia menor para hallar el agua. Esto se debió a que los animales CD asociaron el estímulo (odorante) con la recompensa (agua), mientras que los animales PH no tuvieron ningún reforzador que les sirviera como clave ambiental.

Posteriormente, utilizamos el condicionamiento olfativo operante para evaluar si la estimulación sensorial condicionada afectaba la supervivencia de las células preexistentes o de las nuevas en la región de la capa glomerular activada por el hexanal [41]. Con el fin de comprobar en nuestro modelo que dicha zona fuera la que se activa preferentemente en respuesta a este aldehído, realizamos ensayos de estimulación aguda con el mismo y posteriormente realizamos inmunohistoquímica contra c-Fos, un marcador de activación neuronal temprana [51,95]. El mapeo realizado mostró que la zona glomerular que preferentemente se activa con el hexanal fue la zona AVL, confirmando los resultados previos realizados con fMRI. Aunque otras zonas presentaron algún grado de activación (5 - 200%), no resultó tan elevado el número de células que respondieron al hexanal como el que se presentó en la zona AVL (>500%). Si bien en los conteos de los linajes se abarcó toda esta región, es probable que sólo sean activados unos pocos glomérulos del total del área estudiada. Aunque en nuestro estudio no podemos comprobar esta posibilidad, se ha mostrado que la ubicación de los glomérulos específicos para un odorante entre individuos de la misma especie permanece constante [42,96]. Así la región de la capa glomerular que detecta al hexanal es la región AVL, por lo que consideramos la nuestra una aproximación válida para realizar los conteos estereológicos. Después de un par de semanas de que las ratas aprendieron la tarea se les inyectó BrdU para marcar las neuronas nuevas y poder contarlas a tiempos posteriores. Se ha reportado que las nuevas neuronas muestran las características morfológicas y funcionales completas que las definen como PGC maduras hasta seis semanas después de que son generadas [64]. Se

decidió inyectar BrdU dos semanas después del inicio del condicionamiento para evitar cualquier efecto en la incorporación de las nuevas células producido por el aprendizaje, así como para poder evaluar los efectos de la estimulación olfativa tanto en las neuronas nuevas como en las preexistentes, aunque no se descarta que los efectos del aprendizaje olfativo pudieran ser más duraderos de lo que se contempló en el diseño experimental del presente trabajo. Después de estandarizadas las inmunofluorescencias, se realizaron los conteos estereológicos tanto a 30 como a 90 días posteriores a las inyecciones con BrdU. La ventaja de la estereología sobre otros tipos de conteos radica en que es un método sistemático aleatorio que permite obtener datos de una manera estadística sin sesgo y altamente reproducible [91,97]. En concordancia con reportes previos, encontramos que existe un decremento de alrededor del cincuenta por ciento en los núcleos BrdU-IR entre los 30 y los 90d posteriores a las inyecciones con BrdU [63,89]. Esta reducción fue independiente de la condición experimental, y sugiere que la actividad sensorial crónica no afecta la supervivencia de las nuevas neuronas, al menos en la zona AVL. Este resultado está en desacuerdo con estudios previos en los que se reporta que el enriquecimiento ambiental olfatorio produce un incremento significativo en el número de núcleos BrdU-IR [79-80,89], pero es concordante con los resultados de Alonso *et al* [89] quienes mediante un aprendizaje de discriminación de dos olores concluyeron que si bien existió un incremento en el número de células BrdU-IR; este incremento no se dio en las regiones activadas por los odorantes probados.

Mediante los conteos estereológicos no se encontraron diferencias en el número de PGC preexistentes positivas a CB y TH presentes en la zona AVL, entre las ratas controles (tanto control como CCD) como en las condicionadas (CD), a los 30d y 90d posteriores a las inyecciones con BrdU. Se ha reportado que las PGC generadas durante el periodo perinatal son más estables y más longevas que aquellas producidas en la etapa adulta [38]. De manera interesante, la gran mayoría de PGC positivas a CB y TH son generadas en el periodo temprano [34,37-38]. En nuestros resultados, el condicionamiento operante olfatorio no produjo ninguna influencia en la supervivencia de neuronas preexistentes, lo cual sugiere que la actividad sensorial condicionada no afecta la supervivencia de estos subtipos a edades avanzadas. Las PGC positivas a CR son producidas principalmente durante la fase adulta [34,37,98]. Sorprendentemente, las PGC positivas a CR fueron más numerosas tanto en las ratas PH y CD en comparación con las ratas control en la zona AVL a los 30 días posteriores

a las inyecciones con BrdU, pero a los 90d esta diferencia desapareció. Debido a que este fenómeno se presentó en ambos grupos de ratas sometidas al condicionamiento operante en el grupo de 30d, nosotros postulamos que la expresión de CR está relacionada con la respuesta adaptativa del bulbo olfatorio a condiciones ambientales novedosas y retadoras, las cuales estuvieron presentes en la fase inicial del condicionamiento. Otro factor importante que podría explicar este resultado sería la relevancia del estímulo condicionado cuya importancia para la realización de la tarea se va consolidando conforme transcurren las sesiones. Debido a que no se han realizado estudios previos acerca de este tema en el sistema olfatorio, postulamos que la relevancia de un estímulo olfativo fortalece las conexiones preexistentes, a la vez que impide la adición de nuevos elementos a los glomérulos correspondientes que pudieran interferir con el procesamiento de dicha información [89]. De esta manera, la relevancia del estímulo puede ser un factor clave que influya negativamente en la incorporación de neuronas nuevas nacidas en el cerebro adulto.

Por otro lado, actualmente permanecen relativamente inexplorados los mecanismos de respuesta a la *novedad* del estímulo en el bulbo olfatorio. Recientemente, Veyrac *et al* [81] reportaron un incremento en el número de nuevas neuronas en la capa granular del BO después de una estimulación novedosa con diversos olores complejos. En nuestros experimentos, nosotros no encontramos incorporación de nuevas neuronas en la zona AVL de la capa glomerular del BO en respuesta a las condiciones novedosas iniciales del condicionamiento, pero cabe la posibilidad de que este incremento transitorio en las PGC positivas a CR sea el mecanismo de respuesta a la novedad de un estímulo determinado que implica ciertas demandas al circuito encargado de procesar dicho estímulo. Es claro que es necesario realizar más experimentos dirigidos a esclarecer este aspecto.

Finalmente, se decidió evaluar el efecto de la estimulación sensorial sobre la determinación fenotípica de las nuevas PGC generadas en el cerebro adulto. De manera interesante, se encontró un incremento en el número de nuevas neuronas que expresan GAD65/67 en la zona AVL a los 90 días posteriores a las inyecciones con BrdU en el grupo CD; el resto de los linajes evaluados no presentó modificaciones ni por edad o condición experimental. Interesantemente, Parrish-Aungst S *et al* [78] reportaron que la expresión de GAD67 puede ser modulada por la actividad sensorial. Lo anterior, aunado a que no se presentaron cambios en el número de células totales en la zona AVL, puede sugerir varios escenarios: El primero de ellos, que la tasa de

recambio de las neuronas nuevas se incrementó y que la tasa de muerte de las nuevas PGC GAD65/67 se redujo en comparación a los demás linajes evaluados. El segundo escenario supondría que el incremento en el número de nuevas PGC GAD65/67 resulta del aumento de la tasa de muerte de los subtipos de PGC no evaluados en el presente trabajo. El tercer escenario propondría que dado que fue a un tiempo largo de condicionamiento (105 días), el paradigma indujo la proliferación en SVZ de precursores específicos de GAD 65/67 a tiempos tempranos y como solo se evaluó al final del condicionamiento, se encontró dicho incremento a ese punto temporal. Finalmente, el cuarto escenario tiene que ver con el fenómeno de plasticidad en el que el condicionamiento olfativo operante promovería la expresión del fenotipo GAD65/67 en las PGC nuevas quizás a expensas de los otros linajes. Si este último fuera el caso, y a reserva de realizar experimentos dirigidos a evaluarlo directamente, sería la primera vez que se describe este mecanismo de plasticidad en el sistema olfatorio. La plasticidad fenotípica no es un evento nuevo, ha sido descrito previamente en el hipocampo [99], el hipotálamo [100] y las células en cultivo obtenidas del ganglio de la raíz dorsal [101].

En resumen, el presente trabajo mostró que la estimulación sensorial crónica condicionada incrementa el fenotipo GAD65/67 entre la población de PGC. Aunque las consecuencias fisiológicas se desconocen, es probable que este cambio ayude a consolidar el funcionamiento del circuito que procesa el estímulo condicionado a largo plazo. No obstante que se ha mostrado que los distintos subtipos de PGC provienen preferentemente de regiones específicas y generadas a tiempos específicos [34,36-38], nuestros resultados sugieren que no se puede descartar que exista una influencia epigenética sobre la diferenciación final de las PGC, con la consecuente influencia sobre la modulación del paso de información olfatoria por la capa glomerular del bulbo olfatorio [102].

VII. Conclusiones

1. El paradigma conductual diseñado para el presente trabajo resultó eficiente, ya que permitió la observación de una conducta asociada a la estimulación odorífera para de esa manera confirmar que el animal condicionado sintió el odorante.
2. El odorante hexanal estimula preferentemente la región antero ventro lateral de la capa glomerular del bulbo olfatorio.
3. El condicionamiento olfativo operante utilizado en el presente trabajo no afecta la proliferación de las nuevas células, ni tampoco los parámetros morfométricos de la región antero ventro lateral de la capa glomerular del bulbo olfatorio.
4. El condicionamiento olfativo operante utilizado en el presente trabajo influye de manera transitoria sobre la población de células periglomerulares positivas al marcador de linaje calretinina de la región antero ventro lateral de la capa glomerular del bulbo olfatorio.
5. El condicionamiento olfativo operante crónico promueve el incremento de células periglomerulares positivas al marcador de linaje glutamato descarboxilasa isoformas 65 y 67 kDa en la región antero ventro lateral de la capa glomerular del bulbo olfatorio.

VIII. Referencias

1. Goldman SA, Nottebohm F: **Neuronal Production, Migration, and Differentiation in a Vocal Control Nucleus of the Adult Female Canary Brain.** *PNAS* 1983, **80**:2390-2394.
2. Lois C, Alvarez-Buylla A: **Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:2074-2077.
3. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: **Neurogenesis in the adult human hippocampus.** *Nat Med* 1998, **4**:1313-1317.
4. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, nbsp, A, Gross CG: **Neurogenesis in the Neocortex of Adult Primates.** *Science* 1999, **286**:548-552.
5. Lois C, Alvarez-Buylla A: **Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.** *Science* 1994, **264**:1145-1148.
6. Breton-Provencher V, Saghatelian A: **Newborn neurons in the adult olfactory bulb: unique properties for specific odor behavior.** *Behav Brain Res* 2012, **227**:480-489.
7. Breer H, Fleischer J, Strotmann J: **The sense of smell: multiple olfactory subsystems.** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**:1465-1475.
8. Firestein S: **How the olfactory system makes sense of scents.** *Nature* 2001, **413**:211-218.
9. Schwob JE: **Neural regeneration and the peripheral olfactory system.** *Anat Rec* 2002, **269**:33-49.
10. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB: **A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium.** *Cell* 1993, **73**:597-609.
11. Vassar R, Ngai J, Axel R: **Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium.** *Cell* 1993, **74**:309-318.
12. Costanzo RM: **Rewiring the olfactory bulb: changes in odor maps following recovery from nerve transection.** *Chem Senses* 2000, **25**:199-205.
13. Christensen MD, Holbrook EH, Costanzo RM, Schwob JE: **Rhinotomy is disrupted during the re-innervation of the olfactory bulb that follows transection of the olfactory nerve.** *Chem Senses* 2001, **26**:359-369.
14. Raisman G, Li Y: **Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells.** *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:312-319.
15. Mori K, Nagao H, Yoshihara Y: **The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information.** *Science* 1999, **286**:711-715.
16. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB: **Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb.** *Cell* 1994, **79**:1245-1255.
17. Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R: **Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb.** *Cell* 1994, **79**:981-991.
18. Valle-Leija P, Blanco-Hernandez E, Drucker-Colin R, Gutierrez-Ospina G, Vidaltamayo R: **Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: a constructivist expression of neural plasticity.** *PLoS One* 2012, **7**:e35358.
19. Shepherd GM, Greer CA: **Olfactory Bulb.** In *The synaptic organization of the brain*, edn 4th ed. Edited by Shepherd GM: Oxford University Press, Inc.; 1998:638.
20. Altman J: **Autoradiographic and histological studies of postnatal**

- neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 1969, **137**:433-457.
21. Shepherd GM: *The synaptic organization of the brain* edn 5th. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2004.
 22. Shepherd GM, Chen WR, Willhite D, Migliore M, Greer CA: **The olfactory granule cell: From classical enigma to central role in olfactory processing.** *Brain Res Rev* 2007, **55**:373-382.
 23. Puopolo M, Belluzzi O: **Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb.** *Eur J Neurosci* 1998, **10**:1073-1083.
 24. Panzanelli P, Fritschy JM, Yanagawa Y, Obata K, Sassoe-Pognetto M: **GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 2007, **502**:990-1002.
 25. Brinon JG, Arevalo R, Crespo C, Bravo IG, Okazaki K, Hidaka H, Aijon J, Alonso JR: **Neurocalcin immunoreactivity in the rat main olfactory bulb.** *Brain Res* 1998, **795**:204-214.
 26. Gutierrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Gracia-Llanes FJ, Marques-Mari AI, Martinez-Guijarro FJ: **Characterization of somatostatin- and cholecystokinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 2005, **489**:467-479.
 27. Kishimoto J, Keverne EB, Hardwick J, Emson PC: **Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study.** *Eur J Neurosci* 1993, **5**:1684-1694.
 28. Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T: **Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb.** *Neurosci Res* 1995, **23**:73-88.
 29. Kosaka K, Kosaka T: **synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells.** *Anat Sci Int* 2005, **80**:80-90.
 30. Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC: **Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 2007, **501**:825-836.
 31. Mulder J, Zilberter M, Spence L, Tortoriello G, Uhlen M, Yanagawa Y, Aujard F, Hokfelt T, Harkany T: **Secretagogin is a Ca²⁺-binding protein specifying subpopulations of telencephalic neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:22492-22497.
 32. Kiyokage E, Pan YZ, Shao Z, Kobayashi K, Szabo G, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, et al.: **Molecular identity of periglomerular and short axon cells.** *J Neurosci* 2010, **30**:1185-1196.
 33. Kosaka T, Kosaka K: **"Interneurons" in the olfactory bulb revisited.** *Neurosci Res* 2011, **69**:93-99.
 34. De Marchis S, Bovetti S, Carletti B, Hsieh YC, Garzotto D, Peretto P, Fasolo A, Puche AC, Rossi F: **Generation of distinct types of periglomerular olfactory bulb interneurons during development and in adult mice: implication for intrinsic properties of the subventricular zone progenitor population.** *J Neurosci* 2007, **27**:657-664.
 35. Kelsch W, Mosley CP, Lin CW, Lois C: **Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns.** *PLoS Biol* 2007, **5**:e300.

36. Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A: **Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain.** *Science* 2007, **317**:381-384.
37. Batista-Brito R, Close J, Machold R, Fishell G: **The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes.** *J Neurosci* 2008, **28**:3966-3975.
38. Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A: **A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors.** *J Neurosci* 2007, **27**:6878-6891.
39. Korsching S: **Olfactory maps and odor images.** *Curr Opin Neurobiol* 2002, **12**:387-392.
40. Mori K: **Grouping of odorant receptors: odour maps in the mammalian olfactory bulb.** *Biochem Soc Trans* 2003, **31**:134-136.
41. Xu F, Liu N, Kida I, Rothman DL, Hyder F, Shepherd GM: **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* 2003, **100**:11029-11034.
42. Mori K, Takahashi YK, Igarashi KM, Yamaguchi M: **Maps of odorant molecular features in the Mammalian olfactory bulb.** *Physiol Rev* 2006, **86**:409-433.
43. Xu F, Greer CA, Shepherd GM: **Odor maps in the olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 2000, **422**:489-495.
44. Martin C, Grenier D, Thevenet M, Vigouroux M, Bertrand B, Janier M, Ravel N, Litaudon P: **fMRI visualization of transient activations in the rat olfactory bulb using short odor stimulations.** *Neuroimage* 2007, **36**:1288-1293.
45. Wang JW, Wong AM, Flores J, Vosshall LB, Axel R: **Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain.** *Cell* 2003, **112**:271-282.
46. Salcedo E, Zhang C, Kronberg E, Restrepo D: **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* 2005, **30**:615-626.
47. Schafer JR, Kida I, Rothman DL, Hyder F, Xu F: **Adaptation in the rodent olfactory bulb measured by fMRI.** *Magn Reson Med* 2005, **54**:443-448.
48. Johnson BA, Arguello S, Leon M: **Odorants with multiple oxygen-containing functional groups and other odorants with high water solubility preferentially activate posterior olfactory bulb glomeruli.** *J Comp Neurol* 2007, **502**:468-482.
49. Johnson BA, Leon M: **Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system.** *J Comp Neurol* 2007, **503**:1-34.
50. Guthrie KM, Anderson AJ, Leon M, Gall C: **Odor-induced increases in c-fos mRNA expression reveal an anatomical "unit" for odor processing in olfactory bulb.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:3329-3333.
51. Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG: **c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems.** *Front Neuroendocrinol* 1993, **14**:173-213.
52. Adrian ED: **The electrical activity of the mammalian olfactory bulb.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1950, **2**:377-388.
53. Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA: **Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain.** *Neurosci Lett* 1993, **149**:111-114.
54. Luskin MB: **Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone.** *Neuron* 1993, **11**:173-189.
55. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: **Chain migration of neuronal**

- precursors.** *Science* 1996, **271**:978-981.
56. Mendoza-Torreblanca JG, Martinez-Martinez E, Tapia-Rodriguez M, Ramirez-Hernandez R, Gutierrez-Ospina G: **The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain.** *Neurosci Res* 2008, **60**:289-299.
 57. Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL: **Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents.** *J Neurosci* 2002, **22**:437-445.
 58. Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, Goridis C, Rutishauser U, Magnuson T: **Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system.** *Neuron* 1993, **11**:1163-1174.
 59. Alonso M, Ortega-Perez I, Grubb MS, Bourgeois JP, Charneau P, Lledo PM: **Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ.** *J Neurosci* 2008, **28**:11089-11102.
 60. Menezes JR, Marins M, Alves JA, Froes MM, Hedin-Pereira C: **Cell migration in the postnatal subventricular zone.** *Braz J Med Biol Res* 2002, **35**:1411-1421.
 61. Davenne M, Custody C, Charneau P, Lledo PM: **In vivo imaging of migrating neurons in the Mammalian forebrain.** *Chem Senses* 2005, **30 Suppl 1**:i115-i116.
 62. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG: **Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain.** *Neurosci Lett* 2000, **291**:17-20.
 63. Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG: **Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb.** *Eur J Neurosci* 2002, **16**:1681-1689.
 64. Whitman MC, Greer CA: **Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates.** *Dev Neurobiol* 2007, **67**:1079-1093.
 65. Petreanu L, Alvarez-Buylla A: **Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction.** *J Neurosci* 2002, **22**:6106-6113.
 66. Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW: **Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 1985, **239**:117-125.
 67. Kato T, Yokouchi K, Fukushima N, Kawagishi K, Li Z, Moriizumi T: **Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats.** *Neurosci Lett* 2001, **307**:17-20.
 68. Kato T, Yokouchi K, Kawagishi K, Fukushima N, Miwa T, Moriizumi T: **Fate of newly formed periglomerular cells in the olfactory bulb.** *Acta Otolaryngol* 2000, **120**:876-879.
 69. Bayer SA: **3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb.** *Exp Brain Res* 1983, **50**:329-340.
 70. Lemasson M, Saghatelian A, Olivo-Marin JC, Lledo PM: **Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb.** *J Neurosci* 2005, **25**:6816-6825.
 71. Kim WR, Kim Y, Eun B, Park OH, Kim H, Kim K, Park CH, Vinsant S, Oppenheim RW, Sun W: **Impaired migration in the rostral migratory stream but spared olfactory function after the elimination of programmed cell death in Bax knock-out mice.** *J Neurosci* 2007, **27**:14392-14403.
 72. Mizrahi A: **Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb.** *Nat Neurosci* 2007, **10**:444-452.
 73. Fiske BK, Brunjes PC: **Cell death in the developing and sensory-deprived rat**

- olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 2001, **431**:311-319.
74. Yamaguchi M, Mori K: **Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:9697-9702.
 75. Philpot BD, Men D, McCarty R, Brunjes PC: **Activity-dependent regulation of dopamine content in the olfactory bulbs of naris-occluded rats.** *Neuroscience* 1998, **85**:969-977.
 76. Cho JY, Min N, Franzen L, Baker H: **Rapid down-regulation of tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb of naris-occluded adult rats.** *J Comp Neurol* 1996, **369**:264-276.
 77. Baker H, Morel K, Stone DM, Maruniak JA: **Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb.** *Brain Res* 1993, **614**:109-116.
 78. Parrish-Aungst S, Kiyokage E, Szabo G, Yanagawa Y, Shipley MT, Puche AC: **Sensory experience selectively regulates transmitter synthesis enzymes in interglomerular circuits.** *Brain Res* 2011, **1382**:70-76.
 79. Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM: **Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory.** *J Neurosci* 2002, **22**:2679-2689.
 80. Rochefort C, Lledo PM: **Short-term survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb after exposure to a complex odor environment.** *Eur J Neurosci* 2005, **22**:2863-2870.
 81. Veyrac A, Sacquet J, Nguyen V, Marien M, Jourdan F, Didier A: **Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms.** *Neuropsychopharmacology* 2009, **34**:786-795.
 82. Breton-Provencher V, Lemasson M, Peralta MR, 3rd, Saghatelian A: **Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors.** *J Neurosci* 2009, **29**:15245-15257.
 83. Moreno MM, Linstner C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandairon N: **Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:17980-17985.
 84. Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R: **Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:8479-8484.
 85. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S: **Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin.** *Science* 2003, **299**:117-120.
 86. Feierstein CE, Lazarini F, Wagner S, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Boussin FD, Lledo PM, Gheusi G: **Disruption of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb Affects Social Interaction but not Maternal Behavior.** *Front Behav Neurosci* 2010, **4**:176.
 87. Sultan S, Mandairon N, Kermen F, Garcia S, Sacquet J, Didier A: **Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory.** *Faseb J* 2010, **24**:2355-2363.
 88. Mandairon N, Sacquet J, Garcia S, Ravel N, Jourdan F, Didier A: **Neurogenic correlates of an olfactory discrimination task in the adult olfactory bulb.** *Eur J Neurosci* 2006, **24**:3578-3588.
 89. Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM: **Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born**

- neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2006, **26**:10508-10513.**
90. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R: **Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain.** *Nat Neurosci* 2008, **11**:1153-1161.
 91. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ: **Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.** *Anat Rec* 1991, **231**:482-497.
 92. Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J: **Functional integration of adult-born neurons.** *Curr Biol* 2002, **12**:606-608.
 93. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM: **Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb.** *Nat Neurosci* 2003, **6**:507-518.
 94. Mizrahi A, Lu J, Irving R, Feng G, Katz LC: **In vivo imaging of juxtglomerular neuron turnover in the mouse olfactory bulb.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:1912-1917.
 95. Kovacs KJ: **Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond.** *J Neuroendocrinol* 2008, **20**:665-672.
 96. Murthy VN: **Olfactory maps in the brain.** *Annu Rev Neurosci* 2011, **34**:233-258.
 97. Schmitz C, Hof PR: **Design-based stereology in neuroscience.** *Neuroscience* 2005, **130**:813-831.
 98. Hwang IK, Yoo KY, Nam YS, Choi JH, Seo K, Lee IS, Jung JY, Kang TC, Oh YS, Won MH: **Age-related changes in calretinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat main olfactory bulb.** *J Vet Med Sci* 2006, **68**:465-469.
 99. Gomez-Lira G, Lamas M, Romo-Parra H, Gutierrez R: **Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells.** *J Neurosci* 2005, **25**:6939-6946.
 100. Calas A, Landry M, Roche D, Trembleau A: **[A model of phenotypic plasticity: the hypothalamo-posthypophyseal neurons].** *C R Seances Soc Biol Fil* 1994, **188**:187-206.
 101. Chauvet N, Drian MJ, Privat A: **Immunocytochemical study of phenotypic plasticity of cultured dorsal root ganglion neurons during development.** *Int J Dev Neurosci* 1995, **13**:673-683.
 102. Bovetti S, Peretto P, Fasolo A, De Marchis S: **Spatio-temporal specification of olfactory bulb interneurons.** *J Mol Histol* 2007, **38**:563-569.

IX. ANEXOS



Chronically reinforced, operant olfactory conditioning increases the number of newborn GABAergic olfactory periglomerular neurons in the adult rat

Miguel Tapia-Rodríguez^{a,b,c,*}, José F. Esquivelzeta-Rabell^{a,c}, Gabriel Gutiérrez-Ospina^{a,c,*}

^a Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas and Grupo de Investigación en Células Troncales, IMPULSA 02, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, Mexico

^b Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Unidad de Posgrado, Ciudad Universitaria, UNAM, 04510, Mexico

^c Programa Universitario de Investigación en Células Troncales Neuronales, IMPULSA-02, Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2012

Received in revised form 28 August 2012

Accepted 12 September 2012

Available online 20 September 2012

Keywords:

Adult neurogenesis

Glomerular layer

Olfactory neurons

Periglomerular neuron differentiation

Animal conditioning

Neural activity

ABSTRACT

The mammalian brain preserves the ability to replace olfactory periglomerular cells (PGC) throughout life. Even though we have detailed a great deal the mechanisms underlying stem and amplifying cells maintenance and proliferation, as well as those modulating migration and differentiation, our knowledge on PGC phenotypic plasticity is at best fragmented and controversial. Here we explored whether chronically reinforced olfactory conditioning influences the phenotype of newborn PGC. Accordingly, olfactory conditioned rats showed increased numbers of GAD 65/67 positive PGC. Because such phenotypic change was not accompanied neither by increments in the total number of PGC, or periglomerular cell nuclei labeled with bromodeoxyuridine, nor by reductions in the number of tyrosine hydroxylase (TH), calbindin (CB) or calretinin (CR) immunoreactive PGC, we speculate that increments in the number of GABAergic PGC occur at the expense of other PGC phenotypes. In any event, these results support that adult newborn PGC phenotype may be subjected to phenotypic plasticity influenced by sensory stimulation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Adult mammalian neurogenesis is now a well-established fact since a wealth of studies have consistently documented its occurrence in the subventricular zone (SVZ), the rostral migratory stream (RMS), the olfactory bulb (OB) and the hippocampal formation of various species (Altman, 1969; Eriksson et al., 1998; Goldman and Nottebohm, 1983; Lois and Alvarez-Buylla, 1993). In spite of this certainty, some important aspects of adult neurogenesis remain poorly understood. For example, it remains unclear which factors influence the commitment of adult neuroblasts to become interneurons of specific phenotypes. An emerging model derived from lineage studies of rodent OB newborn PGC sustains, nonetheless, that is the neuroblast intrinsic programming which commits adult neuroblasts to differentiate into pre-specified phenotypes that are later integrated in relatively constant proportions within OB circuits (Bagley et al., 2007; Bovetti et al., 2007). In this model, neuroblasts birth site and migratory path

(Alonso et al., 2008; Kelsch et al., 2007; Mendoza-Torreblanca et al., 2008; Merkle et al., 2007), as well as their birth date (Batista-Brito et al., 2008) determine their phenotypic fate. Clearly site/ birth phenotypic determination would restrict the ability of PGC population to realize plastic adjustments. However, since nostril closure reduces neurogenesis and OB newborn granular cell survival and number (Corotto et al., 1994), as well as the complexity of their dendritic arborization and dendritic spine number (Saghatelyan et al., 2005), and olfactory environmental enrichment up regulates precursor cell proliferation at SVZ and RMS (Alonso et al., 2008), it is possible that olfactory experience could shift adult PGC phenotypic fate. The possibility that PGC might be subjected to phenotypic population plasticity is supported by the documented increments of dopaminergic PGC in the OB of Parkinsonian patients (Huisman et al., 2004) and in the rat OB following striatal dopaminergic deafferentation (Winner et al., 2005).

Hence, in this work we conducted experiments aimed at documenting the impact of chronically reinforced, operant olfactory conditioning on OB PGC terminal phenotype. Accordingly, our observations indicate that chronically reinforced, operant olfactory conditioning increases GABAergic newborn PGC number in the adult rat OB, a finding that supports that PGC may be subjected to phenotype population plasticity in response to epigenetic factors associated with olfactory experience and learning.

* Corresponding authors at: Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, DF 04510, Mexico. Tel.: +52 55 5622 9185; fax: +52 55 5622 3897.

E-mail addresses: mtapia@biomedicas.unam.mx (M. Tapia-Rodríguez), gabo@biomedicas.unam.mx (G. Gutiérrez-Ospina).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experiments were conducted in adult male Wistar rats (90 days old) bred and raised at the animal facilities of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The rats were kept in rooms with controlled temperature, humidity, light (lights on at 7:00 a.m., light off at 18:00 p.m.) and clean air. Rats grouped as controls (control; $n = 20$) had free access to food and water, whereas those considered as unconditioned (UC; $n = 20$) or olfactory conditioned (OC; $n = 20$) were fed ad libitum but allowed to drink water only during 15 min every day between 6:00 and 7:00 p.m. Body measurements of control, UC and OC rats did not differ throughout the experimentation time (not shown). Animal handling and experimental procedures followed the NIH Guide for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the local Animal Rights Committee.

2.2. Mapping OB activation following hexanal exposure

Functional mapping studies have shown that OB Antero-Ventro-Lateral (AVL) subfield is predominantly activated, over other subfields across the OB, following hexanal exposure (Xu et al., 2003). To confirm these data and thus validate the use of OB AVL subfield to analyze PGC population phenotypic plasticity in response to reinforced olfactory conditioning by cell counting (see below), we exposed rats ($n = 5$) to hexanal (0.2% diluted in mineral oil; Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) released from micro-centrifuge tubes fixed to the cage's wall. The tubes were manually opened and kept open for 15 s. After this time, the tube was closed for 45 s. Then this manipulation was repeated 9 times more. By the end of this period, the rats were kept unstimulated inside the cage for 30 min and euthanized with pentobarbital (20 mg i.p./kg of body weight). Hexanal exposure was always conducted into clean standard cages equipped with an air-purifying device (Electrónica Steren, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico). Control rats ($n = 5$) were maintained in the same cages for 1 h but unexposed to hexanal and sacrificed as described. Control and exposed rats were then perfused through the heart with cold saline solution followed by buffered paraformaldehyde (4%) and decapitated. Their brains were removed, postfixed in the same fixative during 2 h at room temperature, cryoprotected through graded buffered sucrose solutions (20% and 30%), frozen in 4-methylbutane pre-chilled with dry ice and stored at -74°C until used. OB serial coronal sections (45 μm thick) were cut in a cryostat and collected individually in 96-well culture plates filled with 0.1 M phosphate buffer (PB). After three washes with PB supplemented with 0.3% Triton X-100 (PBT), sections were incubated with 3% H_2O_2 during 10 min, then washed out and subsequently incubated with sodium chloride/sodium citrate ($2\times$ SSC) for 60 min at 70°C and then at room temperature for 30 min. After a thorough wash step, the sections were incubated with primary antibodies raised in rabbit against human c-Fos (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) diluted in 3% horse serum/PBT at room temperature overnight. At the end of this period, the sections were washed with PB three times, incubated for 2 h at room temperature with donkey anti-rabbit biotinylated antibodies (1:2000, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) diluted with PB. Then, following a wash step, the sections were incubated with avidin-peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) for 1.30 h and rinsed and peroxidase activity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine as recommended by the supplier (Vector). After three washes, the sections were counterstained with DAPI, mounted onto gelatin subbed slides and coverslipped with Cytoseal medium (Richard Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA). Once immunostained, external contours of olfactory bulbs in each serial section were traced ($4\times$ magnification) with the aid of StereoInvestigator 8 (MicroBrightField Inc., Colchester, VT, USA), using a microscope (Nikon Optiphot-2, Nikon Instruments, Melville, NY, USA). Then, the external and internal boundaries of the glomerular layer were traced at $10\times$. Once OBs were fully reconstructed for each rat (see Suppl. Fig. 1 for an example), OBs anatomical subfields were identified and the number of c-Fos immunoreactive nuclei per subfield was estimated at $40\times$ by using Meander scan analyses with the aid of StereoInvestigator 8. Comparisons among OB subfields were carried out using one-way ANOVA tests followed by Bonferroni's post hoc tests with a significance value set at $p < 0.01$.

2.3. Olfactory operant conditioning

To evaluate the effect of chronic exposure to meaningful olfactory experiences on newborn PGC fate in adult rats, we instrumented a protocol of operant olfactory conditioning that was chronically reinforced to avoid odor habituation. Rats assigned to the olfactory conditioned (OC) group were thus trained to associate the presence of the odorant hexanal with the possibility of gaining access to drinking water. Extinction of the learned ability was avoided by reinforcing the association throughout the experiment. Two groups of OC rats were used. One of them was sacrificed 30 days and the other 90 days after last BrdU injection (see below). In our studies, the odorant concentration was the lowest the rats could detect under our experimental conditions. Behavioral training and testing were carried out in a custom-made acrylic maze having four arms that run orthogonal from the main corridor (Suppl. Fig. 2A). Each arm was separated from the corridor by sliding gates and the corridor was side-accessed through a sliding main gateway. The entering air

was always purified and the used one was extruded at the end of the main corridor with the aid of a small fan; the maze was cleaned following each trial at all times. To minimize anxiety during behavioral testing, both OC and UC rats were familiarized with the maze by allowing them to explore it freely in daily 15-min sessions during 1 week. Once habituated (as judged by the absence of fecal balls and urination), OC animals were first subjected to three daily training sessions during ~ 15 days until they reach adequate proficiency solving the task. For OC rats, both the training and the reinforcing sessions always unfolded as follows: once the odor tube was opened, the main corridor and the side gateway was slide closed, the rat was allowed to explore the main corridor during 1 min while being prevented of going into the maze's arms by keeping the corresponding gates closed. By the end of this period, all of the arms' gates were opened slightly simultaneously (test's starting time-point), allowing the rat to introduce the nose into the arms until identifying the one where the conditioned stimulus (odor) and the reinforcer (water) spatially coincided. The time taken by each animal to identify the reinforcing arm was recorded. Once OC rats identified the reinforcing arm, they were allowed to enter it and drink the milliliter of water. In contrast, UC rats were allowed to explore the maze freely under similar conditions but preventing any olfactory or place associations with the reinforcer; they had to find the water having no sensory cues available to guide their search. As shown in Suppl. Fig. 2B, OC rats reached $\approx 95\%$ of correct responses after $45 + 6$ sessions (day 15 of training), solving the test within an average of $1 + 0.5$ s. This performance was maintained throughout the experiment by exposing OC rats to daily reinforcing sessions. During training and reinforcing sessions, 0.2% hexanal was released from a micro-centrifuge tube placed on the right wall of the reinforcing arm, 3 cm away from the gate and 1 cm above floor. Water was poured in a black Petri dish placed at the far-end of the reinforcing arm. The non-reinforcing arms also had micro-centrifuge tubes but filled with mineral oil only and the corresponding Petri's dishes contained no water. To avoid place-conditioning, the reinforcing arm was shifted randomly across training sessions and behavioral trials for each animal. In addition, to ensure consistent behavioral response of OC rats across trials, these animals were occasionally and randomly tested under circumstances that (1) segregated conditioned and reinforcing stimuli in different maze's arms, (2) that had no water available in any of the maze's arms (under conditions 1 and 2 OC rats displayed a marked preference by the "odor expelling" arm; not shown) or (3) that had available no conditioned stimulus (OC rats displayed no arm preference; not shown). Hence, by the time cell counting was conducted (see below), olfactory learning was still operational. Finally, maze performance was evaluated by measuring the latency from the time-point when simultaneous arms gate opening (0.00 s) took place until the rats first encountered the maze's reinforcing arm.

2.4. Newborn PGC immunocytochemical phenotyping

To evaluate whether learning meaningful olfactory experiences influence adult newborn PGC population phenotype control, UC and OC rats were injected intraperitoneally with BrdU (50 mg/kg, Sigma) once a day during six consecutive days. Both UC and OC rats were injected for the first time at day 15 of conditioning, when OC rats reached $\sim 95\%$ proficiency in solving the olfactory task (see Suppl. Fig. 2B). The animals were perfused 30 days (30d) or 90 days (90d) after the first BrdU injection. These time-points were selected because previous studies reported that the number of BrdU immunoreactive cells that are present in the OB glomerular layer is highest after 30d, decreases by 50% at 90d and remain unchanged thereafter at least for up to 6 months (Winner et al., 2002). After perfusion, OBs were dissected, cryoprotected, sectioned coronally (45 μm) and collected in buffered paraformaldehyde as described before. After three washes (10 min each) with PBT, the sections were incubated with $2\times$ SSC during 60 min at 70°C and then at room temperature for 30 min. Then, sections were incubated with an aqueous solution of HCl (2 N) at 37°C for 30 min followed by a solution containing sodium borate (0.1 M, pH 8.5) during 10 min at room temperature. Next, the sections were washed three times and simultaneously incubated with mouse anti-BrdU (1:200; Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany), goat anti-calretinin (CR; 1:800, Millipore, Billerica, MA, USA), and one of the following antibodies (all from Millipore): rabbit anti-calbindin D28K (CB; 1:800), rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH; 1:800) or rabbit anti-glutamate decarboxylase 65/67 kDa (GAD 65/67; 1:400) diluted in PBT added with 3% horse serum at room temperature overnight. By the end of this period, the sections were washed with PB three times and incubated during 2 h at room temperature with the following secondary antibodies raised in donkey (all from Invitrogen): Alexa 488 anti-mouse, Alexa 594 anti-rabbit and Alexa 647 anti-goat (1:300) diluted in PB. After three washes, the sections were counterstained with DAPI. Sections were then mounted onto slides and coverslipped with anti-fading medium (DAKO, Glostrup, Denmark). Digital images of the sections were captured using a Zeiss LSM 5 Pascal confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

2.5. Stereological and Meander scan procedures

All stereological analyses were carried out across the glomerular layer of the OB AVL subfield. Only BrdU-IR nuclei having a spherical shape and a diameter of 8–10 μm were considered in our counts; these nuclear features have been previously ascribed to PGC (Shepherd, 1972). BrdU-IR nuclei counts were carried out every two

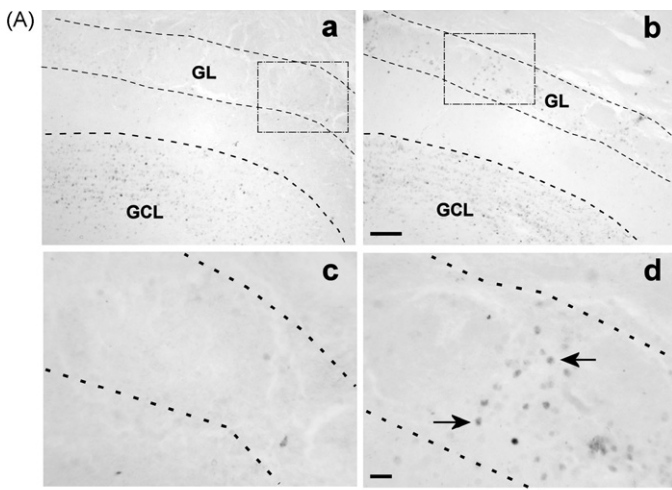
or three sections under a $45 \mu\text{m} \times 35 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ counting frame with guard zones of $4 \mu\text{m}$ and a sampling grid of $50 \mu\text{m}^2$. Nuclei that either intersected upper or lateral boundaries of the guard zone were discarded from our counts. For estimating total cell numbers, DAPI stained nuclei were also counted with periodicity every ninth section. In this case, the size of the counting frame was $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ with guard zones of $4 \mu\text{m}$ and a sampling grid of $200 \mu\text{m}$.

Doubly labeled BrdU/CB, BrdU/CR and BrdU/GAD 65/67-IR PGC were counted across the entire OB AVL zone using a motorized stage and an exhaustive sampling method called meander scan. Counts were carried out at $100\times$ (N.A. 1.4) using the optical fractionator for counting BrdU-IR nuclei (West et al., 1991) and the meander scan for doubly labeled PGN with the aid of an Olympus DSU confocal microscope commanded by the StereoInvestigator 8 software (MicroBrightField, Inc.). Planimetric estimates of the OB AVL subfield volume were obtained by using Stereo Investigator 8 software. Gundersen's coefficient error for stereological estimates was always below 0.1. Comparisons among groups (when applied) were carried out using one-way ANOVA followed by Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post hoc tests with a significance value set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. c-Fos OB AVL subfield periglomerular cell nuclei number significantly increases following acute hexanal exposure

Functional mapping studies have shown that OB AVL is predominantly activated, over other fields across the OB, following hexanal exposure (Xu et al., 2003). As shown in Fig. 1A, we confirmed this observation and thus validated our model system to explore the role of olfactory experience on PGC phenotypic fate. Even though the number of c-Fos periglomerular cell nuclei increases in all OB subfields, this increment only reached statistical significance in OB AVL (Fig. 1B).



	Control	Hexanal-estimated
ADM	59.67±18.52	125.67±33.74
ADL	59.33±13.19	174±20
AVM	99.67±5.49	145.67±28.87
AVL	74.67±7.62	363.67±49.33 *
PDM	78.67±32.01	186.67±36.79
PDL	52.67±13.57	97±24.51
PVM	103.33±26.87	109.67±6.38
PVL	20.33±2.02	39.67±9.06

Fig. 1. (A) Representative bright field images that shows c-Fos immunoreactive staining in AVL zone of both control (a, c) and hexanal-stimulated (b, d) animals. Although there is a prominent nuclei activation in granular cell layer (GCL) of both control and HS rats (see a, b), only glomerular layer (GL) from AVL zone of HS rats is specifically stained with a few, intense cell nuclei of some PGC activated by the aldehyde (arrows in d); (c) and (d) were captured from boxed regions shown in (a) and (b), respectively. (B) Stereological estimate of c-Fos-IR nuclei in different regions of glomerular layer of olfactory bulb, in both control and odor-stimulated rats. ADM, antero dorso medial; ADL, antero dorso lateral; AVM, antero ventro medial; AVL, antero ventro lateral; PDM, postero dorso medial; PDL, postero dorso lateral; PVM, postero ventro medial; PVL, postero ventro lateral; $n = 5$ ($*p < 0.01$, one-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc test, between regions). Scale bar: (a, b) $100 \mu\text{m}$ and (c, d) $20 \mu\text{m}$.

Table 1

Cell number of double labeled PGC in the AVL zone.

	BrdU/TH	BrdU/CB	BrdU/CR	BrdU/GAD
30 days				
C	104 ± 46	49 ± 25	95 ± 19	161 ± 18
UC	98 ± 51	24 ± 16	161 ± 68	245 ± 47
OC	94 ± 53	73 ± 48	209 ± 30	127 ± 133
90 days				
C	111 ± 49	62 ± 71	65 ± 25	123 ± 14
UC	50 ± 32	33 ± 24	65 ± 23	111 ± 96
OC	108 ± 77	49 ± 30	124 ± 25	303 ± 60*

C, control; UC, unconditioned rats; OC, conditioned rats; $n = 5$.

* $p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey's HSD post hoc test, against same ages and conditions.

3.2. Conditioned olfactory experience increases the number of newborn positive GABAergic PGC across the OB AVL

After confirming response specificity, we evaluated the effect of conditioned olfactory experience on the phenotypic plasticity of newborn PGC. The number of newborn BrdU/TH, BrdU/CB, BrdU/CR and BrdU/GAD 65/67 positive PGC was estimated in control, UC and OC at 30 or 90 days after the last injection of BrdU. These phenotypes were selected because TH and CR positive PGC are produced preferentially at perinatal ages, whereas the majority of CB positive PGC are generated after a month of life (Batista-Brito et al., 2008); these cell populations might then display differential plastic responses to conditioned olfactory experience. Our results documented that neither TH positive nor CB and CR positive PGC differed among control, UC and OC rats at 30 or 90 days (Table 1). In contrast, the number of GAD65/67 positive PGC increased ~ 2.5 fold compared with their age matched control counterparts, after 90 days of olfactory conditioning (Fig. 2).

3.3. BrdU periglomerular cell nuclei did not differ among control, UC and OC rats

To evaluate whether increased number of GABAergic PGC was due to overall increments in PGC number, we estimated OB AVL volume and the total number of PGC and of BrdU positive cell nuclei across OB AVL. Our studies revealed that none of these parameters differed among control, UC and OC rats at 30 or 90 days after de last injection of BrdU (Fig. 3). We observed, however, a $\sim 50\%$ reduction in the number of BrdU positive periglomerular cell nuclei across the OB AVL between 30 and 90 days. This observation agrees with previous findings by (Alonso et al., 2006; Winner et al., 2002).

4. Discussion

Adult neurogenesis in the mammalian brain is no longer a debated idea, but a well-established fact. Even though we now know a great deal about the molecular underpinnings governing adult neural stem and amplifying cells maintenance and proliferation and neuroblast migration and differentiation, the current understanding on the ability of adult neuroblasts to shift their phenotype both at a single cell and/or at the population levels is rather limited. In fact, it has been suggested that adult neuroblasts derive from an already pre-committed set of precursors located at the brain neurogenic niches (Batista-Brito et al., 2008; Merkle et al., 2007). This circumstance would make phenotypic plasticity of newborn neurons a rare event. Increments in olfactory dopaminergic PGC in Parkinsonian patients (Huisman et al., 2004) or following striatal dopaminergic deafferentation in rats (Winner et al., 2005) support, nonetheless, that at least this PGC subpopulation displays phenotypic plasticity. In this work, we

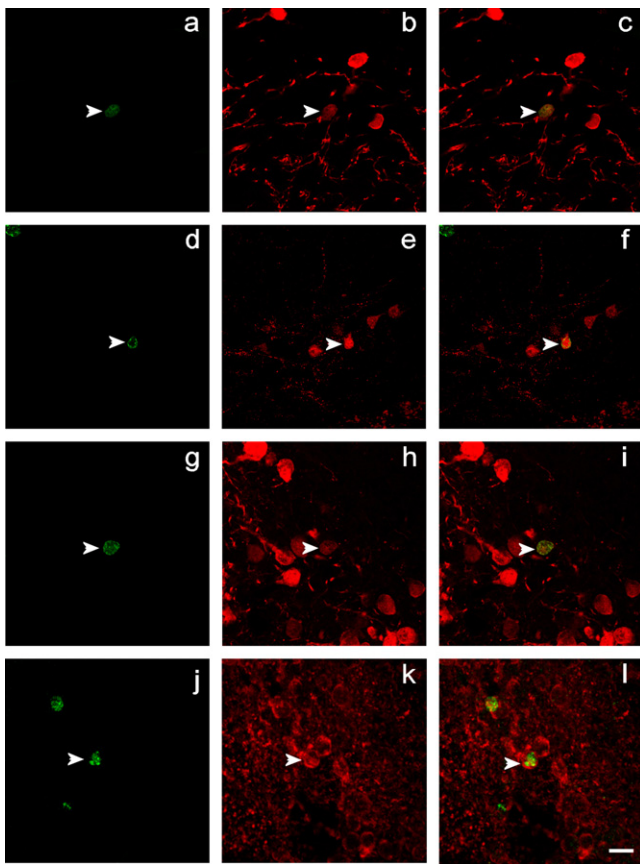


Fig. 2. Representative confocal images that illustrate the histological material used to quantify periglomerular interneuron subtypes in the olfactory bulb of control, place-habituated and olfactory-conditioned rats. Representative images were taken from control rats in the antero-ventro-lateral area of the glomerular layer of the olfactory bulb at 30 days after last BrdU injection. Periglomerular interneuron subtypes positive for calbindin (b), calretinin (e), tyrosine hydroxylase (h) and glutamic acid decarboxylase 65/67 kDa (k) are shown under the red channel. BrdU positive nuclei (a, d, g, j) are presented under the green channel. Merge images for each lineage could be observed in the last panel; arrowheads shows BrdU/CB (c), BrdU/CR (f), BRdU/TH (i) and BrdU GAD65/67 (l) double positive PGC. Scale bar: 20 μm .

evaluated whether conditioned olfactory experience induced PGC phenotypic plasticity. Our results show that conditioned olfactory experience increases the number of GAD 65/67 PGC after 90 days of conditioning, thus suggesting that GABAergic PGC indeed are subjected to phenotypic plasticity. Although our study does not discriminate between GAD 65 and GAD 67 containing PGC, it has been suggested before that sensory experience preferentially affects GAD 67 PGC (Parrish-Aungst et al., 2011).

The mechanism by which conditioned olfactory experience increases the number of GABAergic PGC across OB AVL is unknown. Increased global proliferation or decreased global neuronal death, both process affected by sensory experience and olfactory learning could be involved (Alonso et al., 2006; Bastien-Dionne et al., 2010; Mandairon et al., 2011; Rochefort et al., 2002; Rochefort and Lledo, 2005; Sultan et al., 2010). However, the lack of differences in the number of BrdU positive periglomerular cell nuclei, in the total cell number and in the total volume across the OB AVL among experimental groups, suggests that neither one explains our findings.

A possible explanation comes from observations that, in rats, distinct PGC phenotypes are produced at different ages, with TH and CB positive PGC being predominantly produced at perinatal and CR positive PGC at older ages (Batista-Brito et al., 2008).

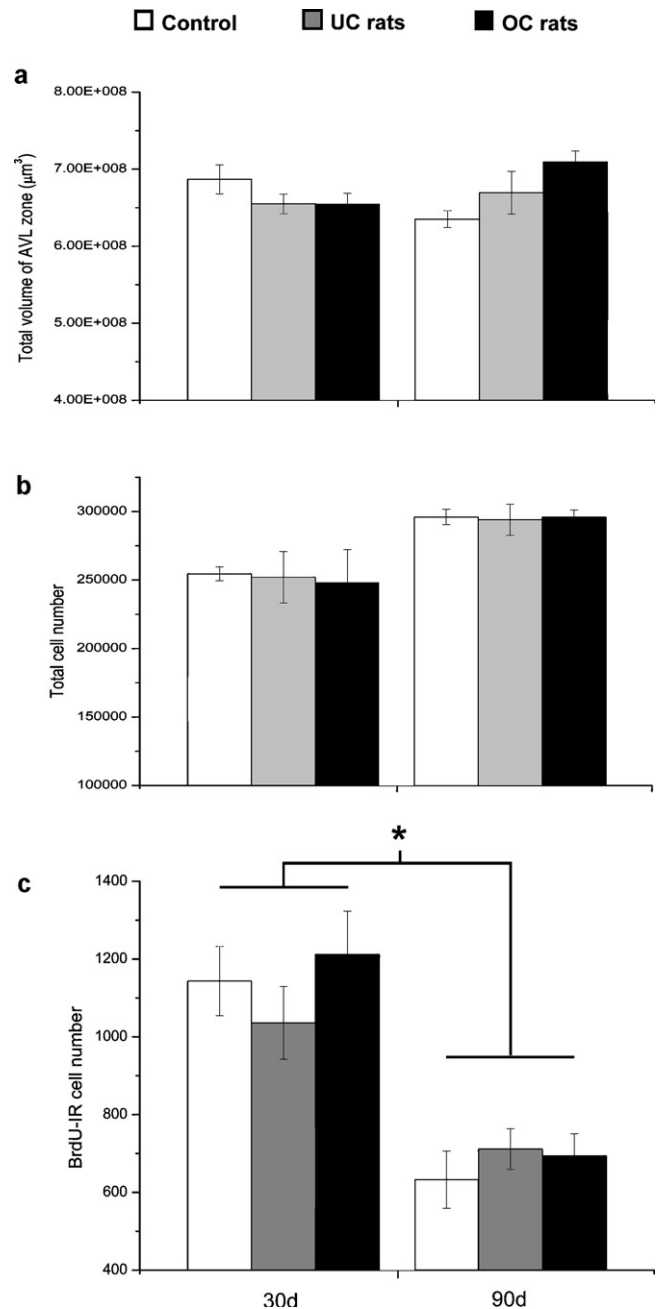


Fig. 3. Graphs that shows the total volume estimates (a), total cell number (b), and the number of BrdU positive periglomerular nuclei (c) in AVL zone obtained with planimetric (a) and stereological (b and c) analyses of control, unconditioned (UC) and odor-conditioned (OC) rats from 30 or 90 days after the last injection of BrdU. We found no evident differences in both volume and total cell number estimates in the case for BrdU positive cells there was no difference among experimental groups at each age evaluated; nevertheless, a reduction of about 50% is observed between these time points (one-way ANOVA, Tukey's HSD post hoc test: $p < 0.05$, $n = 20$ for each group).

GABAergic phenotypic plasticity might then be achieved by preferentially promoting the proliferation of committed neuronal precursors that give rise to GABAergic PGC different from those positive to CR and CB and/or by differentially enhancing other subtypes of newborn PGC. That either one of these possibilities may be likely is supported by our observations that the number of adult newborn TH, CB and CR positive PGC, and the number of BrdU periglomerular cell nuclei are similar among control, UC and OC rats at 30 or 90 days after of conditioning, so the increment of

GABAergic PGC should proceed at the expense of subpopulations different from the phenotypes evaluated here; there are at least 10 different subtypes of PGC in the rat OB (Bovetti et al., 2007; Kosaka and Kosaka, 2005; Lledo et al., 2008; Parrish-Aungst et al., 2007; Whitman and Greer, 2007).

Repeated exposure to an odorant in mice (Wang et al., 1993), rats (Youngentob and Kent, 1995) and humans (Jacob and Wang, 2006) enhances odorant sensitivity, the amplitude of the corresponding evoked responses and originates supernumerary glomeruli (Valle-Leija et al., 2012). Increments in GABAergic PGC subtypes following conditioned olfactory experience might then provide a mean to fine tune olfactory discrimination.

Acknowledgements

We are grateful to M. en C. Patricia Padilla for their technical and administrative assistance, to MVZ Georgina Díaz Herrera for providing animal care and to the Microscopy Facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas for their technical support. We thank Edmund Glaser (MicroBrightField, Inc.) for donating to our institution one of the systems used to carry out the stereological analyses, and to Unidad de Microscopía of Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM for their continuous support to our work. *Grant sponsors:* The present work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Grants PAPIIT IN210105; XTLI 372318701) and IMPULSA-02, Universidad Nacional Autónoma de México. Additional funding was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grants 38615N and 45872M; Programa de Apoyos Integrales para la Formación de Doctores en Ciencias 2006, 53194). MTR was recipient of fellowships sponsored by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Estudios de Posgrado-UNAM. JFER received financial aid from the FLAG Foundation.

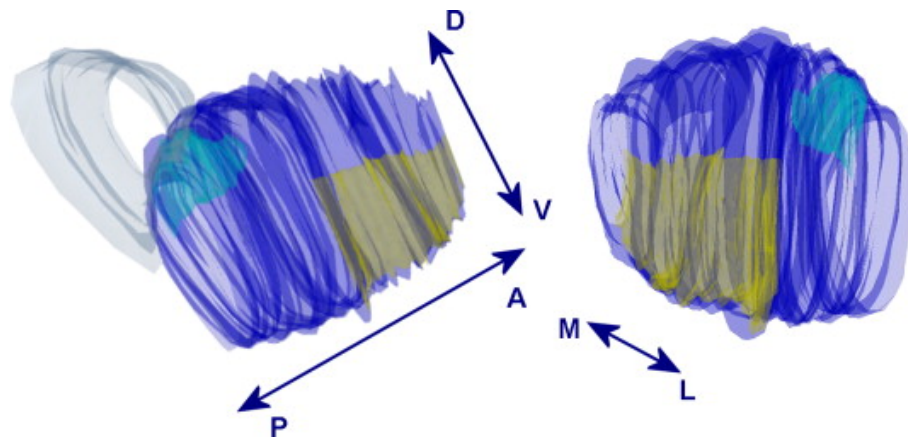
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.09.001>.

References

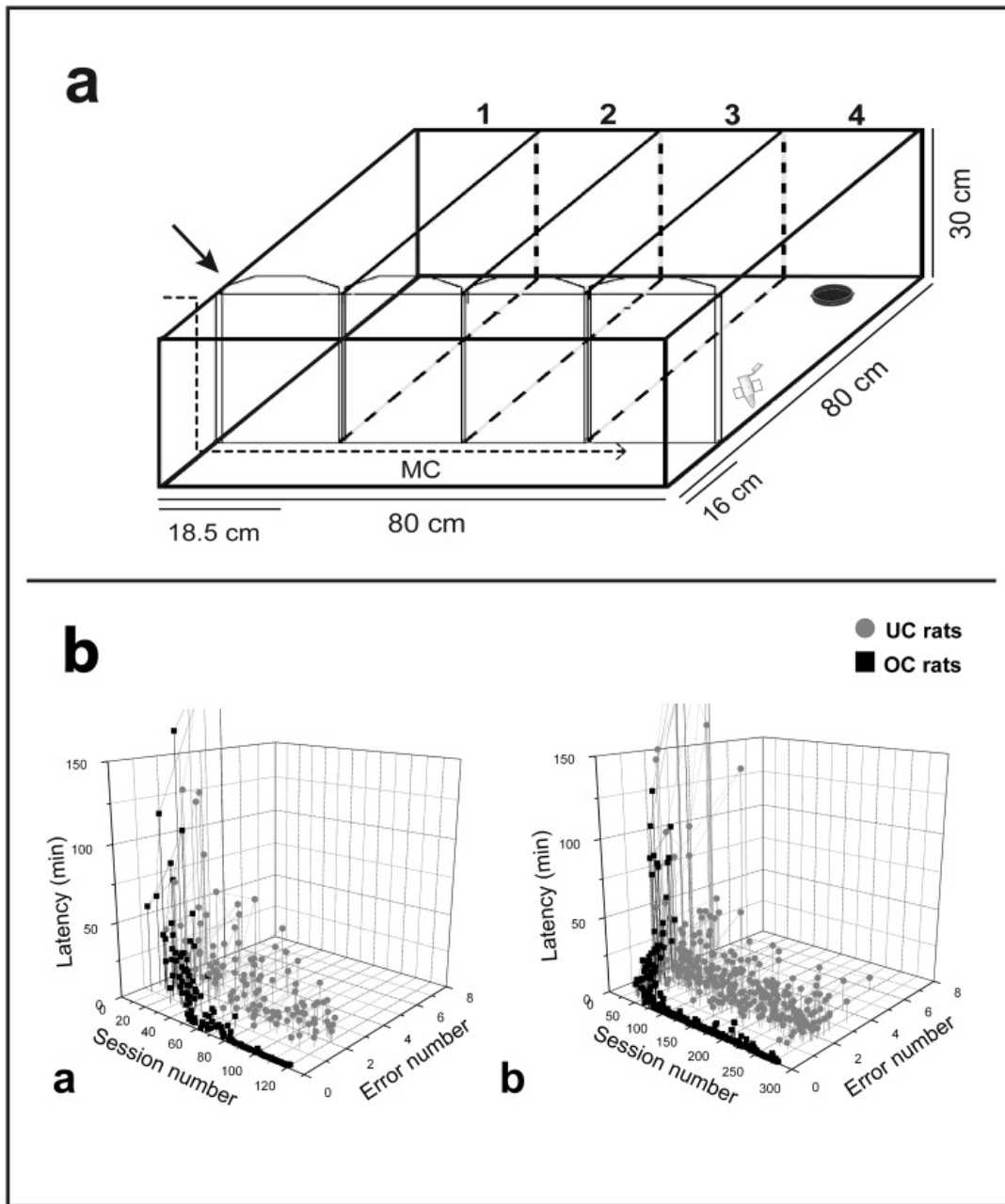
- Alonso, M., Ortega-Perez, I., Grubb, M.S., Bourgeois, J.P., Charneau, P., Lledo, P.M., 2008. Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *Journal of Neuroscience* 28, 11089–11102.
- Alonso, M., Viollet, C., Gabellec, M.M., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.C., Lledo, P.M., 2006. Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience* 26, 10508–10513.
- Altman, J., 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 137, 433–457.
- Bagley, J., LaRocca, G., Jimenez, D.A., Urban, N.N., 2007. Adult neurogenesis and specific replacement of interneuron subtypes in the mouse main olfactory bulb. *BMC Neuroscience* 8, 92.
- Bastien-Dionne, P.O., David, L.S., Parent, A., Saghatelian, A., 2010. Role of sensory activity on chemospecific populations of interneurons in the adult olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 518, 1847–1861.
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R., Fishell, G., 2008. The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *Journal of Neuroscience* 28, 3966–3975.
- Bovetti, S., Peretto, P., Fasolo, A., De Marchis, S., 2007. Spatio-temporal specification of olfactory bulb interneurons. *Journal of Molecular Histology* 38, 563–569.
- Corotto, F.S., Henegar, J.R., Maruniak, J.A., 1994. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61, 739–744.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4, 1313–1317.
- Goldman, S.A., Nottebohm, F., 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 2390–2394.
- Huisman, E., Uylings, H.B., Hoogland, P.V., 2004. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 19, 687–692.
- Jacob, T.J., Wang, L., 2006. A new method for measuring reaction times for odour detection at iso-intensity: comparison between an unpleasant and pleasant odour. *Physiology and Behavior* 87, 500–505.
- Kelsch, W., Mosley, C.P., Lin, C.W., Lois, C., 2007. Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS Biology* 5, e300.
- 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, 80–90.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A., 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 2074–2077.
- Lledo, P.M., Merkle, F.T., Alvarez-Buylla, A., 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends in Neurosciences* 31, 392–400.
- Mandairon, N., Sultan, S., Nouvian, M., Sacquet, J., Didier, A., 2011. Involvement of newborn neurons in olfactory associative learning? The operant or non-operant component of the task makes all the difference. *Journal of Neuroscience* 31, 12455–12460.
- Mendoza-Torrealblanca, J.G., Martinez-Martinez, E., Tapia-Rodríguez, M., Ramirez-Hernandez, R., Gutierrez-Ospina, G., 2008. The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain. *Neuroscience Research* 60, 289–299.
- Merkle, F.T., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A., 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381–384.
- Parrish-Aungst, S., Kiyokage, E., Szabo, G., Yanagawa, Y., Shipley, M.T., Puche, A.C., 2011. Sensory experience selectively regulates transmitter synthesis enzymes in interglomerular circuits. *Brain Research* 1382, 70–76.
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M.T., Erdelyi, F., Szabo, G., Puche, A.C., 2007. Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 501, 825–836.
- Rocheffort, 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, 2679–2689.
- Rocheffort, C., Lledo, P.M., 2005. Short-term survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb after exposure to a complex odor environment. *European Journal of Neuroscience* 22, 2863–2870.
- Saghatelian, A., Roux, P., Migliore, M., Rocheffort, C., Desmaisons, D., Charneau, P., Shepherd, G.M., Lledo, P.M., 2005. Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron* 46, 103–116.
- Shepherd, G.M., 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiological Reviews* 52, 864–917.
- Sultan, S., Mandairon, N., Kermen, F., Garcia, S., Sacquet, J., Didier, A., 2010. Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *FASEB Journal* 24, 2355–2363.
- Valle-Leija, P., Blanco-Hernandez, E., Drucker-Colin, R., Gutierrez-Ospina, G., Vidal-tamayo, R., 2012. Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: a constructivist expression of neural plasticity. *PLoS One* 7, e35358.
- Wang, H.W., Wysocki, C.J., Gold, G.H., 1993. Induction of olfactory receptor sensitivity in mice. *Science* 260, 998–1000.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anatomical Record* 231, 482–497.
- Whitman, M.C., Greer, C.A., 2007. Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Developmental Neurobiology* 67, 1079–1093.
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J., Kuhn, H.G., 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* 16, 1681–1689.
- Winner, B., Geyer, M., Couillard-Despres, S., Aigner, R., Bogdahn, U., Aigner, L., Kuhn, G., Winkler, J., 2005. Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Experimental Neurology* 197, 113–121.
- Xu, F., Liu, N., Kida, I., Rothman, D.L., Hyder, F., Shepherd, G.M., 2003. Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11029–11034.
- Youngentob, S.L., Kent, P.F., 1995. Enhancement of odorant-induced mucosal activity patterns in rats trained on an odorant identification task. *Brain Research* 670, 82–88.

Supplementary Figure 1



Schematic diagram that illustrates the localization of the OB-AVL zone in the rat. 3D reconstruction of a whole glomerular layer from rat olfactory bulb (shown in blue); accessory olfactory bulb (shown in green), and cortex (shown in white in the left) AVL zone is depicted in yellow. Left reconstruction illustrates both A-P and D-V axis; right reconstruction illustrates M-L axis. A: anterior, P: posterior; D: dorsal, V: ventral; M: medial, L: lateral.

Supplementary Figure 2



A). Diagram that illustrates the acrylic custom-made box used to conduct the olfactory training and operant conditioning. The box has a main lateral corridor (MC) and four parallel arms that approximate MC in perpendicular fashion (1-4). The four arms are separated from MC by up/down sliding-gates (arrow). The apparatus also has a removable cover that supports an air purifying system (not shown) that continuously injects and extracts air in opposite sides of the main corridor (dotted arrow indicate air current flow). The tubes containing or not the odorant were placed on the right face of each divisional wall between the arms (e.g., eppendorf tube in arm 4). The dishes containing or not water were affixed at the end each arm (e.g., black

petri dish in arm 4); B) 3D graphs that illustrate the performance of both PH (gray circle) and OC (black square) rats, in both latency for resolving the task (Y axis) and errors they made (Z axis), from the beginning of training until the date of sacrifice at 30 (a) or 90 days (b) after the last injection of BrdU (time of injection showed as a gray bar in the X axis). Once trained, OC rats consistently solved the imposed task faster and with fewer errors than PH rats. N=20 for each group.

Preparación de Reactivos

Soluciones Stock

Observación: Verificar los pesos moleculares de cada compuesto anotado en el frasco del reactivo.

1) Fosfato de Sodio Monobásico (NaH_2PO_4) 0.2M

PM = 120

Preparación: Pesar 48g y disolverlos en agua desionizada Aforar a 2L

2) Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4) 0.2M

PM = 142

Preparación: Pesar 56.8g y disolverlos en agua desionizada Aforar a 2L

3) Buffer de Fosfatos (PB) 0.2M pH 7.4

Preparación: Tomar un volumen de 190 mL de la solución stock de NaH_2PO_4 0.2M Tomar un volumen de 810 mL de la solución stock de Na_2HPO_4 0.2M. Mezclar y ajustar el pH a un valor de 7.4 con HCl

4) Paraformaldehído (PFA) al 8% en PB 0.2M pH 7.4

Preparación: Tomar un volumen de 1000 mL de buffer de fosfatos (PB) 0.2M precalentado y adicionar lentamente 80g de paraformaldehído.

Disolver el reactivo a una temperatura entre 70-80°C en agitación en el interior de la campana de extracción. La disolución deberá quedar transparente. Filtrar usando papel Whatman 1. Aforar a 1L con agua desionizada. Almacenar a 4°C

5) Citrato de Sodio / Cloruro de Sodio (SSC) 20X

Preparación: Pesar 87.5g de NaCl (PM= 58.44) y disolverlos en 400mL de agua desionizada. Posteriormente agregar 44g de Citrato de Sodio dihidratado (PM= 294.11). Ajustar el pH a un valor de 7.0 con HCl. Aforar a 500mL

Soluciones de Trabajo

1) Solución Salina (NaCl 0.15M (0.9%))

PM = 58.44

Preparación: Pesar 17.53g y disolverlos en agua desionizada Aforar a 2L

2) Buffer de Fosfatos (PB) 0.1M pH 7.4

Preparación: Tomar un volumen de 95 mL de la solución stock de NaH_2PO_4 0.2M Tomar un volumen de 405 mL de la solución stock de Na_2HPO_4 0.2M. Mezclar y ajustar el pH a un valor de 7.4 con HCl. Aforar a 1L

3) PBT (PB 0.1M + 0.3% Triton)

Preparación: Tomar un volumen de 100 mL de PB 0.1M pH7.4 y adicionar 0.3 mL de Triton X-100

4) PBS

Preparación: Tomar un volumen de 100mL de PB 0.1M pH7.4 y adicionar 0.877g de NaCl

5) PBS + 0.3% Triton + 3% Albúmina

Preparación: Tomar un volumen de 100 mL de PBS y adicionar 0.3mL de Triton X-100 y 3g de Albúmina

6) Sacarosa al 30% en PB 0.1M, pH 7.4

Preparación: Tomar un volumen de 100 mL de PB 0.1M pH 7.4 y adicionar 30 g de sacarosa.

7) Paraformaldehído al 4% en PB 0.1M pH 7.4

Preparación: Tomar un volumen de 100 mL de la solución de paraformaldehido al 8% en PB 0.2M pH 7.4 y adicionar 100mL de agua desionizada. Almacenar a 4°C

8) Solución de paraformaldehido al 4% + glutaraldehído al 0.125% en PB 0.1M pH 7.4

Preparación: Tomar un volumen de 100 mL de la disolución de paraformaldehido al 4% en PB 0.1M pH 7.4 y adicionar 0.125g de glutaraldehido. Almacenar a 4°C. Esta disolución se usa en ratas infantiles.

9) Buffer de Bloqueo

Preparación: Existen tres soluciones:

a) Tomar un volumen de 100 mL de PBT y adicionar 5 g de Albúmina. Almacenar a 4°C. Esta solución se usa en ratas infantiles.

b) Tomar un volumen de 90 mL de PB 0.1M pH 7.4 y adicionar 3 g de Albúmina en agitación lenta. Una vez disuelta la albúmina, filtrar la solución con papel Whatman 1. Adicionar 0.025g de Azida de Sodio y 0.1mL de Triton X-100. Aforar a 100mL. Almacenar a 4°C

c) Tomar un volumen de 97mL de PBT y adicionar 3mL de suero animal inactivado (caballo, cabra, conejo, etc.). Almacenar a 4°C

10) Citrato de Sodio / Cloruro de Sodio (SSC) 2X

Preparación: Tomar un volumen de 10mL de SSC 20X y adicionar 90mL de agua desionizada.

11) Gelatina para portaobjetos

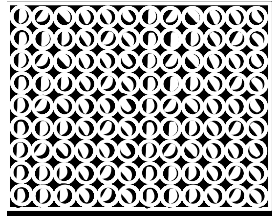
Preparación:

H ₂ O destilada	800mL
Gelatina Knox	4g
Sulfato de cromo y potasio (CrK(SO ₄) ₂ •12H ₂ O)	0.4g
PM = 499.4	

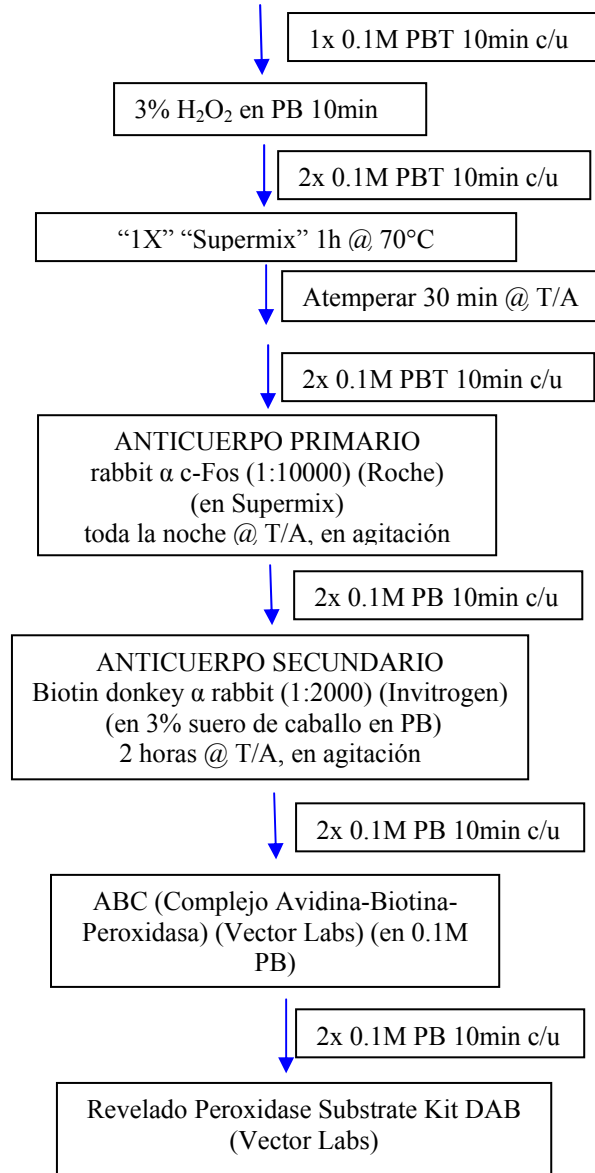
Calentar y disolver la gelatina, filtrarla con papel Whatman No. 1

- Poner las laminillas en etanol para desengrasar
- Bañar las laminillas con grenetina
- Dejar secar a temperatura ambiente o en horno a temperatura baja.
- Volver a bañar las laminillas con grenetina.
- Repetir este paso dos veces mas
- Guardar las laminillas en las cajas y marcar cuantos baños recibieron con grenetina.
- Guardar la grenetina sobrante en el refrigerador y usarla una vez más

Inmunoperoxidasa para c-Fos



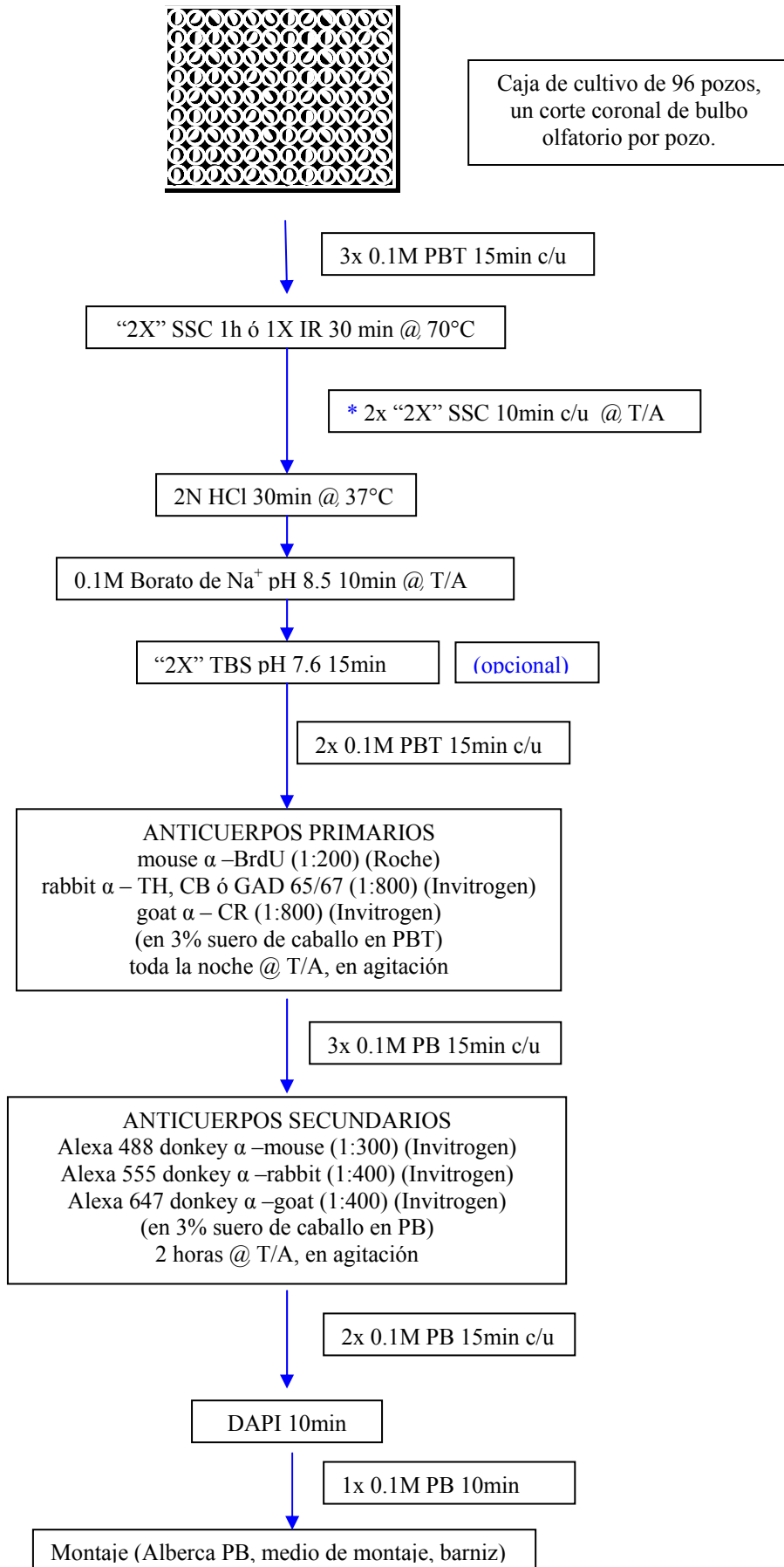
Caja de cultivo de 96 pozos,
un corte por pozo.



Supermix

0.05M TBS pH 7.6	100mL
0.25% Gelatina	
0.5% Triton X-100	
0.025% Azida de Sodio	

Inmunofluorescencia para BrdU / TH, CB ó GAD 65/67 / CR



*Para el caso del Inmunoretriever (IR), los cortes se dejan enfriar a T/A durante 15-20 min.

Checklist para sesiones de condicionamiento olfativo

- Bebedero con H₂O potable
- 3 tubos con 0.1% hexanal en aceite mineral
- Barra Multicontacto
- Purificador de Aire
- Ventilador de base
- Ventilador de clip
- Ventilador de puerta de la caja de condicionamiento
- Lámpara con luz roja
- Cajas Petri negras
- Timer
- Pipeta de transferencia graduada a 1mL
- Pisseta de H₂O
- Vaso de precipitados (2)
- Libreta
- Pluma
- Guantes
- Masking Tape
- Sanitas

Checklist para perfusión

- Bomba
- Pentobarbital
- Agujas de perfusión (Pedro Medina's style)
- Navajas de 1 filo
- Viales
- Propipeta
- Pipeta
- Bolsa para cadáveres
- Tijeras curvas de un filo
- Gubias
- Palita de metal
- Pinzas de clampeo (3)
- Pinzas de sujeción (3)
- Tijeras de microdissección
- Pluma
- Balanza
- Masking Tape
- Sanitas
- Rejillas

Tabla de Números Aleatorios

10	09	73	25	33	76	52	01	35	86	34	67	35	48	76	80	95	90	91	17	39	29	27	49	45
37	54	20	48	05	64	89	47	42	96	24	80	52	40	37	20	63	61	04	02	00	82	29	16	65
08	42	26	89	53	19	64	50	93	03	23	20	90	25	60	15	95	33	47	64	35	08	03	36	06
99	01	90	25	29	09	37	67	07	15	38	31	13	11	65	88	67	67	43	97	04	43	62	76	59
12	80	79	99	70	80	15	73	61	47	64	03	23	66	53	98	95	11	68	77	12	17	17	68	33
66	06	57	47	17	34	07	27	68	50	36	69	73	61	70	65	81	33	98	85	11	19	92	91	70
31	06	01	08	05	45	57	18	24	06	35	30	34	26	14	86	79	90	74	39	23	40	30	97	32
85	26	97	76	02	02	05	16	56	92	68	66	57	48	18	73	05	38	52	47	18	62	38	85	79
63	57	33	21	35	05	32	54	70	48	90	55	35	75	48	28	46	82	87	09	83	49	12	56	24
73	79	64	57	53	03	52	96	47	78	35	80	83	42	82	60	93	52	03	44	35	27	38	84	35
98	52	01	77	67	14	90	56	86	07	22	10	94	05	58	60	97	09	34	33	50	50	07	39	98
11	80	50	54	31	39	80	82	77	32	50	72	56	82	48	29	40	52	42	01	52	77	56	78	51
83	45	29	96	34	06	28	89	80	83	13	74	67	00	78	18	47	54	06	10	68	71	17	78	17
88	68	54	02	00	86	50	75	84	01	36	76	66	79	51	90	36	47	64	93	29	60	91	10	62
99	59	46	73	48	87	51	76	49	69	91	82	60	89	28	93	78	56	13	68	23	47	83	41	13
65	48	11	76	74	17	46	85	09	50	58	04	77	69	74	73	03	95	71	86	40	21	81	65	44
90	12	43	56	35	17	72	70	80	15	45	31	82	23	74	21	11	57	82	53	14	38	55	37	63
74	35	09	98	17	77	40	27	72	14	43	23	60	02	10	45	52	16	42	37	96	28	60	26	55
69	91	62	68	03	66	25	22	91	48	36	93	68	72	03	76	62	11	39	90	94	40	05	64	18
09	89	32	05	05	14	22	56	85	14	46	42	75	67	88	96	29	77	88	22	54	38	21	45	98
91	49	91	45	23	68	47	92	76	86	46	16	28	35	54	94	75	08	99	23	37	08	92	00	48
80	33	69	45	98	26	94	03	68	58	70	29	73	41	35	53	14	03	33	40	42	05	08	23	41
44	10	48	19	49	85	15	74	79	54	32	97	92	65	75	57	60	04	08	81	22	22	20	64	13
12	55	07	37	42	11	10	00	20	40	12	86	07	46	97	96	64	48	94	39	28	70	72	58	15
63	60	64	93	29	16	50	53	44	84	40	21	95	25	63	43	65	17	70	82	07	20	73	17	90
61	19	69	04	46	26	45	74	77	74	51	92	43	37	29	65	39	45	95	93	42	58	26	05	27
15	47	44	52	66	95	27	07	99	53	59	36	78	38	48	82	39	61	01	18	33	21	15	94	66
94	55	72	85	73	67	89	75	43	87	54	62	24	44	31	91	19	04	25	92	92	92	74	59	73
42	48	11	62	13	97	34	40	87	21	16	86	84	87	67	03	07	11	20	29	25	70	14	66	70
23	52	37	83	17	73	20	88	98	37	68	93	59	14	16	26	25	22	96	63	05	52	28	25	62
04	49	35	24	94	75	24	63	38	24	45	86	25	10	25	61	96	27	93	35	65	33	71	24	72
00	54	99	76	54	64	05	18	81	59	96	11	96	38	96	54	69	28	23	91	23	28	72	95	29
35	96	31	53	07	26	89	80	93	54	33	35	13	54	62	77	97	45	00	24	90	10	33	93	33
59	80	80	83	91	45	42	72	68	42	83	60	94	97	00	13	02	12	48	92	78	56	52	01	06
46	05	88	52	36	01	39	09	22	86	77	28	14	40	77	93	91	08	36	47	70	61	74	29	41
32	17	90	05	97	87	37	92	52	41	05	56	70	70	07	86	74	31	71	57	85	39	41	18	38
69	23	46	14	06	20	11	74	52	04	15	95	66	00	00	18	74	39	24	23	97	11	89	63	38
19	56	54	14	30	01	75	87	53	79	40	41	92	15	85	66	67	43	68	06	84	96	28	52	07
45	15	51	49	38	19	47	60	72	46	43	66	79	45	43	59	04	79	00	33	20	82	66	95	41
94	86	43	19	94	36	16	81	08	51	34	88	88	15	53	01	54	03	54	56	05	01	45	11	76
98	08	62	48	26	45	24	02	84	04	44	99	90	88	96	39	09	47	34	07	35	44	13	18	80
33	18	51	62	32	41	94	15	09	49	89	43	54	85	81	88	69	54	19	94	37	54	87	30	43
80	95	10	04	06	96	38	27	07	74	20	15	12	33	87	25	01	62	52	98	94	62	46	11	71
79	75	24	91	40	71	96	12	82	96	69	86	10	25	91	74	85	22	05	39	00	38	75	95	79
18	63	33	25	37	98	14	50	65	71	31	01	02	46	74	05	45	56	14	27	77	93	89	19	36
74	02	94	39	02	77	55	73	22	70	97	79	01	71	19	52	52	75	80	21	80	81	45	17	48
54	17	84	56	11	80	99	33	71	43	05	33	51	29	69	56	12	71	92	55	36	04	09	03	24
11	66	44	98	83	52	07	98	48	27	59	38	17	15	39	09	97	33	34	40	88	46	12	33	56
48	32	47	79	28	31	24	96	47	10	02	29	53	68	70	32	30	75	75	46	15	02	00	99	94
69	07	49	41	38	87	63	79	19	76	35	58	40	44	01	10	51	82	16	15	01	84	87	69	38