



Brocardo, Lucila

Redes de glía envolvente olfatoria : desarrollo posnatal, mediadores moleculares y modulación de su abundancia por el input sensorial



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Brocardo, L. (2022). *Redes de glía envolvente olfatoria: desarrollo posnatal, mediadores moleculares y modulación de su abundancia por el input sensorial. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3675>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Redes de glía envolvente olfatoria: desarrollo posnatal, mediadores moleculares y modulación de su abundancia por el *input* sensorial

TESIS DOCTORAL

Lucila Brocardo

lucilabrocardo@gmail.com

Resumen

Durante las últimas décadas se ha acumulado evidencia que indica que las células gliales son centrales en la modulación de las funciones de los circuitos neuronales. Las células gliales se conectan formando redes dinámicas mediadas por *gap junctions*, constituidas por las conexinas (Cx), y pueden ser moduladas por diversos factores, entre ellos la actividad neuronal y el estadio de desarrollo.

Las neuronas sensoriales olfatorias del sistema olfatorio principal de ratones, proyectan un axón desde la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio en el sistema nervioso central. La topografía de estas proyecciones establece un mapa sensorial que se refina durante el desarrollo posnatal, proceso dependiente de la experiencia sensorial. Tanto los astrocitos del bulbo como la glía envolvente que acompaña a los axones sensoriales, establecen redes conectadas por *gap junctions* que tienen a la conexina 43 (Cx43) como constituyente central, al menos desde la etapa juvenil. El objetivo general de esta tesis fue evaluar si las redes gliales del bulbo olfatorio se refinan durante el desarrollo posnatal de manera dependiente de la experiencia sensorial.

En primer lugar, se realizó una **caracterización de la estructura de las redes de glía envolvente durante el desarrollo posnatal**. Se obtuvo evidencia de su existencia desde P0 y de una reducción en su tamaño durante las primeras semanas del desarrollo posnatal del bulbo. El comportamiento electrofisiológico de la glía envolvente durante este período no mostró una relación entre la magnitud de las corrientes de membrana y el achicamiento de las redes gliales. Al **describir los patrones de expresión de Cx en la glía envolvente**, hallamos evidencia de que el perfil de Cx madura con la edad, aumentando gradualmente la expresión de Cx43 durante las primeras dos semanas. Realizamos el primer reporte de

que la glía envolvente expresa Cx47, típica de oligodendrocitos, durante la primera semana posnatal.

Por otra parte, **evaluamos si la Cx43 media las redes de glía envolvente olfatoria desde temprano en el desarrollo posnatal**, utilizando ratones genéticamente modificados para reducir la expresión de Cx43 en esta glía. La reducción de la expresión fue eficiente y selectiva. En estos animales, la glía envolvente mostró menor conductancia de membrana y una conectividad glial reducida.

Por último, **evaluamos si la expresión de Cx43 de la glía olfatoria es sensible a la privación sensorial olfatoria durante el desarrollo posnatal**. En un modelo de privación sensorial la Cx43 de la glía envolvente y astrocitos del bulbo se encontró reducida en abundancia durante la primera semana del desarrollo posnatal. Adicionalmente, se observaron alteraciones estructurales en los astrocitos del bulbo.

Los resultados de esta tesis establecen las bases para identificar el rol de las redes de glía envolvente olfatoria y sus conexinas mediadoras en el desarrollo posnatal del bulbo olfatorio. El trabajo futuro permitirá evaluar directamente si el establecimiento del mapa olfatorio incluye mecanismos sensibles a la experiencia mediados por la glía.

Redes de glía envolvente olfatoria:
desarrollo posnatal, mediadores
moleculares y modulación de su
abundancia por el *input* sensorial

Autora: Lic. Lucila Brocardo

Directora: Dra. Lorena Rela

Grupo de Neurociencia de Sistemas, Instituto de Fisiología y Biofísica
Bernardo Houssay (IFIBIO-Houssay), Universidad de Buenos Aires y
CONICET

**Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencia y Tecnología
de la Universidad Nacional de Quilmes**

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	7
1.1.	Estructura y organización anatómico-funcional del sistema olfatorio.....	8
1.1.1.	Órganos sensoriales del sistema olfatorio	8
1.1.2.	El epitelio olfatorio y la detección de los odorantes por las neuronas sensoriales	10
1.1.3.	Estructura y organización funcional del bulbo olfatorio.....	13
1.1.4.	La glía envolvente olfatoria.....	17
1.2.	Formación del mapa sensorial del bulbo olfatorio	20
1.2.1.	Maduración del bulbo olfatorio.....	20
1.2.2.	Deprivación sensorial olfativa durante el desarrollo posnatal	24
1.3.	La conectividad entre las células gliales	27
1.3.1.	Conexinas y redes gliales.....	27
1.3.2.	Rol modulador de las redes gliales sobre la función neuronal.....	33
1.3.3.	Efectos de la actividad neuronal sobre las redes gliales	37
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
III.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	41
2.1.	Animales.....	42
2.1.1.	Ratones C57BL/6	42
2.1.2.	Ratones S100B-GFP	42
2.1.3.	Ratones PLP-CreERT	43
2.1.4.	Ratones Cx43 ^{flox}	44
2.1.5.	Ratones LSL-tdTomato	45
2.2.	Genotipificación.....	45
2.3.	Tratamientos.....	47
2.3.1.	Tamoxifeno.....	47
2.3.2.	Metimazol.....	48
2.3.3.	Deprivación sensorial olfatoria neonatal.....	48
2.4.	Fijación por perfusión intracardiaca	48
2.5.	Electrofisiología	49
2.5.1.	Obtención de rodajas agudas de bulbo olfatorio para registros electrofisiológicos:	49
2.5.2.	Registros electrofisiológicos	50
2.5.3.	Análisis de registros electrofisiológicos:	52

2.6.	Inmunofluorescencia	53
2.7.	Análisis de imágenes.....	56
2.7.1.	Análisis de la inmunorreactividad contra VGlut2:.....	56
2.7.2.	Análisis de la inmunorreactividad contra conexinas con método manual: 56	
2.7.3.	Análisis de la inmunorreactividad contra conexinas con método automático:.....	57
2.7.4.	Análisis de marcadores de células de la glía envolvente	57
2.7.5.	Análisis de la co-localización de la inmunomarca de conexinas con marcadores de la glía envolvente.....	58
2.7.6.	Cuantificación del tamaño glomerular	59
2.7.7.	Análisis de la inmunoreactividad contra TH en el bulbo olfatorio	59
2.7.8.	Análisis de plasticidad estructural de glía en animales con privación sensorial 59	
2.7.9.	Cuantificación del tamaño de redes gliales:	60
2.8.	Ensayos conductuales	62
2.8.1.	Registro de vocalizaciones ultrasónicas	62
2.8.2.	Análisis de vocalizaciones ultrasónicas.....	64
2.9.	Análisis estadístico	66
IV.	RESULTADOS.....	68
3.1.	Capítulo 1: Propiedades electrofisiológicas y expresión de conexinas en las células de glía envolvente durante el desarrollo posnatal como indicadores de conectividad glial	69
3.1.1.	S100B como marcador para distinguir las capas externas del bulbo olfatorio de ratones de edades posnatales tempranas	69
3.1.2.	La glía envolvente olfatoria forma redes desde temprano en el desarrollo posnatal73	
3.1.3.	Expresión de Cx43 y Cx47 en la capa de fibras olfatorias durante el desarrollo posnatal	78
3.1.4.	Conclusiones del Capítulo 1	84
3.2.	Capítulo 2: Rol de la Cx43 en la formación de redes de glía envolvente olfatoria a edades tempranas del desarrollo posnatal	85
3.2.1.	La línea de ratones PLP-CreERT permite manipular a la glía envolvente olfatoria 85	
3.2.2.	Deleción condicional de Cx43 en la glía envolvente olfatoria de neonatos.....	90

3.2.3.	La Cx43 es una molécula central en la formación de redes de glía envolvente olfatoria a edades tempranas del desarrollo posnatal	92
3.2.4.	La delección de la Cx43 de la glía envolvente de animales neonatos se asocia con parámetros electrofisiológicos de desconexión de <i>gap junctions</i>	98
3.2.5.	Evaluación de la capacidad olfativa de ratones de edad neonatal....	102
3.2.6.	Conclusiones del Capítulo 2.....	107
3.3.	Capítulo 3: La Cx43 es un marcador temprano de la deprivación sensorial durante el desarrollo posnatal	109
3.3.1.	La expresión de tirosina hidroxilasa en la capa glomerular se reduce a partir de la tercera semana de deprivación sensorial.....	109
3.3.2.	Impacto de la deprivación sensorial en la glía envolvente olfatoria durante el desarrollo posnatal.....	112
3.3.3.	La población de astrocitos periglomerulares se ve afectada por la deprivación sensorial en las primeras dos semanas del desarrollo posnatal.....	119
3.3.4.	Conclusiones del Capítulo 3.....	124
V.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	125
VI.	BIBLIOGRAFÍA	141
VII.	ABREVIATURAS.....	158
VIII.	ANEXO.....	160

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del sistema nervioso implica una interacción coordinada entre neuronas y redes de células gliales. En el caso del sistema olfatorio, el bulbo olfatorio sufre, durante la edad posnatal temprana, un proceso denominado refinamiento del mapa sensorial olfatorio ¹.

La glía envolvente olfatoria, presente en el nervio olfatorio desde edad embrionaria, es de particular interés dado que expresa moléculas guía ² que podrían participar en la integración de neuronas sensoriales al circuito del bulbo olfatorio y en el refinamiento del mapa sensorial. Esta glía forma redes mediadas por *gap junctions* ³⁻⁵, que permiten el pasaje de moléculas pequeñas y que en otros tipos de glía se han asociado con el control del estado funcional de las sinapsis que se forman durante el desarrollo ⁶. Para evaluar si el refinamiento del mapa sensorial involucra la modulación por redes gliales, es necesario determinar las propiedades de conectividad de la glía envolvente olfatoria, sus mediadores y su modulación durante el desarrollo del sistema olfatorio, especialmente durante el proceso de refinamiento posnatal del mapa sensorial.

1.1. Estructura y organización anatómico-funcional del sistema olfatorio

1.1.1. Órganos sensoriales del sistema olfatorio

Los odorantes del ambiente son detectados por las neuronas sensoriales olfatorias, detectores altamente especializados que se organizan en diferentes estructuras funcionales en la cavidad nasal.

Se distinguen dos sistemas sensoriales principales en la cavidad nasal de los mamíferos: el epitelio olfatorio principal (MOE), cuyas neuronas envían proyecciones al bulbo olfatorio principal (MOB), y el órgano vomeronasal (VNO), cuyas neuronas envían proyecciones al bulbo olfatorio accesorio (AOB) ⁷ ([Figura 1.1](#)). Mientras el MOE permite detectar y discriminar una gran variedad de estímulos químicos, el VNO está mayormente especializado en la identificación de feromonas, moléculas producidas por individuos conespecíficos implicadas en la modulación de

comportamientos como el apareamiento, la lactancia, las señales de peligro y el cortejo ⁸. Si bien la especialización de cada órgano es clara, se han descrito funciones que el MOE y el VNO desarrollan de manera cruzada. Se encontraron feromonas que activan neuronas en el MOE, con implicancias en el comportamiento sexual y social ⁹⁻¹⁴, y algunos odorantes generales (de los que se desconoce que actúen como feromonas) que activan el AOB y modulan comportamientos en ausencia del MOE ¹⁴⁻¹⁶.

Además de los sistemas sensoriales principales, el sistema olfatorio de mamíferos presenta subsistemas que también contienen neuronas sensoriales como el órgano septal de Masera y el ganglio de Grueneberg ([Figura I. 1](#)) ^{7,17}.

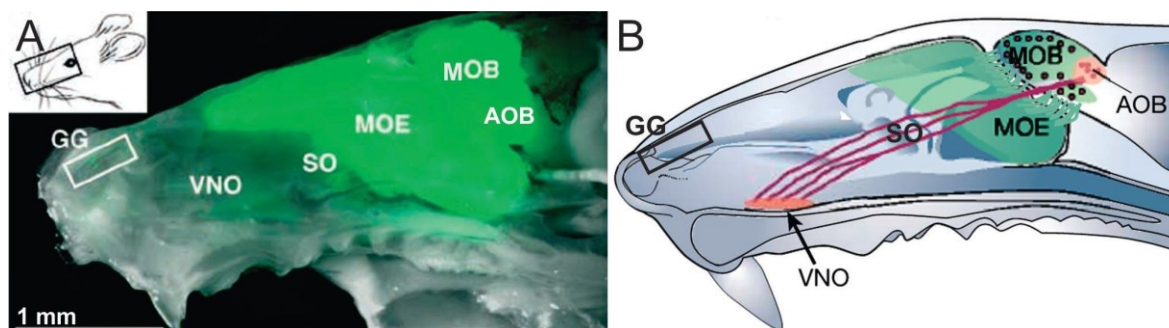


Figura I.1. Anatomía del sistema olfatorio del ratón. **A.** Sección sagital de la cabeza de un ratón que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor del marcador de neuronas sensoriales maduras *olfactory marker protein*, OMP (OMP-GFP). Se observan el ganglio de Grueneberg (GG), el órgano vomeronasal (VNO), el órgano septal (SO), el epitelio olfatorio principal (MOE), el bulbo olfatorio principal (MOB) y el bulbo olfatorio accesorio (AOB). **B.** Representación esquemática de (A). GG, SO y MOE proyectan al MOB, y las neuronas del VNO proyectan al AOB. Tomado de ¹⁸. Adaptado de ^{8,19}.

Las neuronas sensoriales olfatorias ubicadas en el MOE proyectan sus axones a lo largo del nervio olfatorio hasta el bulbo olfatorio ubicado en el sistema nervioso central donde hacen sinapsis con neuronas locales y de proyección. Los axones de las neuronas de proyección del bulbo componen la salida del bulbo olfatorio a lo largo del tracto olfatorio lateral hacia la corteza piriforme en el lóbulo temporal, así como a otras estructuras como la amígdala, la corteza entorrinal y el tubérculo olfatorio ([Figura I.2](#)) ²⁰.

El principal blanco del tracto olfatorio es la corteza piriforme que representa un centro especializado en el procesamiento de la información olfatoria. Las neuronas piramidales de la corteza piriforme proyectan a varios núcleos presentes en el tálamo y el hipotálamo. Algunas neuronas también inervan regiones de la corteza orbitofrontal, que tiene neuronas multimodales capaces de responder a estímulos olfatorios y gustativos ²⁰ ([Figura I.2](#)).

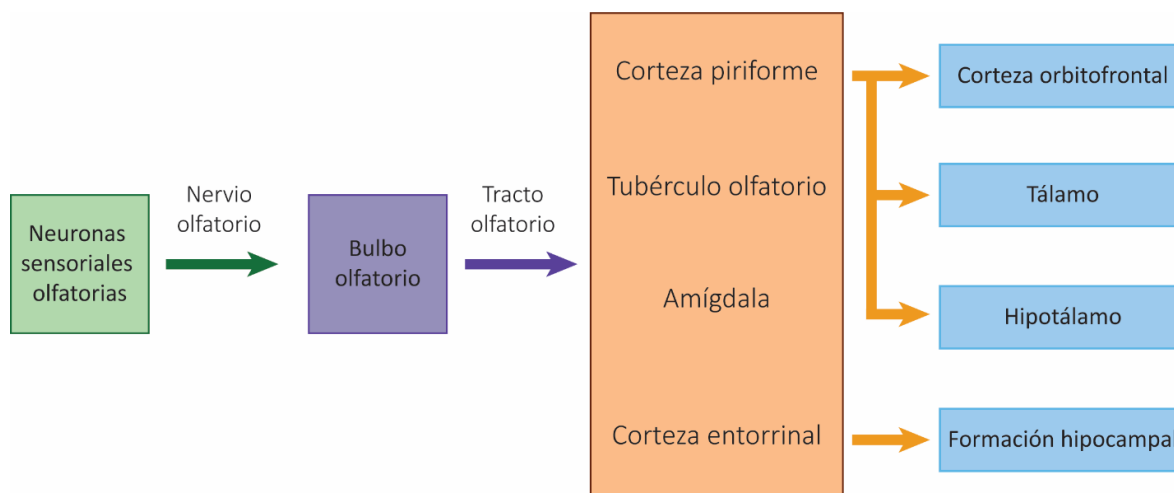


Figura I.2. Organización del sistema olfatorio. Diagrama mostrando las estructuras y vías principales de procesamiento olfatorio. Adaptado de ²⁰.

1.1.2. El epitelio olfatorio y la detección de los odorantes por las neuronas sensoriales

El epitelio olfatorio y la lámina propia subyacente constituyen la mucosa nasal que reviste la cavidad nasal ²¹. El epitelio contiene neuronas sensoriales bipolares de cuyos cuerpos celulares emerge una dendrita que presenta cilias que portan la maquinaria molecular de detección de moléculas odorantes, asociada a la transducción de la señal olfativa ²².

La detección de olores se inicia con la unión de las moléculas de odorante a los receptores olfatorios en la membrana de las neuronas sensoriales ²³. En el ratón, cada neurona sensorial expresa uno de alrededor de 1000 receptores olfatorios de membrana distintos, lo que les confiere selectividad de respuesta ²³. Los receptores olfatorios presentes en el MOE son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) ^{24,25} que, luego de la unión del odorante al receptor, activan una cascada de

señalización que culmina con la apertura de canales iónicos activables por nucleótidos cíclicos ^{26,27} y producen la despolarización de las neuronas sensoriales ²⁸, aunque se han descrito vías no canónicas ^{29,30}.

Aunque existen más de 1000 tipos diferentes de receptores olfatorios, se acepta un modelo en el que la detección del enorme repertorio de olores requiere de una estrategia combinatoria ⁸. Cada receptor olfatorio puede unirse a un grupo de moléculas de odorante relacionadas y cada molécula de odorante puede unirse a un grupo de receptores olfatorios con diferentes afinidades. Se ha reportado que la eliminación de un receptor olfatorio en *Drosophila* no suprime la respuesta comportamental producida por la presentación de un odorante, indicando que existe un solapamiento en la detección de moléculas odorantes ^{31,32}. Adicionalmente, variaciones en la concentración de los odorantes son detectadas por distintos receptores olfatorios ³³. Por último, la representación de un olor radica en la actividad de la población de receptores olfatorios celulares activados por el olor ³⁴.

El epitelio olfatorio tiene una estructura pseudoestratificada, en cuya zona basal se ubican las células *stem*/progenitoras ³⁵. Por su morfología, las células de la capa basal del epitelio se distinguen en células horizontales y células globosas ([Figura I.3](#)). Este conjunto de células confiere al epitelio olfatorio la capacidad de generar neuronas sensoriales nuevas durante toda la vida ³⁵⁻³⁷. Las células horizontales permanecen quiescentes durante la adultez, pero frente a un daño masivo al epitelio proliferan y son el reservorio de las células globosas, dando lugar indirectamente a la recuperación del epitelio ³⁸. Las células globosas son responsables de la generación de nuevas neuronas durante el recambio normal de las neuronas sensoriales ³⁵.

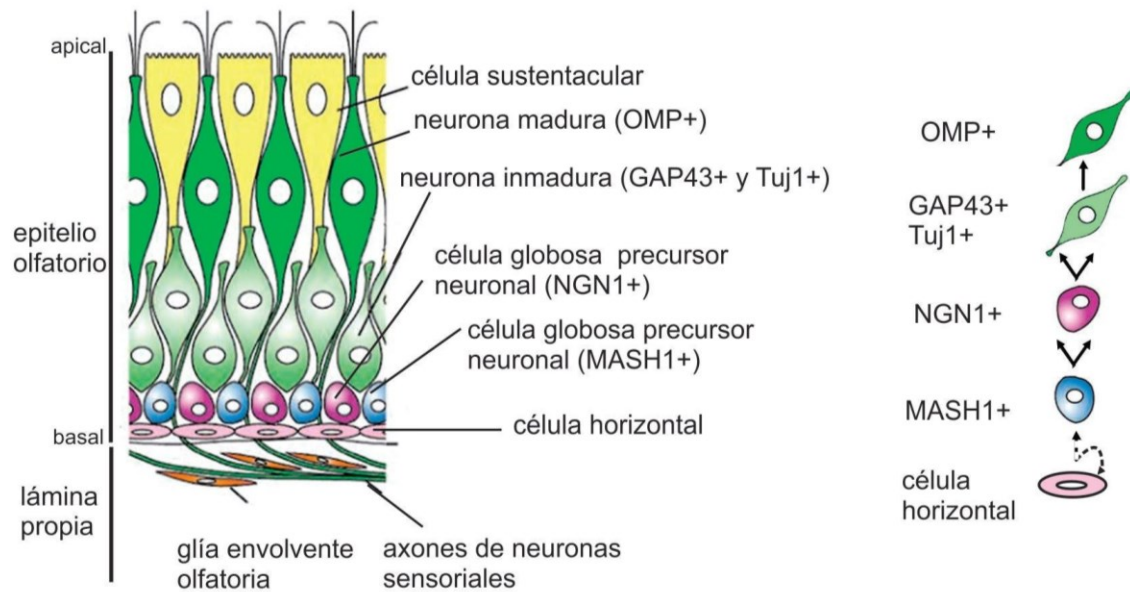


Figura I.3. Esquema del linaje neuronal y de la disposición histológica de las células en el epitelio olfatorio adulto. (Izquierda) Ubicación de los tipos celulares en el epitelio olfatorio y la lámina propia. **(Derecha)** Tipos celulares que se identifican en el linaje neuronal del proceso de diferenciación del epitelio olfatorio. Durante el recambio normal del epitelio, las células globosas, positivas para los marcadores MASH1 y/o NGN1, proliferan. Aquellas que tienen un destino neuronal (NGN1+) dan lugar a las neuronas sensoriales inmaduras (GAP43+ y Tuj1+), que luego maduran (OMP+). En la zona basal del epitelio, las células horizontales se mantienen mayormente quiescentes. La línea punteada indica que estas células son capaces de proliferar luego del daño a las neuronas sensoriales. Adaptado de ³⁹. Tomado de ¹⁸.

La zona basal del epitelio se continúa en sentido apical con una capa intermedia, constituida por las neuronas sensoriales en distintos estadios de maduración. Las neuronas sensoriales inmaduras, comúnmente identificadas por la expresión de *growth-associated protein 43* (GAP43) y Tuj1, tienen una ubicación más basal en la capa intermedia del epitelio ^{38,39}. Hacia la región apical, se encuentran las neuronas sensoriales maduras, frecuentemente identificadas por la expresión de *olfactory marker protein* (OMP) ^{36,40}. Finalmente, en la zona más apical del epitelio se ubican las células sustentaculares o de soporte.

La maduración de las neuronas sensoriales olfatorias involucra el crecimiento de un axón, que se extiende desde el epitelio olfatorio en la periferia hasta el sistema nervioso central, donde forma sinapsis en el bulbo olfatorio ⁴¹. Tanto a nivel de la lámina propia adyacente al nicho neurogénico del epitelio, como en su recorrido

hacia el bulbo olfatorio, los axones de las neuronas sensoriales están acompañados por un tipo de glía especializada, la glía envolvente olfatoria ^{42,43} (Figuras [1.3](#) e [1.4](#)). A diferencia de lo observado en otros nervios periféricos, la transición del sistema periférico al central no se distingue por un cambio dramático en el tipo de glía asociada a las neuronas (células de Schwann, versus oligodendrocitos o astrocitos, respectivamente) ^{44,45}. Esta característica sugiere que la glía envolvente olfatoria aporta la permisividad para la eficiente invasión al sistema nervioso central de los axones sensoriales durante el recambio de las neuronas sensoriales ^{46,47}.

1.1.3. Estructura y organización funcional del bulbo olfatorio

La información de las neuronas sensoriales activadas por un odorante es transmitida al bulbo olfatorio. El bulbo olfatorio tiene una estructura laminar, con tipos celulares específicos de cada capa ⁴⁸ ([Figura 1.4](#)).

La capa de las fibras olfatorias contiene los tramos terminales de los axones de las neuronas sensoriales, que llegan al bulbo e inervan blancos específicos en la capa glomerular ([Figura 1.4](#)). En estrecha relación con estos axones, se ubican las células de la glía envolvente olfatoria ⁴³. Esta glía especializada constituye la mayoría de los cuerpos celulares presentes en esta capa ⁴², mientras que en baja proporción se observan astrocitos ^{42,49} y microglía ^{50,51}.

La capa glomerular contiene los glomérulos, neuropilos aproximadamente esféricos de 50 μm de diámetro promedio en el adulto, donde convergen los axones de las neuronas sensoriales olfatorias, las dendritas de las neuronas proyección (células mitrales y *tufted*), neuritas de interneuronas, y proyecciones de células gliales, principalmente astrocitos, cuyos cuerpos celulares se encuentran rodeando el neuropilo ⁵².

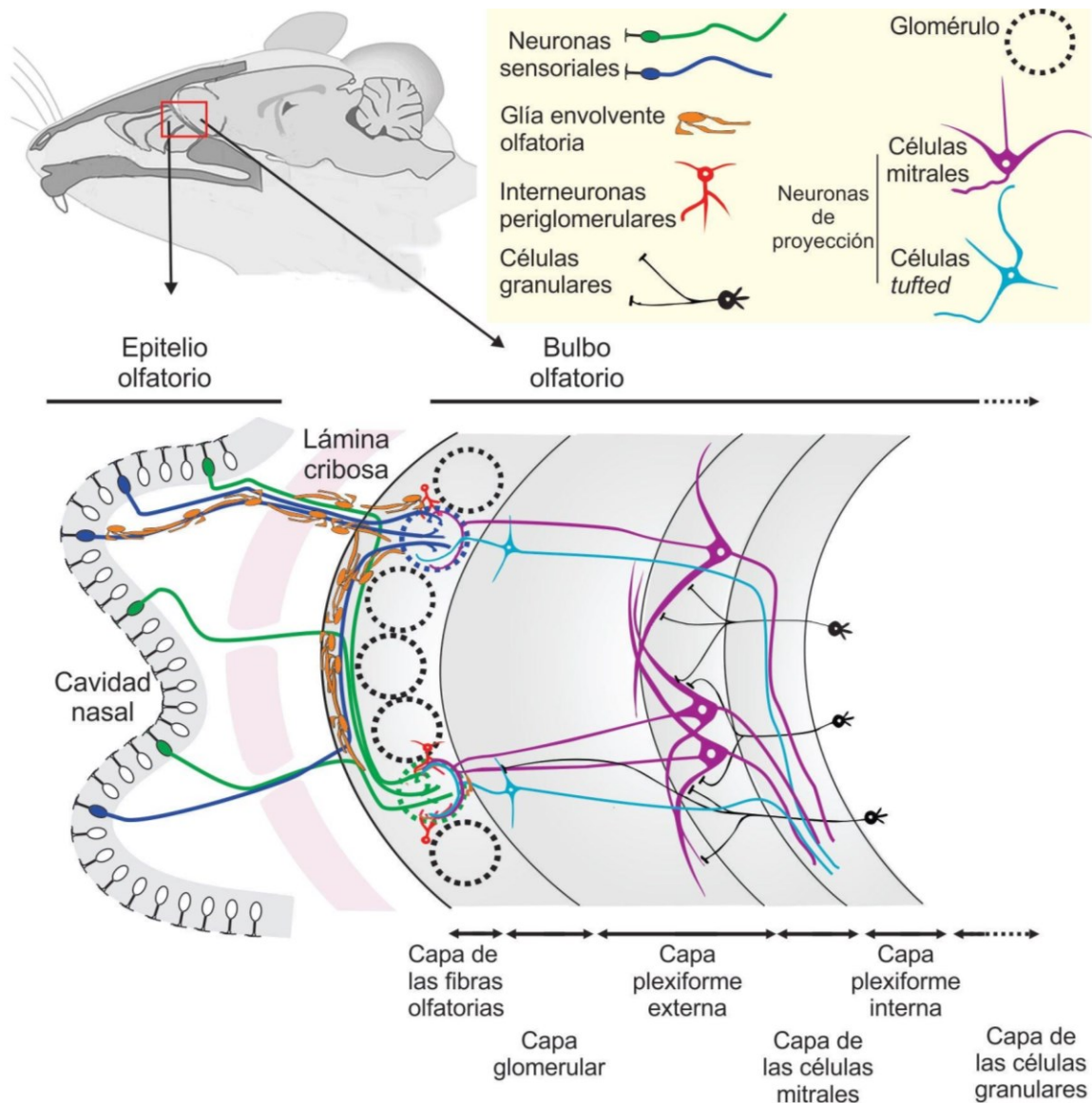


Figura I.4. Esquema de la estructura laminar y la composición celular del bulbo olfatorio. Tipos celulares principales y contactos sinápticos que identifican cada capa. Las neuronas sensoriales que expresan un mismo receptor, representado por el color, realizan sinapsis en un neuropilo específico. Adaptado de ⁵³. Tomado de ¹⁸.

Siguiendo el principio de proyección “zona a zona” ⁵⁴, la topografía espacial del epitelio nasal es preservada en la capa glomerular. Las paredes laterales de la cavidad nasal forman turbinas que se encuentran cubiertas por epitelio olfatorio ^{55,56} (Figura I.5 A y B). La distribución de las neuronas que expresan receptores olfatorios con diferente selectividad tiene una organización topográfica en el epitelio olfatorio ^{57,58}. Los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales que expresan un

mismo receptor olfatorio, a pesar de no estar ubicadas adyacentes unas a otras, se restringen a una región relativamente acotada del epitelio ([Figura I.5 B](#)); Estas neuronas extienden sus axones a lo largo del nervio y convergen en uno o dos glomérulos por bulbo, de localización conservada, según el receptor olfatorio expresado, otorgando inervación homogénea a cada glomérulo ([Figura I.4](#))⁵⁸⁻⁶⁰. Así la señal de los odorantes recibida en el epitelio olfatorio es convertida en un mapa topográfico de inervación glomerular en el bulbo denominado “mapa sensorial”⁶¹⁻⁶³ ([Figura I.5 C](#)).

Las neuronas sensoriales hacen sinapsis con interneuronas, y neuronas de proyección, entre las que se encuentran las células mitrales, cuyos cuerpos celulares no están presentes en la capa glomerular. Sus dendritas apicales proyectan y se asocian a un glomérulo particular^{64,65} ([Figura I.4](#)). La convergencia de las neuronas sensoriales y la asociación de las neuronas de proyección con glomérulos únicos, reflejan que cada glomérulo es una unidad anatómica y funcional.

Las interneuronas periglomerulares (ubicadas rodeando los glomérulos) modulan el *input* sináptico y la actividad de las neuronas de proyección, y no necesariamente se encuentran asociadas a un mismo glomérulo⁶⁶. Estas se clasifican según los neurotransmisores que liberan (GABA o dopamina) y la expresión de proteínas de unión a calcio, particularmente calbindina, calretinina y parvalbúmina⁶⁷. Uno de los subtipos que expresa marcadores GABAérgicos (isoformas de la enzima limitante de la síntesis de GABA, ácido glutámico decarboxilasa, GAD65 y GAD67) y dopaminérgicos (la enzima limitante en la síntesis de dopamina, la tirosina hidroxilasa, TH), es de particular interés por ser sensible al *input* sensorial y a la denervación. Esto se pone de manifiesto mediante una reducción de su número y de la expresión de TH en condiciones de deprivación sensorial y denervación del bulbo olfatorio⁶⁸⁻⁷⁰.

La capa plexiforme externa está ocupada por las sinapsis dendro-dendríticas de las neuronas de proyección y de las interneuronas granulares ([Figura I.4](#)). En esta capa se ubican, además, algunas neuronas de proyección *tufted* e

interneuronas gabaérgicas, principalmente positivas para calrenina, TH o parvalbúmina ^{62,71,72}.

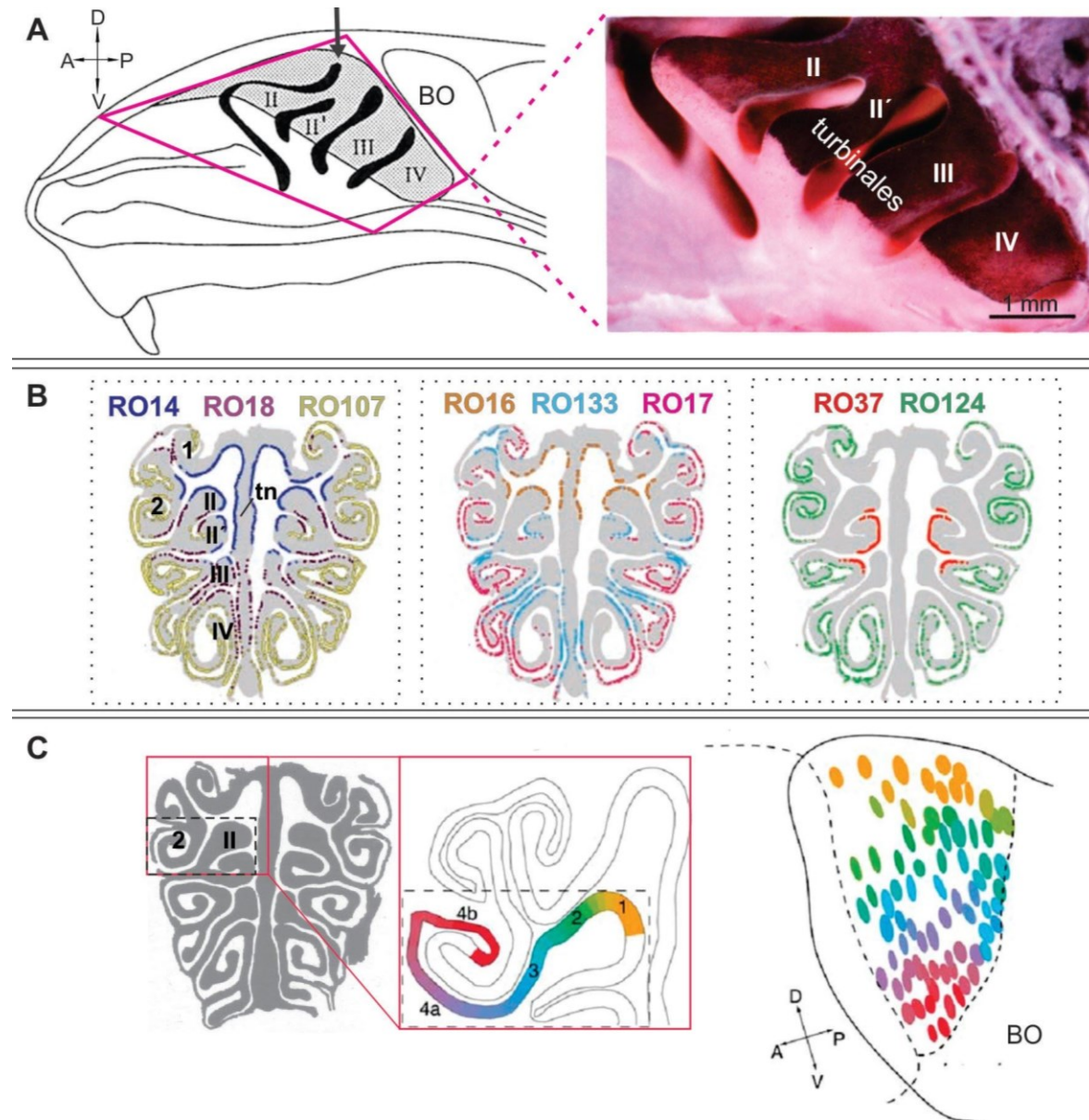


Figura I.5. Organización topográfica del mapa sensorial olfatorio. A. Izquierda: esquema de la cavidad nasal y del sistema de turbinales de un ratón adulto, en vista lateral. Se indican los endoturbinales (II, II', III y IV) y se representa el epitelio sensorial olfatorio en gris. BO: bulbo olfatorio. La flecha indica la coordenada anteroposterior de las secciones representadas en B. Derecha: vista medial de la cavidad nasal, luego de remover el tabique nasal, e hibridación *in situ* con el marcador de neuronas sensoriales olfatorias, OMP. B. Esquemas representando los patrones de expresión para algunos receptores olfatorios en secciones coronales de epitelio olfatorio. Se indican los ectoturbinales (1 y 2), los endoturbinales (II, II', III y IV) y el tabique nasal (tn). RO: receptor olfatorio. C. Correspondencia entre la localización de los somas de neuronas sensoriales en el epitelio y sus proyecciones axonales en el bulbo. Adaptado de ^{58,62,73}. Tomado de ¹⁸.

La activación de neuronas de proyección produce la liberación de glutamato de sus dendritas laterales. Esto activa a las interneuronas granulares, que a su vez inhiben a las de proyección mediante mecanismos de inhibición recurrente y lateral ⁷⁴. Estos mecanismos contribuyen al aumento del contraste en los patrones de activación de diferentes olores y modulan la salida de la información sensorial a las estructuras superiores en la corteza olfatoria, vía las neuronas de proyección del bulbo ⁷⁵.

La capa de las células mitrales contiene los cuerpos celulares de las neuronas de proyección mitrales ([Figura I.4](#)).

La capa plexiforme interna contiene los axones de las neuronas de proyección que forman el tracto olfatorio lateral hacia estructuras de procesamiento superior en la corteza olfatoria ^{76,77} ([Figura I.2](#)).

La capa de las células granulares está compuesta principalmente por las neuronas granulares mencionadas anteriormente, GABAérgicas y carentes de axón ⁷⁵ ([Figura I.4](#)). En contraste con las interneuronas periglomerulares, las células granulares son molecularmente menos diversas. De los marcadores utilizados para clasificar a las interneuronas periglomerulares únicamente se identificó la expresión de calretinina por una parte de las células granulares, de ubicación más superficial en la capa ⁷⁸.

1.1.4. La glía envolvente olfatoria

La glía envolvente olfatoria se encuentra asociada a los axones de las neuronas sensoriales olfatorias, desde la lámina propia del epitelio hasta el bulbo olfatorio. Las células de la glía envolvente derivan de la cresta neural, y por lo tanto comparten su origen ontogenético con las células de Schwann. Originalmente, se conocían como las células de Schwann del sistema olfatorio ⁴³, pero debido a sus características distintivas, como la expresión de un conjunto de marcadores específicos y la presencia en el sistema nervioso central en contacto con astrocitos, se las considera un tipo de glía especializada ^{47,79}.

Las células de la glía envolvente constituyen una población heterogénea dependiendo de su localización y expresan diferentes marcadores gliales propios de las células de Schwann y los astrocitos ([Figura I.6](#)). Las células de la glía envolvente ubicadas en la lámina propia del epitelio olfatorio expresan típicamente el receptor de baja afinidad por neurotrofinas p75 (p75NTR), la proteína de unión a calcio S100B y débilmente la proteína de filamentos intermedios glial (GFAP) ⁸⁰. S100B es una proteína involucrada en la regulación de numerosos procesos intracelulares, incluyendo fosforilación proteica, proliferación y diferenciación celular, y es un marcador que comparte con las células de Schwann, astrocitos y oligodendrocitos ^{81,82}. GFAP pertenece al grupo de proteínas de citoesqueleto, y es reconocida típicamente como marcador de astrocitos. La aparición de los marcadores S100B y GFAP se observa en el nervio olfatorio periférico desde el desarrollo embrionario (E14-15), y puede detectarse en la capa de fibras olfatorias del bulbo olfatorio hacia el momento del nacimiento ^{83,84}. La expresión adulta de S100B se considera uniforme en toda la extensión de la capa de fibras olfatorias ^{42,85,86}.

Adicionalmente, las células de glía envolvente olfatoria presentan una expresión sublamina de otros marcadores. La población residente en la capa externa de la capa de fibras olfatorias (eCFO) expresa de manera débil p75NTR, y la molécula de adhesión embrionaria E-NCAM. La población de la parte interna de la capa de fibras olfatorias (iCFO) expresa neuropéptido Y (NPY), y no presenta expresión de p75NTR o E-NCAM ^{2,83-85,87,88} ([Figura I.6](#)).

Entre el conjunto de marcadores que permite identificar a las células de la glía envolvente, también se encuentra la proteína *brain lipid binding protein* (BLBP), expresada por la glía radial ^{3,89,90}. Esta proteína es regulada negativamente en la mayoría de las células del sistema nervioso maduro, pero puede ser regulada positivamente luego de un daño ⁹¹. Si bien la glía envolvente no produce mielina, expresa DM-20, una variante de *splicing* del gen de la proteína proteolipídica (PLP) ^{92,93} ([Figura I.6](#)), el componente más abundante de la mielina del sistema nervioso central ⁹⁴, también expresado por oligodendrocitos.

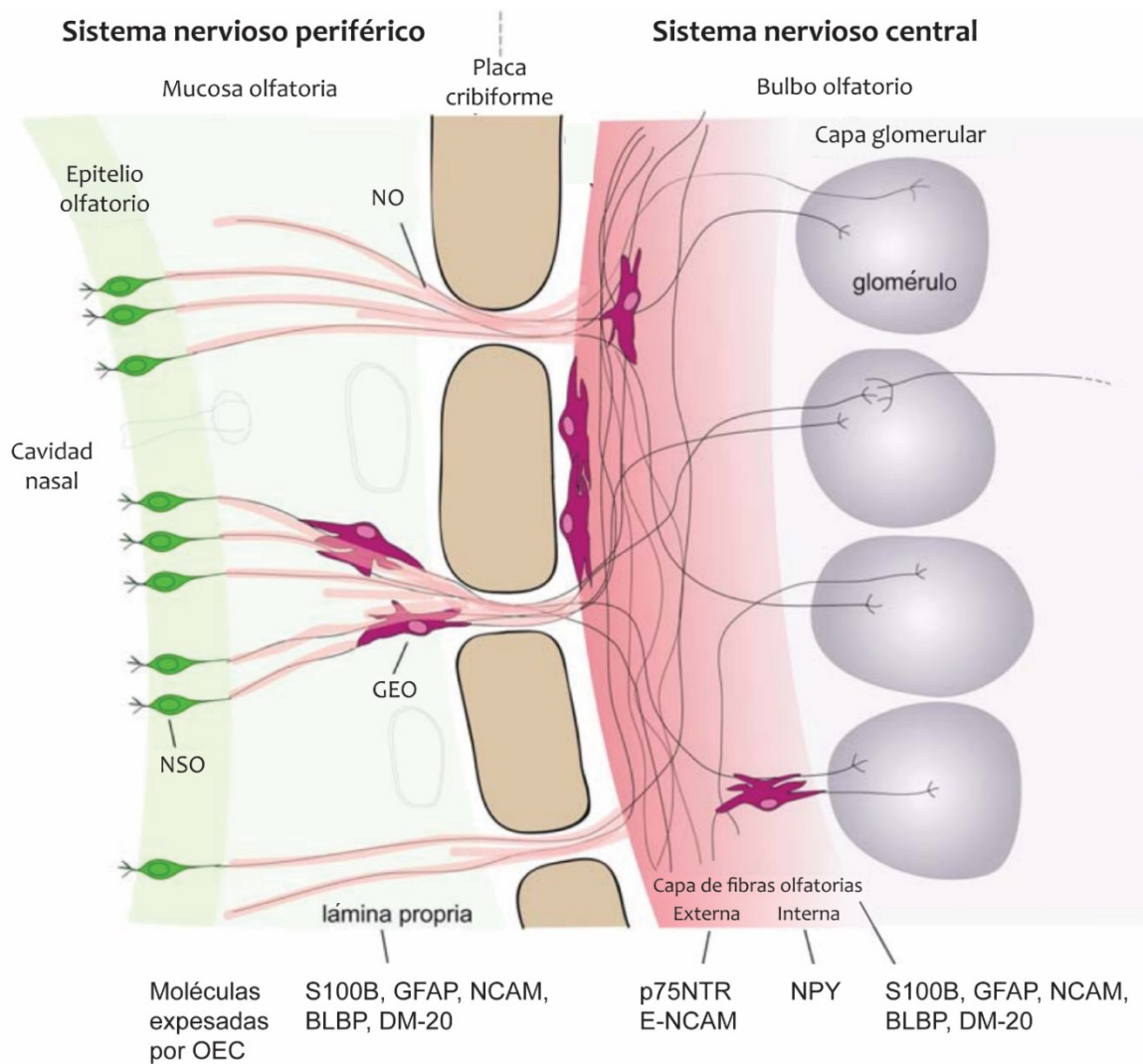


Figura I. 6. Expresión de marcadores en la glía envolvente olfatoria. Las células de glía envolvente olfatoria (GEO) envuelven a los axones de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) a lo largo de todo el nervio olfatorio (NO) desde la lámina propia del epitelio en el sistema nervioso periférico hacia el sistema nervioso central. La GEO cruza la placa cribiforme y se localiza en la superficie del bulbo olfatorio, formando la capa de fibras olfatorias (CFO). Ésta se subdivide en dos partes, CFO externa (eCFO) e interna (iCFO), las cuales se pueden distinguir por la expresión de marcadores específicos (p75NTR y E-NCAM para la eCFO y NPY para la iCFO). Además, se lista una serie de marcadores para todas las células de glía envolvente. Adaptado de ².

En contraste con las células de Schwann, las células de glía envolvente olfatoria pueden invadir el entorno rico en astrocitos del bulbo olfatorio, en el sistema nervioso central. Además, durante la diferenciación de la vía aferente olfatoria primaria, la glía envolvente participa en la formación del límite de células gliales

entre el sistema periférico y central ^{42,84,95}. Se ha propuesto que la capacidad de invadir un entorno astrocítico radica en el repertorio y la regulación de las moléculas de adhesión que expresan ⁹⁶.

A pesar de la heterogeneidad en la expresión de marcadores, todas las células de glía envolvente son estructuralmente similares. Las células de la glía envolvente presentan una morfología fusiforme, con proyecciones citoplasmáticas que forman una matriz con lagunas por donde discurren los paquetes de axones de las neuronas sensoriales ^{3,43,49}.

1.2. Formación del mapa sensorial del bulbo olfatorio

La capacidad del sistema olfatorio de reconocer y discriminar decenas de miles de moléculas odorantes está basada en el principio de que cada compuesto odorante genera un patrón de respuesta específico de múltiples neuronas sensoriales. Como regla general, el conjunto de neuronas sensoriales que expresan un mismo receptor olfatorio converge generalmente a solo dos glomérulos de más de 1800 ⁹⁷, uno en la parte medial y otro en la lateral de cada bulbo ⁹⁸⁻¹⁰². La generación del mapa sensorial ocurre desde el desarrollo embrionario, sin embargo, durante la edad posnatal ocurre un proceso de refinamiento que determina el mapa sensorial final que se encuentra en la edad adulta ^{1,7}.

1.2.1. Maduración del bulbo olfatorio

Durante el desarrollo embrionario, los axones de las primeras neuronas sensoriales contactan la vesícula telencefálica en E13 y demoran hasta E15.5 para extenderse a sitios específicos del bulbo olfatorio en formación. Los axones de las neuronas sensoriales que expresan un mismo receptor olfatorio convergen en un área amplia de la superficie del bulbo ¹⁰³⁻¹⁰⁵, encontrando axones de distintos tipos de neuronas sensoriales de manera entremezclada durante la fase prenatal y perinatal ^{103,106}.

A edad posnatal 0-1 días (P0-1) comienzan a delimitarse los neuropilos glomerulares, aún en formación. El tamaño de los glomérulos y de la capa glomerular va en aumento a medida que aumenta la población de axones de las neuronas sensoriales que arriban y que llegan neuronas periglomerulares que se ubican alrededor de los proto-glomérulos ¹⁰⁷. Las capas más profundas del bulbo olfatorio mantienen a esta edad una estructura inmadura. Se observan acúmulos de células de glía radial identificadas por la expresión de vimentina (VIM) en la capa glomerular, junto con células que expresan la proteína GFAP, posiblemente astrocitos ^{107,108}. Se observa expresión de componentes de matriz extracelular como CS-PG (proteoglicano con sulfato de condroitina) y CT (citotactina/tenascina) en astrocitos, principalmente en el límite entre la capa glomerular y la capa plexiforme externa, los cuales parecen limitar la proyección de los axones de las neuronas sensoriales ¹⁰⁸ a zonas más profundas que la capa glomerular.

Durante el desarrollo posnatal se observa que la disminución de la expresión de VIM da lugar a un aumento gradual de la expresión de GFAP, lo que significa que la glía radial disminuye en número a medida que aumenta la presencia de astrocitos. Se observa que las capas que aún no llegaron a su estadio de maduración final, tienen presencia de glía radial VIM+ y un menor número de astrocitos en comparación con el sistema maduro en edad adulta ^{107,108}.

A P5-7 se distinguen todas las capas del bulbo olfatorio. En la capa glomerular no se encuentran células de glía radial VIM+, mientras que en las capas profundas estas células aún están presentes. Los astrocitos aumentan su presencia en la capa glomerular y en la capa de fibras olfatorias ¹⁰⁷, acompañados de un aumento de expresión de moléculas de matriz extracelular ¹⁰⁸. Las interneuronas del bulbo, principalmente las células granulares y periglomerulares, son mayormente generadas durante el desarrollo posnatal ¹⁰⁹⁻¹¹², en la zona subventricular de los ventrículos laterales. Éstas migran a lo largo de la corriente migratoria rostral ¹¹³ y aparecen en las capas correspondientes durante la primera semana de vida ^{109,114}. A esta edad, comienza también el refinamiento de las proyecciones glomerulares de las neuronas mitrales. Las neuronas mitrales sufren un proceso extensivo de poda (*pruning*) de su árbol dendrítico. A P5 se pueden

observar neuronas mitrales con morfología inmadura, que extienden más de una dendrita apical a la capa glomerular.

A P14 la citoarquitectura del bulbo olfatorio se asemeja a la del animal adulto, se observa una única fila de glomérulos claramente encapsulados por neuronas periglomerulares. La capa externa plexiforme contiene células dispersas y en la capa de células granulares ya se observa la estructura comparable a la del adulto. A esta edad las células de glía radial VIM+ prácticamente no se observan en ninguna región del bulbo. En cuanto a los astrocitos, se observa por inmunomarcación un alto nivel de expresión de GFAP alrededor de los glomérulos y con proyecciones finas orientadas hacia el núcleo del neuropilo ¹⁰⁷, acompañado de la expresión de glicoproteínas de matriz extracelular ¹⁰⁸, mientras se registra un descenso del número de astrocitos y procesos presentes en la capa plexiforme externa y de células granulares ¹⁰⁷.

Si bien al momento del nacimiento prácticamente todos los tipos de sinapsis característicos de la etapa adulta ya se pueden encontrar representados, la densidad sináptica sufre un proceso de maduración. En la capa glomerular, la sinaptogénesis ocurre activamente hasta entrada la segunda semana posnatal, se estabiliza entre P15 y P20, para luego decaer lentamente ¹¹⁴. En la capa externa plexiforme y la capa granular, la densidad de estructuras sinápticas continúa aumentando incluso hasta la edad adulta, reflejando el arribo de nuevas interneuronas al circuito ^{67,114,115}.

A nivel molecular, la formación del mapa sensorial involucra la selección del receptor olfatorio en cada neurona sensorial. Los genes que codifican una amplia gama de receptores olfatorios se encuentran ubicados en loci genéticos acotados, y se propone que la selección de un gen en particular se debe a la existencia de “regiones controladoras de *locus*” (*locus control region*), que activan estocásticamente la transcripción de uno entre varios genes de receptores olfatorios organizados en tándem (*clusters*). Como parte de un ciclo de retroalimentación negativa, la actividad del receptor seleccionado inhibe la expresión de otros genes de receptores ^{116,117}. En animales de edad neonatal, una pequeña proporción de neuronas sensoriales olfatorias expresa dos receptores olfatorios en simultáneo de

manera funcional. Sin embargo, esto parece ser eventualmente eliminado en el proceso de maduración posnatal, de manera dependiente de la actividad sensorial ¹¹⁸.

Durante el desarrollo posnatal los axones de las neuronas sensoriales son segregados a glomérulos específicos y distintos asociados a un receptor olfatorio específico ^{103,105,119}. El tiempo necesario para el refinamiento final de los glomérulos es variable, desde 3 días ¹⁰³ a 25 días ¹⁰⁶, dependiendo del tipo de receptor olfatorio. En cuanto a los mecanismos moleculares que permiten la convergencia ordenada de los terminales axónicos hacia los glomérulos, se atribuye a los receptores olfatorios la capacidad de regular los niveles transcripcionales de moléculas de guía y de fasciculación (*axon-guidance*, *axon-sorting molecules*, respectivamente) ¹.

El modelo aceptado para la maduración del mapa sensorial del bulbo postula que la formación del mapa ocurre en fases. En una fase temprana, se forma el mapa a nivel general con el arribo de los axones pioneros que expresan moléculas guía como *Sema3F* (*semaphorin 3F*), y la proyección de axones tardíos que expresan *Nrp2* (*neuropilin-2*) los cuales son repelidos por los primeros para la proyección en el eje dorso-ventral ¹²⁰. La proyección del eje antero-posterior, depende de moléculas guía como *Sema3A* y *Nrp1* cuya expresión es regulada por los niveles específicos de cAMP por cada tipo de neurona sensorial ¹²¹. En una fase más tardía, niveles de expresión específicos de moléculas de adhesión y repulsión para cada tipo de neurona sensorial son los responsables de la segregación final de los axones a glomérulos específicos y consecuente formación del mapa sensorial, en un proceso dependiente de la actividad neuronal ^{106,122,123}. En consecuencia, este tipo de regulación permite la convergencia de axones de neuronas sensoriales similares, conformando glomérulos homotípicos, y la eliminación de glomérulos heterotípicos a lo largo del refinamiento posnatal ¹⁰⁶.

1.2.2. Deprivación sensorial olfativa durante el desarrollo posnatal

El tratamiento de deprivación sensorial olfatoria por oclusión unilateral de una narina es un modelo utilizado para el estudio de la dependencia de la actividad sensorial del proceso de desarrollo posnatal de los circuitos olfatorios. Existen distintos abordajes del protocolo de deprivación que evalúan sus efectos en el desarrollo posnatal y en la edad adulta ^{124,125}. En lo que a esta tesis respecta, se hará el foco en los efectos de deprivación sensorial desde P0-1 sobre el refinamiento posnatal y en manipulaciones selectivas a nivel molecular de la actividad de las neuronas sensoriales. El modelo de oclusión unilateral permite considerar al lado contralateral a la oclusión como un control interno, al no reportarse cambios al comparar con animales con una oclusión simulada (*sham*) ¹²⁶.

Los cambios producidos por la deprivación sensorial se manifiestan en el epitelio olfatorio. La actividad metabólica celular, evaluada por expresión de la enzima succinato deshidrogenasa, manifiesta una reducción luego de dos días de tratamiento en el lado ipsilateral a la oclusión ¹²⁷. Se ha reportado que el grosor del epitelio olfatorio del lado ipsilateral a la oclusión se encuentra reducido en un 15% a los 20 días de la oclusión neonatal, y que esto se asocia con una reducción en la tasa de proliferación de células madre del epitelio ^{128,129}.

A nivel del bulbo olfatorio, la oclusión unilateral de una narina en ratones desde el nacimiento provoca una reducción de aproximadamente el 25% del volumen del bulbo ipsilateral a la oclusión a los 30 días de deprivación ¹³⁰⁻¹³². Esta observación ha sido reproducida en múltiples modelos animales ¹²⁶, observando este fenómeno si se ocluye la narina durante el desarrollo posnatal, pero no más tarde ^{133,134}. Estos efectos se deben principalmente a la reducción en el número de células del bulbo, especialmente células mitrales, células *tufted* y granulares, y células gliales, luego de 30 días de deprivación sensorial ¹²⁶. Se postuló que esta disminución en el número de neuronas es causada por una mayor tasa de muerte celular debido a la deprivación sensorial, y no debido a una reducción de la neurogénesis ^{135,136}. La disminución en el volumen parece corresponder a un enlentecimiento en el crecimiento normal del bulbo olfatorio. Se han reportado

reducciones en el volumen de la capa de células granulares a P8¹³⁷, y de la capa externa plexiforme y glomerular, observando a P12^{137,138}.

Se ha observado que la privación sensorial reduce los niveles de expresión de la enzima limitante en la síntesis de dopamina TH en neuronas periglomerulares del bulbo olfatorio^{68,70,139-146}. En animales juveniles con 20-40 días de privación sensorial la expresión de TH en la capa glomerular se ve reducida^{68,147,148}. Estas observaciones se relacionan con una disminución de los niveles de dopamina en el bulbo entre 4 y 8 días luego de la privación. Se ha propuesto que la disminución de las neuronas dopaminérgicas en la capa glomerular en el bulbo ipsilateral a la oclusión, se debe a la eliminación de estas células por parte de la microglía residente¹⁴⁹. Se ha reportado que a P30 se manifiesta un aumento en los niveles de expresión del marcador glial GFAP y en el número de astrocitos del bulbo¹⁵⁰.

Durante el proceso de refinamiento del mapa glomerular del bulbo la fasciculación y segregación de terminales axonales ocurre de manera dependiente de la actividad sensorial. La reducción del número de glomérulos heterotípicos, aquellos donde convergen más de un tipo de neurona sensorial, es un proceso normal en el refinamiento del mapa sensorial, dependiente de la actividad sensorial¹⁰⁶. En los animales con oclusión unilateral de narina, un número alto de glomérulos ectópicos persiste a una edad avanzada del desarrollo posnatal^{106,151}. Se ha reportado, que la inhibición de la actividad neuronal, mediante la expresión del canal de potasio *inward rectifying* Kir2.1, demora el crecimiento axonal de las neuronas sensoriales y su convergencia en glomérulos específicos¹⁵² y produce invasión de glomérulos supernumerarios.

A nivel molecular la dependencia de la actividad del proceso de refinamiento está sustentada en parte por los niveles de cAMP que expresan las neuronas sensoriales, y que como se describió anteriormente, impactan en los niveles de expresión de moléculas de guía y adhesión/repulsión axonales. Se ha reportado que las moléculas de guía axonal son afectadas por la falta de actividad basal de los receptores olfatorios, independiente de la unión de ligando¹⁵³ y que la expresión de moléculas de adhesión/repulsión son moduladas por variaciones en el potencial de membrana de las células y del flujo de iones^{123,154}.

Una estrategia para evaluar la dependencia de actividad en el refinamiento del circuito bulbar es generar mediante manipulación genética animales con neuronas sensoriales inactivas y activas en competencia. En animales en los que sólo algunas neuronas sensoriales expresan canales activables por cAMP deficientes y en consecuencia tienen una cascada de transducción de la señal olfatoria truncada, se observa que las proyecciones de neuronas totalmente funcionales se dirigen hacia glomérulos diferentes que las neuronas deficientes ¹⁵⁵. En este mismo modelo, se ha reportado que las neuronas deficientes son lentamente eliminadas ante la exposición a olores ¹⁵⁶. En animales donde algunas neuronas sensoriales tienen bloqueada la liberación vesicular, se observó que las neuronas sensoriales inactivas únicamente se eliminan gradualmente en un contexto de alta competencia, donde hay mayor prevalencia de neuronas funcionales ¹⁵⁷. Estos trabajos sugieren que el proceso de eliminación de las neuronas sensoriales mediada por el nivel de actividad y la competencia con otras son la base para el refinamiento del circuito glomerular y la reducción de glomérulos heterotípicos.

A nivel del microcircuito glomerular, la maduración final de las neuronas mitrales involucra un aumento en el tamaño celular y en el número de dendritas secundarias proyectadas hacia la capa plexiforme externa, mientras que prevalece una única dendrita primaria hacia la capa glomerular ¹⁵⁸ en un proceso dependiente de actividad sensorial ^{159,160}. Las neuronas mitrales se encuentran acopladas mediante sinapsis eléctricas. Durante la segunda semana de vida (P7 a 10) el acople eléctrico entre neuronas es alto, y se reduce en las semanas posteriores hasta alcanzar un grado de acople correspondiente a la edad adulta ¹⁶¹. La maduración en el grado de acople entre células mitrales es un proceso que se ve impedido en animales con deprivación sensorial unilateral ¹⁶¹. En ratas ha sido reportado que luego de un mes de oclusión unilateral en el lado ipsilateral aumenta la proporción de células mitrales que responden a la estimulación con múltiples odorantes, sugiriendo un déficit de discriminación olfativa ¹⁶².

1.3. La conectividad entre las células gliales

Una característica fundamental de la glía es la capacidad de formar redes de células conectadas por *gap junctions*, que permiten el intercambio de iones, metabolitos y sustancias neuroactivas. Las redes gliales son selectivas y plásticas, y pueden regular las sinapsis, y por ende, el funcionamiento de circuitos neuronales ¹⁶³.

1.3.1. Conexinas y redes gliales

Los canales que median las *gap junctions* están constituidos por el acoplamiento de dos conexones o hemicanales, formados por hexámeros de proteínas integrales de membrana, denominadas conexinas (Cx) ¹⁶⁴ ([Figura I.7](#)). Cada Cx contiene 4 dominios transmembrana con dos bucles extracelulares y uno intracelular con los extremos carboxi- y amino-terminales orientados hacia el citoplasma celular, susceptibles de ser regulados por modificaciones post-transduccionales. Existen 20 genes para Cx en el ratón y es común que un tipo celular exprese más de un tipo de Cx ¹⁶⁵.

Los canales que median las *gap junctions* pueden estar conformados por un mismo tipo de hemicanal (homotípicos) o por diferentes tipos de hemicanales (heterotípicos) ¹⁶⁶, y a su vez cada hemicanal puede estar compuesto por un mismo tipo de Cx (homomérico) o distintas Cx (heteromérico) ¹⁶⁷ ([Figura I.7](#)).

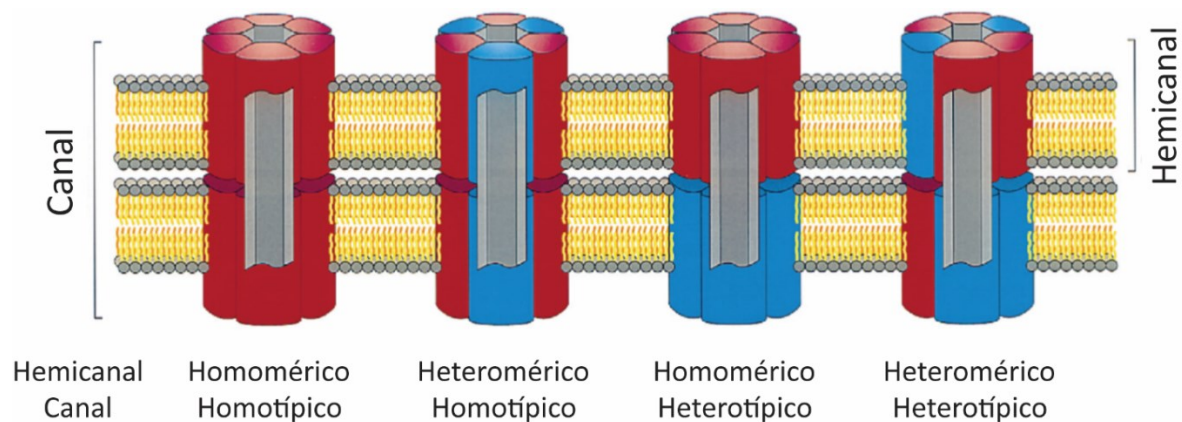


Figura I. 7. Estructura de los canales que median *gap junctions*. Representación esquemática de canales de diferente composición. Los hemicanales son estructuras

hexaméricas de Cx. Dos hemicanales enfrentados forman canales y varios canales forman las *gap junctions*. Los hemicanales ensamblados con un mismo tipo de Cx se denominan homoméricos, mientras que los hemicanales que utilizan más de un tipo de Cx son llamados heteroméricos. Los canales formados por un mismo tipo de hemicanal se denominan homotípicos, y los compuestos por hemicanales diferentes se llaman heterotípicos. Adaptado de ¹⁶⁷.

Adicionalmente, los hemicanales no acoplados permiten el intercambio de moléculas entre el citoplasma y el medio extracelular que regulan funciones de los circuitos ^{168,169}. Por ejemplo, las neuronas mitrales del bulbo olfatorio presentan oscilaciones en su potencial de membrana que se modulan por un mecanismo que depende de hemicanales de Cx43 presentes en la glía del bulbo ¹⁷⁰. Por otro lado, las Cx pueden funcionar como moléculas de adhesión ¹⁷¹ e interactuar con otras proteínas, tales como receptores, proteínas del citoesqueleto, kinasas y fosfatasa, vía su dominio carboxi-terminal ¹⁷².

Las Cx se clasifican en dos grupos o familias (α y β), y las Cx de un mismo grupo son más propensas a formar canales ^{167,173}. Por ejemplo, en experimentos *in vitro* se ha observado que la Cx37 del grupo α forma canales heterotípicos con la Cx40 ¹⁷⁴ y Cx43 ¹⁷⁵, pero no con Cx del grupo β como Cx26 y Cx32 ^{174,176}.

Diferentes Cx tienen propiedades diferenciales que establecen sus propiedades de apertura, selectividad y regulación ^{177,178}. Tradicionalmente se ha considerado a las *gap junctions* como canales poco selectivos, permeables a cualquier tipo de molécula con un peso molecular menor a 1kDa ^{167,178}. En la técnica de acople por colorante (*dye-coupling*) se inyecta un trazador que permea por *gap junctions* mediante una pipeta de registro electrofisiológico, y se observa su difusión a células vecinas que forman parte de la red. Utilizando diferentes tipos de trazadores se ha aportado evidencia de que la permeabilidad de las moléculas que pasan a través de las *gap junctions* depende de su volumen y peso molecular, forma, carga e interacciones específicas con las Cx que conforman el canal ¹⁷⁹.

En cuanto a la permeabilidad a moléculas endógenas, se ha reportado que los canales homotípicos de Cx32 son permeables a los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP, mientras que los canales heterotípicos de Cx32/Cx26 son únicamente permeables a cAMP ¹⁸⁰. Se ha visto también que los canales homotípicos de Cx32

y Cx26 exhiben propiedades electrofisiológicas diferentes de los canales heterotípicos ¹⁸¹. En cuanto a los canales de Cx43, éstos son selectivos para distintos tipos de segundos mensajeros como cAMP, IP3 y Ca²⁺, aminoácidos, nucleótidos, glucosa, lactato y fosfatos, pequeños péptidos y ARN de pocas bases. Los canales compuestos por Cx30 mostraron ser más selectivos frente al pasaje de cationes por sobre aniones ^{178,182}. Esta evidencia apoya la hipótesis de que los canales compuestos por diferentes tipos de Cx tienen una permeabilidad diferencial a segundos mensajeros y otros tipos de moléculas endógenas.

Diferentes tipos gliales expresan un conjunto de Cx que caracterizan el tipo de *gap junction* que pueden establecer ([Tabla I.1](#)). Las principales Cx que median las redes de astrocitos son la Cx30, Cx43 ¹⁸³ y la Cx26 detectada en astrocitos subpiales y subependimales ^{184,185}. Los niveles relativos de estas proteínas varían de acuerdo con el estadio de desarrollo y la región del cerebro ^{186,187}. La Cx43 es expresada por la glía radial desde temprano en el desarrollo embrionario (E12). Desde P10 a P30 la expresión de Cx43 aumenta y es detectable en todo el cerebro con una inmunomarca puntiforme ¹⁸⁷. Se observa una baja expresión de ARNm de Cx30 durante las primeras dos semanas de edad posnatal, y aumenta hacia P30 alcanzando los niveles que mantiene en el adulto ^{186,188}. A nivel funcional, se ha reportado conectividad por acople por colorante en astrocitos registrados *in vitro* desde P11 ¹⁸⁹. En astrocitos de hipocampo con el desarrollo posnatal emergen distintos perfiles de corriente de membrana que correlacionan con el grado de acople celular. Se observó acople celular por colorante desde P1, y fue más frecuentemente observado en astrocitos con un perfil electrofisiológico “pasivo”. A su vez, el tamaño de las redes de astrocitos de hipocampo parece aumentar con la edad, llegando a un *plateau* a P7 ¹⁹⁰.

En el caso de los oligodendrocitos, se ha reportado la expresión de tres Cx diferentes. La Cx32 se encuentra principalmente confinada a conexiones autocelulares en las vainas de mielina ^{165,191,192}. La Cx29 se detecta en las regiones internodales y juxtapanodales de láminas pequeñas de mielina y es utilizada para conexiones autocelulares también. Su expresión se encuentra distribuida tanto en materia gris como materia blanca ^{193,194}. La Cx32 y la Cx29 son detectables durante

el inicio del proceso de mielinización y aumentan su expresión en la edad adulta ¹⁹⁵. La tercera Cx encontrada en los oligodendrocitos es la Cx47, principal Cx expresada durante el desarrollo embrionario, y también presente en edad juvenil. En la etapa adulta se encuentra restringida al soma de estas células ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ y principalmente presente en el cuerpo caloso, estriado, cerebelo y espina dorsal ¹⁹⁵.

Se ha presentado extensa evidencia que muestra que existen conexiones heterocelulares entre astrocitos y oligodendrocitos ^{165,184,198-204}. Hay trabajos que muestran que las uniones entre oligodendrocitos y astrocitos están formadas por *gap junctions* heterotípicas de Cx47/Cx43 y Cx32/Cx30 ^{194,205-207}. Las uniones heterocelulares entre astrocitos y oligodendrocitos parecen ser importantes para el mantenimiento de la mielina ²⁰⁸ y difusión adecuada de glucosa ²⁰⁹. Además, la presencia de Cx43 es necesaria para la regulación de la expresión de Cx47 en los oligodendrocitos ²¹⁰.

Las células de Schwann, células mielinizantes del sistema nervioso periférico, expresan Cx32, Cx43, Cx29 y Cx46 ¹⁶⁶. En registros *ex vivo* las células de Schwann no mielinizantes se encuentran acopladas mediante *gap junctions*, mientras que las mielinizantes pierden esta propiedad ²¹¹. En células mantenidas *in vitro*, la Cx46 es expresada temprano por las células de Schwann durante su proliferación ²¹². La Cx29 comienza a expresarse en los precursores de las células de Schwann, mientras que la Cx32 se observa durante la etapa posnatal, coincidente con el inicio de la mielinización ²¹³.

Recientemente se ha reportado que la microglía expresa diferentes tipos de Cx ^{214,215}. Durante el estado no activado, se ha detectado expresión de Cx32 y Cx36 mediante RT-PCR e inmunofluorescencia ^{216,217}. En la corteza cerebral se ha reportado que menos del 5% de la microglía expresa Cx43, ubicada de manera difusa en el citoplasma celular ²¹⁸. En estado activado por procesos patológicos, la microglía expresa niveles elevados de Cx29 ²¹⁹ y Cx32 ^{217,219}. En este contexto también expresa Cx43, que aumenta su expresión desde los niveles basales, cambia su localización a la interfaz de las células activadas y muestra acople por colorante entre las células, lo que demuestra la presencia de *gap junctions* funcionales ^{215,218,220}.

En cuanto a la expresión de Cx de la glía envolvente, se observó la colocalización de la inmunomarcación contra Cx43 y marcadores de esta glía ³, asemejándose también en esta propiedad, a los astrocitos. No se observó inmunorreactividad contra otras Cx típicamente gliales (Cx26 y Cx32 y Cx30) ^{3,148}. Se ha reportado que la marca de Cx43 exhibe un gradiente de expresión en la capa de fibras olfatorias a edad adulta, siendo más alto desde el límite interno de la capa de fibras olfatorias, y decayendo hacia la parte externa de la misma ^{4,5}. Mediante estrategias genéticas, registros electrofisiológicos y experimentos de *dye-coupling* nuestro grupo ha demostrado que la Cx43 es la principal Cx que media la formación de redes de glía envolvente olfatoria, tanto a edad juvenil como adulta ⁵.

Las células de la glía envolvente olfatoria son una población heterogénea, también en sus propiedades electrofisiológicas y de conectividad. En ratones de edad juvenil (P14-30) mediante registros electrofisiológicos de glía envolvente en rodajas agudas de bulbo olfatorio, se mostró que estas células manifiestan dos perfiles de corriente de membrana bien distintos, en respuesta a pulsos de voltaje aplicados mediante un protocolo de *voltage-clamp* en configuración de célula entera (*whole cell*) ([Figura I.8 A](#)). A esta edad existen células que muestran un perfil no lineal, con conductancias activables por voltaje, aunque la mayoría de ellas muestra un perfil lineal en respuesta a distintos escalones de voltaje ([Figura I. 8B y C](#)). Estos perfiles dependen a su vez del grado de conectividad de las células, observado en experimentos de acople por colorante. Las células con perfiles no lineales, son en su mayoría células aisladas que no conforman redes, mientras que las células con perfiles de corriente lineales muestran un alto grado de conectividad, mediado por *gap junctions* ³ ([Figura I.8 D](#)). Las células de la sublámina interna de la capa de fibras olfatorias forman redes por las que se propagan olas de Ca^{2+} ²²¹, en respuesta a la actividad neuronal ²²² y de manera espontánea ^{223,224}.

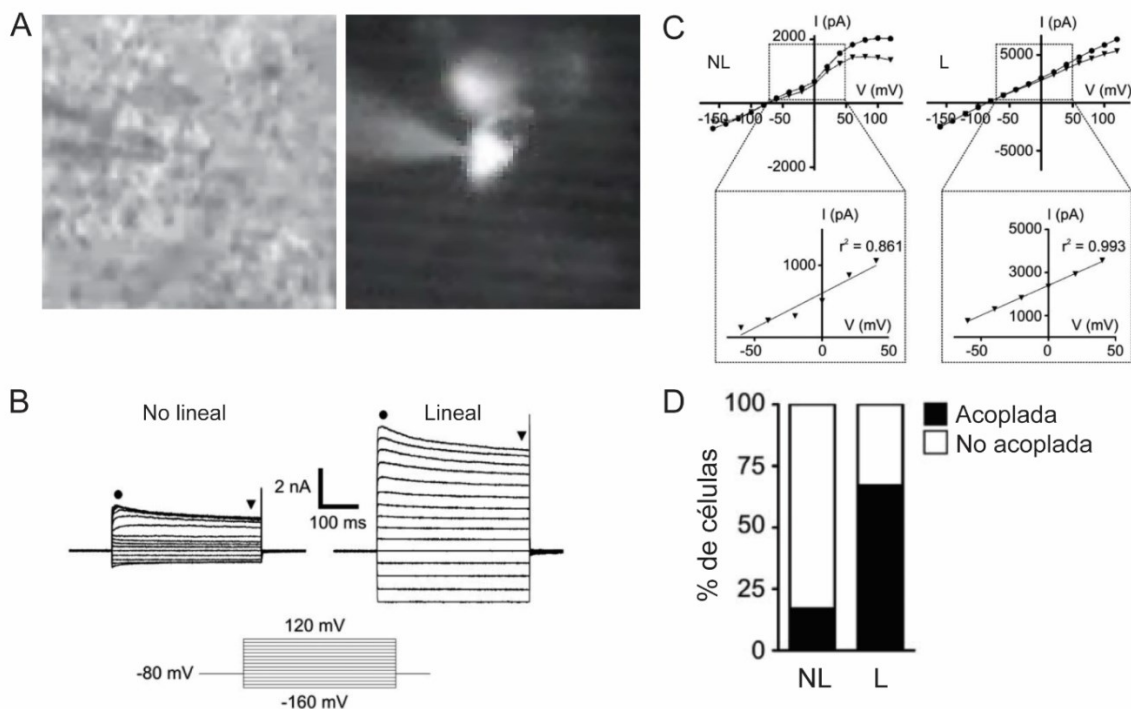


Figura I. 8. Perfiles electrofisiológicos y redes de glía envolvente olfatoria. **A.** Imagen, durante el registro en configuración *whole-cell* de una célula de glía envolvente olfatoria, bajo iluminación de contraste de interferencia diferencial (DIC) (izquierda). La célula fue cargada con Lucifer Yellow y se observa bajo iluminación de epifluorescencia (derecha). **B.** Perfiles de corriente de células de glía envolvente registradas en *voltaje-clamp* con perfil No Lineal (NL) y Lineal (L) en respuesta a escalones de voltaje. **C.** Utilización de un ajuste de linealidad a la curva I/V para el análisis del perfil de corriente de la glía envolvente. Las células con perfil NL muestran un r^2 menor que las de perfil L. **D.** Las células con perfiles NL están principalmente desacopladas, mientras que las células de glía envolvente con perfil de corriente L están mayoritariamente acopladas a otras células. Adaptado de ³.

Los perfiles de expresión de Cx en la glía son diversos y caracterizan a cada tipo glial. La combinación de Cx que cada célula glial expresa determina las propiedades de conectividad que puede establecer. En la [Tabla I.1](#) se resumen los perfiles de expresión de Cx para cada tipo glial.

Célula glial	Conexina
Astroцитos	Cx43 in vitro ^{225–227} in vivo ^{187,191,228–230}
	Cx30 in vitro ²²⁶ in vivo ^{186,228,231–234}

	Cx26 <i>in vitro</i> ²³⁵ <i>in vivo</i> ^{184,185}
	Cx40 <i>in vivo</i> ²³⁴
	Cx45 <i>in vivo</i> ²³⁴
Oligodendrocitos	Cx29 <i>in vivo</i> ^{193,194,236}
	Cx32 <i>in vitro</i> ^{226,235,237,238} <i>in vivo</i> ^{192,193,229–231,237,239}
	Cx47 <i>in vitro</i> ²⁴⁰ <i>in vivo</i> ^{195,197,240,241}
	Cx45 <i>in vitro</i> ²³⁸ <i>in vivo</i> ²³¹
Microglía	Cx29 <i>in vitro</i> ^{217,242} <i>in vivo</i> ²¹⁹
	Cx36 <i>in vitro</i> ^{217,243} <i>in vivo</i> ²¹⁸
	Cx43 <i>in vitro</i> ²⁴⁴
	Cx45 <i>in vitro</i> ²⁴³
	Cx32 <i>in vitro</i> ²¹⁷
Células de Schwann	Cx32 <i>in vitro</i> ²¹¹ <i>in vivo</i> ²¹³
	Cx43 <i>in vitro</i> ²¹¹
	Cx29 <i>in vitro</i> ²¹¹ <i>in vivo</i> ²¹³
	Cx46 <i>in vitro</i> ^{211,212}
Glía envolvente olfatoria	Cx43 <i>in vitro</i> ²⁴⁵ <i>in vivo</i> ^{3–5}

Tabla 1. Presencia de Cx en células gliales. Los trabajos citados comprenden expresión *in vitro* e *in vivo*, detectada mediante RT-PCR e inmunohistoquímica.

1.3.2. Rol modulador de las redes gliales sobre la función neuronal

Tradicionalmente se consideraba que el procesamiento de la información en el cerebro era una función confinada a las neuronas. Sin embargo, los avances en la caracterización fisiológica y molecular de las células gliales, principalmente de los

astrocitos, permitieron identificar la participación activa de estas células en la neurotransmisión.

La comunicación a través de redes es una propiedad prominente de las células gliales. En el caso de los astrocitos, los canales que constituyen *gap junctions* median la formación de grandes ensambles celulares que pueden propagar señales mediante la difusión directa de una variedad de moléculas ¹⁶³. Además, las *gap junctions* sustentan molecularmente la selectividad y preferencia de conectividad entre células en la red glial. Mediante experimentos de acople por colorante se ha demostrado que no todos los astrocitos vecinos están funcionalmente conectados por *gap junctions* ^{148,246,247}. La selectividad se puede explicar por la expresión heterogénea y diversa de Cx, mecanismos de regulación de corto término de la permeabilidad de las *gap junctions* ¹⁷⁸ y la formación de dominios espaciales de conectividad glial definidos durante el desarrollo ²⁴⁸. De esta manera, las redes gliales se organizan en compartimentos anatómicos y funcionales, como se puede observar para el caso de los astrocitos en estructuras altamente compartimentalizadas como la corteza somatosensorial de ratones y el bulbo olfatorio ^{148,246}. En este último, mediante experimentos de acople por colorante, se reveló que los astrocitos mantienen una comunicación predominante con astrocitos de un mismo glomérulo ²⁴⁹. Dicha organización es consistente con la localización de las dos Cx astrogliales (Cx43 y Cx30) en el neuropilo glomerular, con escasa abundancia en los espacios entre glomérulos ¹⁴⁸. Es posible que el confinamiento de la conectividad glial a dominios bien definidos contribuya a la precisión con la que los astrocitos son capaces de regular la función neuronal, por ejemplo a través de la regulación de la homeostasis de factores esenciales del metabolismo energético ²⁵⁰, del K⁺ extracelular ¹⁸³ y del glutamato ²⁵¹.

Se considera que una de las funciones principales de los astrocitos consiste en sustentar metabólicamente a las neuronas. *In vivo*, los astrocitos asimilan la mayor parte de la glucosa durante la actividad neuronal ²⁵². Las *gap junctions* son permeables a metabolitos energéticos como glucosa, lactato y NADH ^{253–255}. Se demostró que la deprivación de glucosa extracelular induce la depresión de la transmisión sináptica en el hipocampo, pero ésta se recupera por el suministro de

glucosa o lactato vía las redes astrocíticas, a condición de que la conectividad glial mediante *gap junctions* se encuentre funcional ²⁵⁶. A su vez, las Cx43 y Cx30 se encuentran enriquecidas en las estructuras *end-feet* de los astrocitos sobre las paredes de vasos sanguíneos contribuyendo al acople neurovascular ^{233,253,257}.

La regulación del flujo sanguíneo depende en gran medida de la señalización de Ca^{2+} intracelular en la glía ^{258,259}. Recientemente se ha reportado que los astrocitos juxtaglomerulares y la glía envolvente forman redes heterocelulares, a través de las cuales propagan ondas de Ca^{2+} desde la segunda semana posnatal (P10 a P20) ²⁶⁰. En la capa de fibras olfatorias, la glía envolvente se encuentra estrechamente asociada a los vasos sanguíneos y responde a la actividad neuronal con aumentos de los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo que provoca vasoconstricción de los vasos adyacentes ²⁶¹. Es posible que las redes heterocelulares de astrocitos y glía envolvente del bulbo contribuyan a la regulación del flujo sanguíneo local, al promover la vasoconstricción de los vasos sanguíneos adyacentes ²⁶⁰.

Adicionalmente, los astrocitos participan del *clearance* del K^+ extracelular aumentado por la actividad neuronal. En ratones con astrocitos *knock-out* para Cx30 y Cx43 se observó que aumenta la probabilidad de descargas epileptiformes ¹⁸³ y que se incrementa la fuerza sináptica excitatoria sobre las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo ⁶. Estos efectos se atribuyen a la remoción insuficiente de K^+ y de glutamato por los astrocitos desconectados ⁶.

Los avances en la caracterización fisiológica y molecular de las células gliales permitieron identificar la participación activa de estas células en la neurotransmisión (revisado en ¹⁶³). Los astrocitos pueden detectar señales neuronales mediante canales iónicos, receptores para neurotransmisores o transportadores ^{148,253,262,263} y responder vía señalización por Ca^{2+} ²⁶⁴⁻²⁶⁶, mediante plasticidad morfológica, y mediante la captación y liberación de factores neuroactivos que modulan la pre- y la post- sinapsis ²⁶⁷⁻²⁶⁹.

La importancia de la formación de redes astrocíticas se puso en evidencia utilizando como herramientas a ratones *knock-out* para Cx30 y Cx43 en astrocitos. Ratones con delección global de Cx30 y delección de Cx43 en astrocitos de manera

constitutiva muestran un comportamiento exploratorio normal, aunque presentan una deficiencia en la exploración de objetos conocidos o familiares relocalizados, junto con déficits de coordinación y sensoriomotores, posiblemente debido al desarrollo de una patología asociada a la mielina ²⁷⁰. Este trabajo sugiere un problema de memoria espacial, proceso dependiente de la actividad hipocampal. De forma coincidente, animales con delección completa del gen de Cx30 también muestran déficits en el comportamiento exploratorio de entornos novedosos, y un incremento de comportamientos ansiogénicos ²⁷¹. En contraposición, animales knock-out constitutivos únicamente para Cx43 en células que expresan GFAP manifiestan una actividad locomotora aumentada ^{272,273} y comportamiento exploratorio de entornos novedosos incrementada ²⁷². La exhibición de severos déficits conductuales en estos animales posiblemente se deba a que manifiestan un desarrollo anormal en el hipocampo, la zona subventricular y cerebelo producto de una desorganización celular ²⁷⁴. Adicionalmente, ratones knock-out para Cx43 en astrocitos, manifiestan perturbaciones del ciclo sueño-vigilia. Estos animales presentan en registros EEG fragmentaciones de la vigilia y excesivo sueño. Este fenómeno parece explicarse por un silenciamiento de las neuronas que producen orexina del hipotálamo lateral, producto de un tráfico deficiente de glucosa y lactato por parte de las redes de astrocitos ²⁷⁵. Por otra parte, se ha reportado que la manipulación de la expresión de la Cx43 mediante ARN de interferencia durante el desarrollo embrionario (E16) provoca una migración aberrante de las neuronas en la neocorteza, asociado al rol de molécula de adhesión de la Cx43 entre la glía radial y las neuronas ¹⁷¹.

Aparte de su función como componente de las *gap junctions*, la expresión de Cx por parte de la glía es esencial para sus efectos moduladores sobre la función neuronal. En el caso de la Cx43 como componente de hemicanales permite la liberación de gliotransmisores ^{168,169}, participa en cascadas de señalización intracelular ²⁷⁶ y en interacción con el citoesqueleto ^{172,277,278}. Es así que la pérdida de las Cx puede potencialmente afectar al desarrollo de los circuitos por múltiples vías.

Los trabajos mencionados aportan evidencia de que la expresión de Cx en la glía y posiblemente su función como proteína de hemicanales y *gap junctions*, es central para la formación y función de circuitos.

1.3.3. Efectos de la actividad neuronal sobre las redes gliales

Las redes gliales son moduladas funcionalmente a corto y largo termino por mecanismos desencadenados por la actividad neuronal ¹⁷⁸. Esta modulación se manifiesta en la despolarización de los astrocitos y aumento de la permeabilidad de las *gap junctions* ^{148,262,263}. Un ejemplo de ello es el aumento del tráfico de glucosa a través de las *gap junctions* de astrocitos hacia zonas de mayor demanda energética, producto de la liberación sináptica de glutamato ^{253,263,279,280}. La actividad neuronal también modula la actividad de los hemicanales de astrocitos compuestos por Cx30, aumentando su permeabilidad al bromuro de etidio ²⁸¹. La modulación de la actividad de hemicanales y *gap junctions* está sustentada en la regulación de la expresión y localización de las Cx favoreciendo su ubicación en membrana y procesos peri-sinápticos ²⁸¹. Que el grado de conectividad de las células gliales es dependiente de la actividad neuronal también se ha visto en experimentos de acople por colorante en rodajas de bulbo olfatorio, donde el silenciamiento de la actividad neuronal de manera aguda por la aplicación de TTX en el baño, y la deprivación de la actividad sensorial mediante oclusión unilateral de narina, favorecen el desacople de las redes de astrocitos periglomerulares ¹⁴⁸.

Los mecanismos descritos que explican la modulación por parte de la actividad neuronal se basan en el aumento de la concentración del K⁺ extracelular, que activa canales de K⁺ en las células gliales ¹⁷⁸. Tal es el caso de la regulación de la conectividad astrocítica en el bulbo olfatorio mediada por canales de tipo K_{IR} ¹⁴⁸. Las variaciones en el potencial de membrana de los astrocitos gatillan cascadas de señalización intracelular, entre los cuales se han reportado la fosforilación post-transduccional de las Cx ²⁶², el aumento de la señalización de Ca²⁺ ^{262,282,283} y propagación en ondas de Ca²⁺ ^{258,259}. La glía envolvente del bulbo olfatorio es capaz de responder a la actividad neuronal mediante la generación de señalización por

Ca^{2+} , en respuesta a la estimulación de los axones de neuronas sensoriales^{222,261}, en un mecanismo sustentado en la actividad de *gap junctions*²²¹. La actividad neuronal también tiene impacto sobre la vida media de las Cx una vez sintetizadas, regulando su tasa de degradación, a la vez que favorece su reubicación en lugares de mayor demanda²⁸¹.

La plasticidad de la respuesta glial está sustentada en el conjunto característico de receptores para neurotransmisores y moduladores que cada tipo glial expresa en membrana, en determinada región del cerebro y momento del desarrollo. Por ejemplo, en animales juveniles, únicamente la glía envolvente de la parte externa de la capa de fibras olfatorias responde con aumentos en la concentración intracelular de Ca^{2+} a neurotransmisores y señalización como glutamato, ATP, dopamina, acetilcolina y serotonina, de manera dependiente del receptor de glutamato de tipo 1 (mGluR1) y del receptor purinérgico de tipo P2Y₁²⁸³. Un factor adicional que agrega complejidad a la regulación de la conectividad y función glial es el de la susceptibilidad a la actividad neuronal en ventanas temporales acotadas. Por ejemplo, en el bulbo olfatorio los astrocitos reducen su conectividad frente a la actividad neuronal mediante un mecanismo que involucra a la Cx30 y no a la Cx43. Esto hace que la modulación de la conectividad por parte de la actividad neuronal comience recién con el inicio de la expresión de Cx30 a partir de la tercera semana de edad, lo que aporta una ventana temporal para la plasticidad en respuesta a la actividad neuronal¹⁴⁸. En el caso de la glía envolvente, la respuesta a la activación de las neuronas sensoriales se encuentra exacerbada durante la primera semana posnatal, y decrece luego (de P14 a P21) a medida que progresa el desarrollo de la glía y se modifica la expresión de receptores en membrana²⁸³.

Con el objetivo de entender el rol que las redes gliales tienen en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso es necesario saber cómo maduran y son reguladas, cuáles son los sustratos moleculares que las median y cómo se modulan por parte de la actividad neuronal.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se detalló en la sección introductoria, las neuronas sensoriales olfatorias proyectan un axón desde la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio en el sistema nervioso central, constituyendo el nervio olfatorio. La topografía de estas proyecciones establece un mapa sensorial que se refina durante el desarrollo posnatal y es dependiente de la experiencia sensorial. Tanto los astrocitos del bulbo como la glía envolvente que acompaña a los axones sensoriales establecen redes conectadas por *gap junctions* que tienen a la conexina 43 (Cx43) como constituyente central, al menos desde la etapa juvenil. Conocer si un refinamiento posnatal de estas redes acompaña el refinamiento de la conectividad de las neuronas sensoriales contribuirá a establecer el papel de las redes gliales en el establecimiento del mapa sensorial.

El **objetivo general** de esta tesis es evaluar si las redes gliales del bulbo olfatorio se refinan durante el desarrollo posnatal de manera dependiente de la experiencia sensorial.

Nuestra **hipótesis** sostiene que el grado de conectividad de la glía envolvente olfatoria se restringe durante el desarrollo posnatal y que las redes de glía envolvente son sensibles a la actividad sensorial.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la estructura de redes de glía envolvente durante el desarrollo posnatal.
2. Describir los patrones de expresión de conexinas gliales durante el desarrollo posnatal.
3. Evaluar si la Cx43 media las redes de glía envolvente olfatoria desde temprano en el desarrollo posnatal.
4. Evaluar si la expresión de Cx43 de la glía olfatoria es sensible a la deprivación sensorial olfatoria durante el desarrollo posnatal.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Animales

Para la realización de esta tesis se utilizaron distintas líneas de ratones transgénicos criadas y mantenidas en el bioterio del IFIBIO y una línea salvaje (*wild type* o WT - C57BL/6). En la sección de [Resultados](#) se detalla para cada experimento las líneas de ratones utilizadas y la edad de experimentación.

Los animales se mantuvieron en un ambiente de luz y temperatura controladas, con ciclos luz:oscuridad de 12:12 horas (la luz fue encendida a las 7 A.M.) y fueron alimentados *ad libitum* con alimento balanceado (ACA, Gilardoni). Los animales utilizados en edad pre-destete (P0-P21) fueron mantenidos en las jaulas de cría con los ratones parentales, incluso bajo administración de tratamientos. Los animales utilizados en edad posterior al destete fueron agrupados de 2 a 6 ratones por jaula. Para todos los procedimientos con animales se siguieron las normas y protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

2.1.1. Ratones C57BL/6

Esta cepa de ratones es una cepa salvaje o *wild type* endocriada. Fue adquirida para las cruzas mencionadas anteriormente y para la cría de animales utilizados en la optimización de experimentos de conducta olfatoria. Los ratones fueron comprados en los bioterios de la Academia de Nacional Medicina, Facultad de Veterinaria, UBA y Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, UBA.

2.1.2. Ratones S100B-GFP

Es una línea transgénica de ratones que permite identificar a las células de la glía envolvente olfatoria, entre otras, debido a que expresan la proteína fluorescente verde GFP bajo el promotor génico de la proteína S100B ²⁸⁴. En el bulbo olfatorio, la secuencia reguladora de S100B se encuentra activa además de en la glía envolvente ^{3,285} en una subpoblación de los astrocitos, que en la capa de fibras olfatorias del bulbo representan un 5% de las células. Estos animales portan un transgén que consta de 9.4 kilobases de la secuencia reguladora del gen humano de S100B río arriba de la región codificante de la proteína fluorescente verde mejorada (*enhanced GFP*, eGFP), (ID Jackson Laboratories: B6.D2-Tg(S100B-EGFP)1Wjt/J; donado por Wesley Thompson)

²⁸⁶. El contexto genético es C57BL/6, obtenido por retrocruza en el bioterio del IFIBIO.

Los animales se criaron y mantuvieron en el bioterio del IFIBIO. Los animales se mantuvieron en heterocigosis para el transgén S100B-GFP, cruzando a los animales parentales con ratones C57BL/6 (C57), dando como resultado camadas con crías heterocigotas (S100B-GFP +) y homocigotas sin el transgén (S100B-GFP-). Los animales portadores del transgén fueron identificados por fenotipificación, mediante la observación de sus ojos bajo luz blanca. Los ratones heterocigotas presentan ojos fluorescentes debido a la expresión de la proteína S100B por células epiteliales del cristalino ²⁸⁷.

2.1.3. Ratones PLP-CreERT

Es una línea transgénica de ratones que permite la expresión del transgén en células que expresan el promotor de la proteína PLP1 (proteína proteolípica 1), (ID *Jackson Laboratories*: B6.Cg-Tg(Plp1-cre/ESR1)3Pop/J). El transgén es un constructo codificante para una proteína de fusión entre la enzima recombinasa Cre y el dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno humano mutado (ERT), tal que se une preferentemente al ligando sintético tamoxifeno (Tx), y no al ligando endógeno estradiol ²⁸⁸. La expresión de la recombinasa Cre está dirigida por la secuencia reguladora del gen de PLP1 que se encuentra activa en la glía envolvente olfatoria ⁹², además de otras células gliales (oligodendrocitos y células de Schwann). La proteína de fusión CreERT tiene localización citoplasmática, donde es funcionalmente inactiva, y transloca al núcleo en presencia de Tx ([Figura M.1](#)) donde cataliza la recombinación de secuencias *loxP* (sitios de recombinación) y produce la delección de secuencias flanqueadas por sitios *loxP*. Esta línea transgénica se utilizó como una herramienta para la delección de secuencias génicas flanqueadas por sitios *loxP* (“floxeadas”) en la glía envolvente olfatoria ⁵.

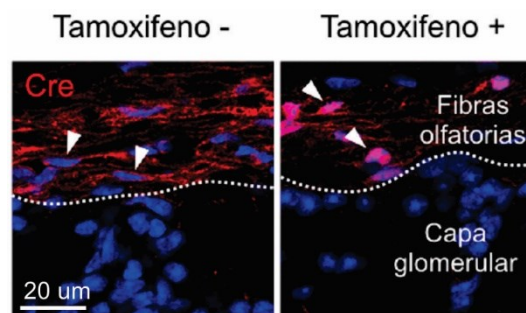


Figura M.1. Translocación al núcleo de la recombinasa Cre por la administración de tamoxifeno. Inmunohistoquímica dirigida a la recombinasa Cre en secciones de bulbo olfatorio de ratones PLP-CreERT;Cx43^{flox/flox} tratados con tamoxifeno. El tamoxifeno induce la translocación de la recombinasa Cre del citoplasma al núcleo (indicado con flechas) en la glía envolvente. Tomado de ¹⁸.

Esta línea de ratones fue criada y mantenida en el bioterio del IFIBIO. Los animales se mantuvieron en heterocigosis según las recomendaciones del proveedor (Jackson Lab.), cruzando animales de genotipo heterocigota para el transgén PLP-CreERT con animales homocigotas sin el transgén. El genotipo de cada animal fue identificado según el protocolo detallado en la [sección M. 2.2.](#)

2.1.4. Ratones Cx43^{flox}

Esta línea de ratones posee una modificación génica en donde el exón 2 del gen que codifica la Cx43 (*Gja1*) se encuentra flanqueado por secuencias *loxP* (Cx43^{flox} - Jackson Laboratories B6.129S7-Gja1tm1Dlg/J) ²⁸⁹. Estos ratones se mantuvieron en homocigosis (Cx43^{flox/flox}) en el bioterio del IFIBIO. El genotipo de cada animal fue corroborado según el protocolo detallado en la [sección M. 2.2.](#) La cruce de los ratones Cx43^{flox/flox} con la línea PLP-CreERT da como parte de la descendencia de la segunda generación, animales que frente a la inducción con Tx sufren la delección del exón 2 de la Cx43 en las células que expresan el promotor de PLP1, y por lo tanto en la glía envolvente olfatoria ⁵. Estos ratones fueron denominados “*knock-out* condicionales de la conexina 43” (Cx43 cKO).

Para la generación de los mismos, se realizaron en primer lugar cruzamientos de las líneas parentales (P) PLP-CreERT^{+/-} y Cx43^{flox/flox} ([Figura M.2](#)), dando lugar a la generación filial 1 (F1) con genotipos: PLP-CreERT^{+/-} ; Cx43^{flox/+} y PLP-CreERT^{-/-} ; Cx43^{flox/+}. Luego se realizaron las cruzas correspondientes para dar lugar a la segunda generación filial (F2), cruzando la línea parental Cx43^{flox/flox} con la generación F1 (F1 x P) y/o dos animales de la generación F1. Estos dos tipos de cruzas dan lugar, en distintas proporciones, a los genotipos de interés que componen al grupo con delección condicional de Cx43 en las células que expresan PLP1, de genotipo PLP-CreERT^{+/-};Cx43^{flox/flox} (Cx43 cKO), y al grupo control de la misma delección (Cx43 Ctrl) de genotipos PLP-CreERT^{+/-} ; Cx43^{+/+} y PLP-CreERT^{-/-} ; Cx43^{flox/flox}. Estas cruzas también dan lugar a ratones con genotipos que no son de interés en esta tesis, identificados en la viñeta “no utilizado” de la [Figura M.2.](#)

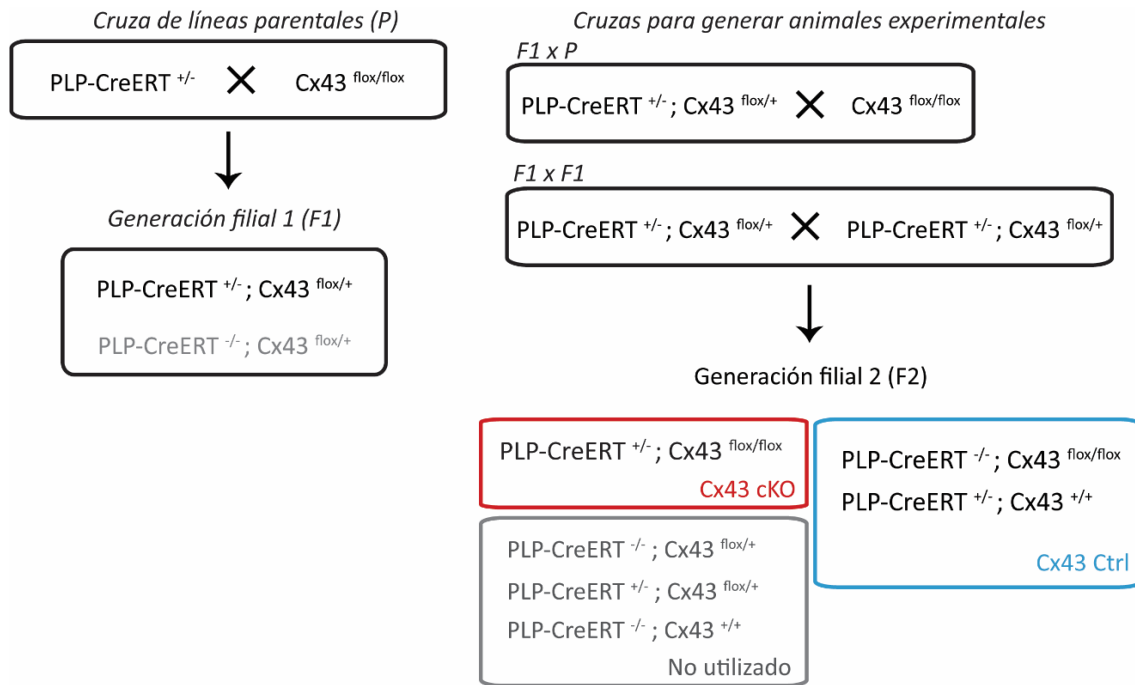


Figura M.2. Generación de ratones Cx43 cKO. Cruzas necesarias entre la línea PLP-CreERT y Cx43^{flox/flox} para obtener la generación de la filial 2 experimental: Cx43 Control (Ctrl) y Cx43 *knock-out* condicional (Cx43 cKO) y varios genotipos no utilizados.

2.1.5. Ratones LSL-tdTomato

La línea transgénica de ratones LSL-tdTomato (*ID Jackson Laboratories: B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J*²⁹⁰), es una línea reportera dependiente de la actividad de la recombinasa de Cre. Posee un transgén que codifica la proteína fluorescente roja *tdTomato*, río abajo de un codón *stop* flanqueado por secuencias *loxP*. La línea de ratones fue mantenida en homocigosis en el bioterio del IFIBIO y su genotipo, corroborado según el protocolo detallado en la [sección M.2.2](#). Cuando esta línea es cruzada con la línea de ratones que expresa la recombinasa Cre, la descendencia con ambas modificaciones genéticas expresa de manera irreversible e inducible por Tx la proteína fluorescente roja en células que también expresan PLP1.

2.2. Genotipificación

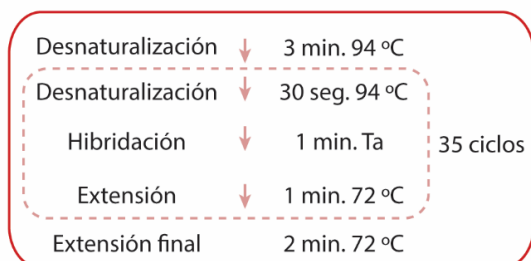
La identificación de los genotipos de las líneas de ratones utilizadas se realizó mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN genómico se obtuvo por hidrólisis alcalina de una biopsia de 2-3 mm del

extremo de la cola de cada animal. Para ello se tomó una biopsia de cada ratón, identificándolo con una marca en la oreja. Se incubó cada una de las muestras durante 1 hora en 200 μ l una solución de NaOH 50 mM a 98°C, se mezcló con *vortex*, se neutralizó cada una de las muestras con 20 μ l de una solución de Tris-HCl 1M pH 8 y se centrifugó para obtener en el sobrenadante el ADN de interés, que fue conservado a -20°C. Para identificar el genotipo de cada animal se utilizaron los *primers* indicados en la [Figura M.3 A](#), recomendados según Jackson Laboratories. Los ensayos de PCR se realizaron con una mezcla de volumen final de 12 μ l con: 1) agua de calidad molecular (Sigma W5402), 2) *buffer* de reacción GoTaq 5X llegando a una concentración final de MgCl₂ de 1,5 mM (Promega), 3) 0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs, Promega), 4) 0,5 unidades de GoTaq Polimerasa (Promega) y 5) 0,5 μ l de ADN extraído previamente. Se utilizó una termocicladora PTC-100 (MJ Research). La amplificación de ADN para identificar los transgenes se realizó mediante PCR convencional siguiendo el protocolo base detallado en la [Figura M.3 B](#), con las temperaturas de hibridación (T_a , *annealing*) acordes para cada par de *primers*. Con los productos de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE (Biodynamics) con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich E1510) y se visualizó el producto en un transiluminador de luz ultravioleta. Junto con las muestras incógnita se corrieron muestras controles de genotipos conocidos para verificar que los productos obtenidos en la reacción eran los esperados.

A

Línea	Primer	Concentración (uM)	Secuencia primer 5'-3'	Ta (°C)	Producto (pb)
PLP-CreERT	Cre Forward (1084)	0,5	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	60,7	100
PLP-CreERT	Cre Reverse (1085)	0,5	GTGAAACAGCATTGCTGCCACTT		
PLP-CreERT	Interleuquina 2 Forward (338)	0,25	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC		324
PLP-CreERT	Interleuquina 2 Reverse (339)	0,25	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT		
LSL-tdTomato	Alelo WT Forward (9020)	1,25	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	58	297
LSL-tdTomato	Alelo WT Reverse (9021)	1,25	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC		
LSL-tdTomato	Alelo Mutante Forward (9103)	0,4	GGCATTAAAGCAGCGTATCC		196
LSL-tdTomato	Alelo Mutante Reverse (9105)	0,4	CTGTTCTGTACGGCATGG		
Cx 43 flox	Conexina 43 Forward (8086)	0,4	CTTTGACTCTGATTACAGAGCTTAA	55	WT: 490
Cx 43 flox	Conexina 43 Reverse (8087)	0,4	GTCTCACTGTTACTTAACAGCTTGA		Mutante: 580

B



↓
Amplificón a gel de agarosa 2%

Figura M.3. Genotipificación de ratones. A. Tabla con las secuencias de *primers* utilizados para genotipificar distintas líneas de ratones transgénicos, su concentración de uso, temperatura de hibridación (Ta) y tamaño de producto de amplificación esperado. **B.** Protocolo de amplificación por PCR utilizado.

2.3. Tratamientos

2.3.1. Tamoxifeno

Para inducir la recombinación génica en animales de edad neonatal se realizaron inyecciones intragástricas de Tx (Sigma-Aldrich T5648) con una dosis diaria de 50 mg/kg disuelto en 10% etanol absoluto-90% aceite de girasol (Biopack ID 2000165408 y Sigma-Aldrich S5007, respectivamente). Se administró una dosis diaria desde el día posnatal 1 (P1) a P3²⁹¹. Para ello, los animales fueron anestesiados por hipotermia (protegidos con un guante de látex y expuestos 2 minutos a hielo) y se los inyectó con jeringas de 300 µl de volumen máximo con aguja incorporada de 31G y 6 mm de longitud (BD). Luego de la administración se los recuperó en una recámara calefaccionada para evitar hipotermia prolongada, hasta su devolución a la jaula de cría. Se administró Tx a todos los ratones de la camada y su genotipo fue determinado luego. Para inducir la recombinación génica en animales de edad juvenil, se administró Tx de P14 a P19, con una dosis diaria de 50 mg/kg por vía intraperitoneal⁵ y se sacrificó a los animales en P30.

2.3.2. Metimazol

El metimazol (MMZ) es una droga anti-tiroidea que produce como efecto secundario un daño en el epitelio olfatorio, seguido de la muerte de las neuronas sensoriales olfatorias. Este proceso es reversible debido a la capacidad de regeneración de las neuronas sensoriales olfatorias, luego de un periodo de hiposmia temporal ²⁹²⁻²⁹⁴ recuperándose la estructura del epitelio olfatorio luego de 30-60 días ^{292,295} y conducta olfatoria a los 30-45 días de la lesión ^{292,294,296} en el adulto. El modelo de daño inducido por metimazol ha sido bien caracterizado en cuanto a los procesos metabólicos que determinan el efecto secundario olfatotóxico de esta droga y el curso temporal de la recuperación del epitelio ²⁹⁷⁻²⁹⁹. Para la generación de un modelo de anosmia en ratones de edad neonatal se inyectó una dosis de 50 mg/kg de MMZ (Sigma-Aldrich M8506) en solución salina estéril, o vehículo, por vía intraperitoneal en ratones de edad P5 ³⁰⁰.

2.3.3. Deprivación sensorial olfatoria neonatal

El modelo de deprivación sensorial olfatoria consiste en ocluir de manera unilateral una narina del ratón. Para ello, se colocó anestesia tópica en la nariz de ratones neonatos P0-1 (xilocaína 5%*m/v* en solución fisiológica) y se anestesiaron por hipotermia. Para proceder con la oclusión unilateral irreversible, se cauterizó una narina utilizando un cauterizador oftalmológico (Bovie con punta H101). Por último, se colocó una crema antibiótica y analgésica en la zona recién tratada (Crema 6A, Labyes). Luego de la cicatrización, la oclusión de cada animal se verificó evaluando la ausencia de flujo de aire por la narina ocluida, para lo cual se colocó una pequeña gota de agua sobre la narina a examinar y se verificó que no hubiera burbujas de aire. Adicionalmente, se evaluó un marcador histoquímico de actividad del bulbo olfatorio (tirosina hidroxilasa) en cortes de bulbo ([sección M.2.7.7](#)).

2.4. Fijación por perfusión intracardiaca

Para conservar el cerebro de ratones de edad P10 en adelante se utilizó un protocolo estándar de perfusión intracardiaca con solución fijadora. Los animales fueron anestesiados por administración intraperitoneal de una solución de hidrato de cloral en solución salina (dosis de 400 mg/kg) y perfundidos por canulación aórtica con 10 ml de *buffer* fosfato salino 0,1M pH 7,4 (PBS) frío con

heparina sódica 2 UI/ml (Laboratorios Duncan) para evitar la formación de coágulos, y luego con 80 ml de solución fijadora fría conteniendo paraformaldehído (PFA - Sigma-Aldrich 441244) 4 %m/v en PBS. Los cerebros fueron disecados y post-fijados en PFA durante 2 horas a 4°C y lavados en PBS por 1 día a 4°C. Para conservar el cerebro de ratones de edad P0 a P7, los ratones fueron rápidamente decapitados, colocando la cabeza en paraformaldehído 4 %m/v en PBS durante 24 horas y luego, en PBS por 24 horas más a 4°C.

Para prepararlos para su criopreservación los cerebros se incubaron en una solución de sacarosa 30%m/v en PBS a 4°C por 24 horas, se incluyeron en medio Cryoplast (Biopack, Argentina) y se congelaron rápidamente en etanol 96% enfriado con hielo seco. El tejido congelado fue conservado a -20°C.

2.5. Electrofisiología

2.5.1. Obtención de rodajas agudas de bulbo olfatorio para registros electrofisiológicos:

Para animales de edad P14 en adelante se prepararon rodajas agudas de bulbo olfatorio según lo reportado en ³. Los ratones se anestesiaron en una cámara con isoflurano por vía inhalatoria y luego se decapitaron. Rápidamente se retiró el cerebro y se lo colocó en solución de corte fría (0-4°C) y carbogenada (95% O₂/5% CO₂) de contenido (en mM): sacarosa 220, KCl 2,5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 6, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 26 y D-glucosa 10; pH 7,4. El cerebro fue adherido de forma ventral con pegamento de cianocrilato a la platina de un vibrátomo (Pelco T series 1000, Ted Pella) conteniendo la misma solución carbogenada. Se cortaron rodajas de 300 µm de espesor, se separaron por la línea media entre los hemisferios cerebrales y se colocaron en una cámara conteniendo solución de registro (líquido cefalorraquídeo artificial carbogenado, ACSF) a 37°C (esto fue para realizar un shock térmico que brinda rodajas de mejor calidad; luego el baño térmico fue apagado para llegar a temperatura ambiente). La solución ACSF tuvo un contenido de (en mM): NaCl 125, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.1, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26 y D-glucosa 10; pH 7.4. Los experimentos fueron

realizados en rodajas a partir de 1 hora de cortadas y reposadas en solución de registro carbogenada a temperatura ambiente.

Para la preparación de rodajas de animales de P0 a P13, se procedió a la disección del cerebro del ratón e inclusión en agarosa de bajo punto de fusión (Promega) al 2% en solución ACSF a 28°C. Se esperó 4 minutos para la gelificación de la agarosa, se recortó un taco conteniendo el cerebro y se adhirió con pegamento a la platina del vibratomo exponiendo hacia arriba la parte ventral del cerebro. Este proceso se adaptó del protocolo para animales de mayor edad debido a que el bulbo olfatorio de ratones neonatales es muy pequeño y el tejido adherido al pegamento queda inutilizable. De esta manera se maximizó el número de rodajas obtenidas de bulbo olfatorio de ratones neonatos (un máximo de 4 rodajas de hemibulbos hasta P7). La preparación y conservación de las rodajas de neonatos continuó como se detalló anteriormente.

2.5.2. Registros electrofisiológicos

Las rodajas se transfirieron a una cámara de registro de acrílico (Warner Instruments) perfundida con ACSF carbogenado mediante un flujo por goteo mediante línea de infusión y una bomba de succión (aproximadamente 3 ml/min). La identificación de la zona de interés y de las células a registrar se realizó con un microscopio (Nikon Eclipse FN1) equipado con un objetivo de aire 2x y uno de inmersión en agua 40x, óptica para contraste por interferencia diferencial (DIC) y fluorescencia, y una cámara infrarroja conectada a un monitor y a la computadora. La glía envolvente fue identificada en la capa de las fibras olfatorias del bulbo, donde constituye más del 95% de las células^{49,301} por su morfología elongada y tamaño pequeño. En los registros de los animales de la línea S100B-GFP, las células se identificaron por su fluorescencia verde.

Los registros se realizaron en configuración *whole cell* en el modo *voltage-clamp*. Se utilizaron pipetas de borosilicato (1,50/1,10 mm de diámetro externo/interno, respectivamente; BF150-110-10; Sutter Instrument, Novato, CA) fabricadas con un *puller* (P-97, Sutter Instrument). La resistencia de las pipetas fue de 2-5 MΩ y se cargaron con solución intracelular de contenido (en mM): KCl 130, CaCl₂ 0,25, MgCl₂ 4, EGTA 5, HEPES 10, K₂ATP 4, Na₂GTP 0,5 y fosfocreatina 10. El pH de 7,3 de la solución intracelular se ajustó con KOH y la osmolaridad se midió con un osmómetro de presión de vapor (VAPRO 5520,

Wesco, Logan, UT); la osmolaridad de la solución intracelular y la extracelular de registro (ACSF) fue de 295-300 y 305-310 mOsm, respectivamente. A la solución de la pipeta se agregaron distintos colorantes fluorescentes o moléculas permeables por las *gap junctions* en ensayos de la evaluación del acople por colorante, según está detallado en cada experimento: 0,1% de Lucifer Yellow (LY, sal de litio, PM: 443 g/mol, Invitrogen/Molecular Probes) con emisión en 540 nm, Sulforodamina-B (SR - Sigma 230162 - 0,1% con emisión en 605 nm - PM: 606 g/mol) o Neurobiotina (Vector SP-1120-50) 0.1% (PM: 287 g/mol), para confirmar la identidad mediante la visualización de la morfología de la glía envolvente registrada en el momento por la visualización de estructuras envoltantes de paquetes axonales llamadas *lacunae*⁵ y para el estudio del tamaño de la red glial.

Los registros se realizaron usando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices). La señal de corriente fue filtrada con un filtro pasa-bajo de 1 kHz y digitalizada a una frecuencia de muestreo de 10 kHz usando una interfase Digidata 1322A (Molecular Devices); la adquisición se realizó con una computadora equipada con el *software* pClamp 10 (Molecular Devices). Se compensó la capacitancia y la resistencia en serie (al menos 60%) para minimizar los errores de voltaje. Estos parámetros se determinaron mediante la compensación de un pulso hiperpolarizante de 10 mV y 50 ms. No se substrajo la conductancia de fuga (*leak conductance*). El potencial de reposo (V_r) se registró luego de pasar al modo de corriente nula (I_0) y también se determinó a partir de una rampa de voltaje (-160 a -120 mV, en 80 ms), como el voltaje correspondiente al cero de corriente. El potencial de mantenimiento (*holding potential*) se definió en -80 mV, cercano al reposo de células gliales. Para evaluar el perfil electrofisiológico, se aplicó una serie de pulsos de voltaje de 400 ms de duración, desde -160 mV hasta +120 mV, con incrementos de 20 mV.

Para cada célula se realizó una grabación de video de la fluorescencia emitida por el colorante usado luego de 15 minutos de registro estable, con el programa Windows Movie Maker, para estimar el tamaño de la red glial asociada a la célula de registro.

El ácido meclofenámico (MFA, Sigma-Aldrich M4531), un bloqueante no selectivo de *gap junctions* se diluyó en ACSF a una concentración 100 μ M a partir

de una solución stock 25 mM en agua y se aplicó mediante el sistema de perfusión. Se registró cada 5 minutos y se consideró para el análisis el punto de 20-25 minutos después del inicio de la perfusión con MFA.

Las rodajas usadas en experimentos de acople por colorante fueron fijadas *overnight* en PFA 4% en PBS y luego lavadas con PBS antes del proceso de revelado.

2.5.3. Análisis de registros electrofisiológicos:

Todos los registros se analizaron utilizando el software ClampFit (Molecular Devices).

- Determinación de la resistencia de acceso (R_a): La R_a es una medida de la calidad de los registros y representa la resistencia al paso de corriente desde la pipeta hacia el interior celular. Se calculó a partir del pico transitorio capacitivo en la corriente evocada por un pulso de voltaje hiperpolarizante de 10 mV y 50 ms, promediando 5 repeticiones y en ausencia de compensación, según la ley de Ohm $V/I=R_a$. Cuanto mayor es la R_a más deficiente es el acceso a la célula.
- Determinación de la resistencia de entrada, *Input resistance* (R_i): Se midió la amplitud de la corriente evocada por un pulso hiperpolarizante (-20 mV y 400 ms) en el estado estacionario y se calculó a partir de la ley de Ohm ($V/I= R_i$), para un registro con compensación de la resistencia en serie.
- Construcción de la curva Corriente/Voltaje (I/V): Las amplitudes de corriente evocadas por la serie de pulsos de voltaje se midieron en el estado estacionario (400 ms) y se graficaron en función del voltaje del pulso.
- Conductancia total (G): Para la curva I/V de cada célula se ajustó una función lineal y se calculó su pendiente. El dato de la pendiente se tomó como conductancia total expresada en nanosiemens (nS).
- Corriente sensible al tratamiento con MFA: Se calculó como la resta trazo por trazo de la corriente registrada en condición control (ACSF), menos la corriente registrada en presencia de MFA.

Criterios de exclusión de registros: se excluyeron del análisis los registros y los experimentos de *dye-coupling* con una R_a mayor a 30 M Ω , aquellos en los

que el valor de la Ra varió más del 20% durante el registro (para garantizar que la potencial reducción de corriente observada durante la incubación con MFA no se debiera a variaciones en el acceso a la célula) y los registros de células con $V_r > -55$ mV.

2.6. Inmunofluorescencia

Para realizar ensayos de inmunohistoquímica se cortaron secciones coronales de 30 μm de espesor para el bulbo olfatorio (Thermo Scientific) a -20°C . Las secciones de bulbo olfatorio se montaron en portaobjetos gelatinizados con una solución de gelatina (Sigma-Aldrich G2625) 1% y 0,05% de sulfato de cromo y potasio $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ en agua. En el caso de los tejidos colectados de animales de edad neonatal, se realizaron cortes coronales de la cabeza, de 30 μm , conteniendo bulbo y nariz en un mismo corte. Las secciones montadas se conservaron a -20°C .

El protocolo estándar utilizado para inmunofluorescencia comenzó con un secado de los cortes en una placa térmica a 60°C por 15 minutos y se definió con silicona un pocillo de incubación alrededor de cada sección, con capacidad para 45 μl de solución. Los cortes se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y se bloquearon los sitios de pegado inespecífico incubando por 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de bloqueo conteniendo seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich A3059, A8022 ó A9647) al 2% en buffer PBS con triton-X100 (PBST - Anedra) 0.3 %v/v. Luego los cortes se incubaron *overnight* a 4°C con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo, a excepción de los anticuerpos de Cx43 y Cx30 (2 días de incubación). Se lavó 3 veces por 5 minutos con PBST 0,3% y luego se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios y DAPI (Sigma-Aldrich D9564) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para marcación de núcleos, en solución de bloqueo. Se lavó 3 veces por 5 minutos con PBST 0,3% y 10 minutos con PBS y se cubrió con cubreobjetos y medio de montaje Fluoro-Gel (Electron Microscopy Sciences). En todos los casos se agregó un control omitiendo los anticuerpos primarios, para validar la observación de la marca de interés, específica del anticuerpo primario, como aquella ausente en dicho control.

Para la inmunodetección de Cx47 se aplicó un tratamiento de permeabilización previo al bloqueo e incubación con el anticuerpo primario mediante la incubación con PBST 1% durante 1 hora.

Para el revelado del contenido de neurobiotina en células registradas de rodajas agudas de bulbo olfatorio, en primer lugar, se lavaron las rodajas durante 10 minutos con PBS para remover el PFA. Luego fueron incubadas por 2hs con una solución de estreptoavidina-CY3 1:1000 y DAPI 1 µg/ml para marcación de núcleos en PBS, lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS y finalmente montadas con Fluoro-Gel entre dos cubreobjetos.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, estreptoavidina, y sus especificaciones se detallan en la [Tabla M.1](#):

Marcación	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Conexina 43 (Cx43)	<i>Mouse anti-Cx43 IgG1</i> (Millipore MAB3068), 1:500	<i>Goat anti-mouse IgG1 Alexa</i> Fluor 555 (ThermoFisher Scientific A-21127), 1:1000
	<i>Rabbit anti-Cx43</i> (Zymed 71-0700), 1:500	<i>Goat anti-rabbit IgG CY3</i> (Jackson Immunoresearch 111- 165-144), 1:1000
Conexina 30 (Cx30)	<i>Rabbit anti-Cx30</i> (Invitrogen 71-2200), 1:1000	<i>Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor</i> 555 (ThermoFisher Scientific A- 27039), 1:1000
Conexina 47 (Cx47)	<i>Rabbit anti-Cx47</i> (Zymed 36-4700), 1:125	<i>Goat anti-rabbit IgG CY3</i> (Jackson Immunoresearch 111- 165-144), 1:1000
Conexina 29 (Cx29)	<i>Rabbit anti-Cx29</i> (Zymed 34-4200), 1:200	<i>Goat anti-rabbit IgG CY3</i> (Jackson Immunoresearch 111- 165-144), 1:1000
Tirosina hidroxilasa (TH)	<i>Rabbit anti-TH</i> (Millipore AB152), 1:1000	<i>Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor</i> 488 (ThermoFisher Scientific A- 11034), 1:1000

Marcación	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
<i>Brain lipid binding protein</i> (BLBP)	<i>Rabbit</i> anti-BLBP (Millipore ABN14), 1:2000	<i>Goat anti-rabbit</i> IgG Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific A-11034), 1:1000
<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (GFAP)	<i>Mouse</i> anti-GFAP (Sigma-Aldrich G3893), 1:1000	<i>Goat anti-mouse</i> IgG1 Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific A-21121), 1:1000
Transportador vesicular de glutamato 2 (VGlut2)	<i>Rabbit</i> anti-VGlut2 (Synaptic Systems 135404), 1:200	<i>Goat anti-mouse</i> IgG1 Alexa Fluor 555 (ThermoFisher Scientific A-21127), 1:1000
Proteína fluorescente verde (GFP)	<i>Chicken</i> anti-GFP (Aves Labs GFP-1010), 1:2000	<i>Goat anti-chicken</i> IgY Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific A-11039), 1:1000
S100B	<i>Mouse</i> anti-S100B (Sigma-Aldrich S2532), 1:2000	<i>Goat anti-mouse</i> IgG1 Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific A-21121), 1:1000
Neurobiotina (NB)	Estreptoavidina-CY3 (Jackson Immunoresearch 016-160-084), 1:1000	-

Tabla M.1. Anticuerpos primarios y secundarios, y estreptoavidina, utilizados para microscopía de fluorescencia.

Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio confocal Olympus FV1000/IX81, utilizando un objetivo de inmersión en aceite (40x y apertura numérica 1,3), como secciones ópticas únicas para todas las inmunofluorescencias a aproximadamente 10 μm desde la superficie del tejido, y en *stack* para el revelado de neurobiotina en las redes gliales de rodajas fijadas (secciones de 2 μm cada una hasta cubrir todo el volumen ocupado por la red). Las fotos que se incluyeron en un mismo análisis se tomaron con los mismos parámetros de detección. Todas las imágenes se adquirieron a ciegas del tratamiento. Adicionalmente se utilizó el microscopio de platina automática especial para análisis estereológico de tejido, NeuroLucida (MBF Bioscience), y

se utilizó un objetivo de aire (20x) para tomar fotos del bulbo completo con una resolución de 2048 x 2048 *pixels*.

2.7. Análisis de imágenes

El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ ³⁰². En todos los casos la cuantificación de las imágenes se realizó a ciegas del tratamiento.

2.7.1. Análisis de la inmunorreactividad contra VGlut2:

Se analizó el perfil de expresión de VGlut2 en el eje medio-lateral del bulbo olfatorio, en las capas glomerular y de fibras olfatorias. Para ello se generaron regiones de interés rectangulares con su eje mayor perpendicular a la superficie del bulbo y su eje menor de 15 μm de ancho. Utilizando esa región de interés y sobre el canal de VGlut2 se utilizó la herramienta “*Plot Profile*” para medir el perfil de intensidad de fluorescencia a lo largo del eje medio-lateral del bulbo. Para cada foto analizada, se promediaron los perfiles de expresión de 3 regiones de interés determinadas al azar. Lo mismo se hizo entre fotos para cada animal.

2.7.2. Análisis de la inmunorreactividad contra conexinas con método manual:

Capa de las fibras olfatorias: Por cada imagen se generaron al azar 3 regiones rectangulares de interés, de 15 μm de ancho (dimensión menor y paralela a las láminas del bulbo) y de largo suficiente para cubrir el espesor de la capa desde el límite interno (adyacente a la capa glomerular) hacia el límite externo (superficie del bulbo) de la capa de las fibras olfatorias, donde se localiza la glía envolvente. Dado que la inmunomarca contra las Cx evaluadas es puntiforme, se cuantificó la densidad de partículas (*clusters*) de Cx en cada región. Para ello, se aplicó el algoritmo *triangle* ³⁰³, calculado automáticamente por el software ImageJ para convertir al canal correspondiente a la inmunomarca de Cx en una imagen binaria. Sobre esta imagen y dentro de cada región de interés, se contabilizó el número de *clusters* de Cx de forma manual, y se calculó la densidad de *clusters* cada 100 μm^2 .

Capa glomerular: Se detectaron como regiones de interés todos los neuropilos cuya sección transversal estuviera completa dentro de la imagen

analizada sin considerar los núcleos de células periglomerulares. Se realizó la cuantificación manual de *clusters* de Cx de la misma manera que para la capa de fibras olfatorias.

2.7.3. Análisis de la inmunoreactividad contra conexinas con método automático:

En el caso de la cuantificación de la expresión de Cx43 en contexto de privación sensorial se agregó un análisis no sesgado y automático sin la aplicación de umbrales de detección. Para la capa de las fibras olfatorias, por cada imagen se determinó una región de interés para toda la superficie de la capa de fibras olfatorias. En el canal correspondiente a la Cx43, se calculó un histograma de intensidades de fluorescencia por *pixel* (intensidad de fluorescencia de 0 a 255 Unidades Arbitrarias, U.A.), dentro de la región delimitada, utilizando la herramienta *Histogram* del *software* ImageJ. Para el análisis de la expresión de Cx43 en la capa glomerular, se designaron regiones del mismo modo que para el método manual y se calculó el histograma de intensidades de fluorescencia de *pixels*.

A partir del histograma de cada región de interés, se calculó el histograma normalizado al total de *pixels* y el histograma acumulado normalizado al total de *pixels*, del cual se extrajo el parámetro de Intensidad mediana (I_{50}).

2.7.4. Análisis de marcadores de células de la glía envolvente

Para el análisis de imágenes de marcadores de glía envolvente (BLBP, GFAP y S100B) en tejido de animales PLP-CreERT;tdTomato se seleccionaron manualmente los núcleos (marcados con DAPI) con un área de al menos $10 \mu\text{m}^2$ y sobre cada núcleo se crearon regiones de interés de $4 \mu\text{m}^2$ con la herramienta "*multipoint selection*" y "*generate selection*", en las distintas capas del bulbo. Se midió la intensidad promedio de fluorescencia para tdTom en estas regiones de interés y se generó un histograma de intensidad de todas ellas, que mostró una distribución bimodal que permitió establecer como criterio para distinguir las células tdTom+ de las tdTom-, al valor de fluorescencia correspondiente al valle de la distribución ([Figura M.4](#)). Se consideraron los distintos marcadores gliales de la siguiente forma: Para el marcador BLBP se consideró positiva la marca cuya intensidad media fue mayor que la intensidad promedio medida para al menos 20 células sin marca de BLBP (tomadas del control negativo sin

anticuerpo primario), sumada a 2 veces el desvío estándar (DE). Se consideró que una célula expresaba GFAP cuando presentó un claro anillo perinuclear y procesos emergentes con marca.

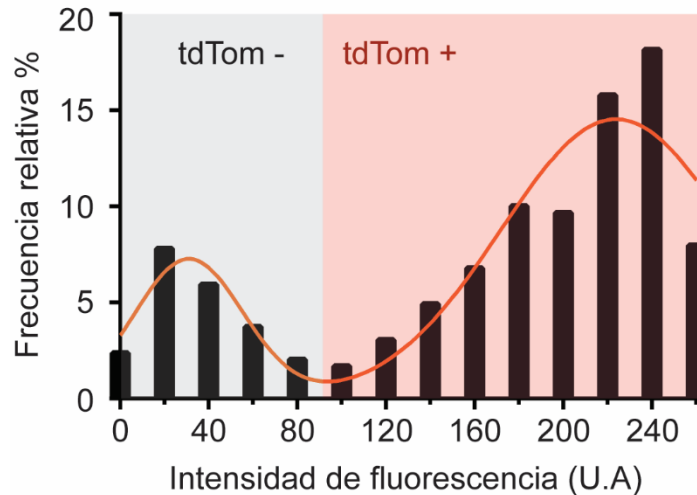


Figura M.4. Histograma de frecuencia relativa de la intensidad de fluorescencia reportada con la proteína tdTomato en células de la capa de fibras olfatorias de animales PLP-CreERT;tdTomato. Se muestra la curva doble gaussiana ajustada para esta distribución, cuyo valle determina el umbral a partir del cual se define si las células son tdTom - o tdTom +.

2.7.5. Análisis de la co-localización de la inmunomarca de conexinas con marcadores de la glía envolvente

Se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia para la Cx de interés a partir de cortes de bulbo olfatorio de animales S100B-GFP que marcan la glía envolvente olfatoria. Utilizando el programa ImageJ, sobre la imagen del canal de GFP se utilizó la herramienta “Auto threshold” y se aplicó el umbral “Moments” para obtener el valor de umbral para la marca en este canal. El mismo procedimiento se realizó sobre el canal de Cx con el umbral “Huang”. Ambos valores de umbral se utilizaron como información de entrada para el *plug-in* “Colocalization” el cual toma las imágenes de cada canal, aplica los umbrales asignados y entrega una imagen binaria indicando los *pixels* co-localizados entre ambas imágenes. Sobre la imagen de co-localización se calculó un histograma de intensidades, obteniendo el número de *pixels* totales de co-localización. Con este valor y los correspondientes a los de *pixels* asignados a GFP y Cx, se calcularon los índices de área de co-localización sobre el área GFP+, y del área de co-localización sobre el área de Cx.

2.7.6. Cuantificación del tamaño glomerular

A partir de las imágenes obtenidas con marcación nuclear (DAPI) de la capa glomerular del bulbo olfatorio, se midió el área de regiones de interés para glomérulos con sección transversal completa dentro de la imagen. Se excluyeron de la región delimitada los núcleos de células periglomerulares, considerando únicamente el área correspondiente al neuropilo.

2.7.7. Análisis de la inmunoreactividad contra TH en el bulbo olfatorio

El análisis de la expresión de TH en la capa glomerular del bulbo olfatorio incluyó 3 parámetros, la densidad de células TH+, la intensidad media de marca de TH en el neuropilo, y el grado de cobertura de las proyecciones de TH sobre el área de la sección transversal del neuropilo.

Para ello se determinaron las regiones de interés correspondientes a los glomérulos, sin incluir los núcleos de células periglomerulares utilizando el canal de marca nuclear. En el canal correspondiente a TH se midió la intensidad media de fluorescencia para los neuropilos y se contabilizaron las células con expresión de TH (identificadas como cuerpos celulares gracias a la marca nuclear).

Para la cuantificación de la cobertura de la marca de TH sobre el área de la sección glomerular, se aplicó sobre el canal correspondiente a TH, el algoritmo *Moments* para definir un umbral de intensidad automático calculado por el software ImageJ, para obtener una imagen binaria. En las regiones de interés de los neuropilos y sobre esta imagen binarizada, se calculó el histograma de intensidades, identificando los *pixels* con 0 U.A de intensidad (TH negativos) y 255 U.A. de intensidad (TH positivos). La cobertura de TH se calculó con el cociente presentado a continuación para cada neuropilo:

$$\frac{\textit{pixels TH positivos}}{(\textit{pixels TH positivos}) + (\textit{pixels TH negativos})}$$

2.7.8. Análisis de plasticidad estructural de glía en animales con deprivación sensorial

Para el análisis de la respuesta de la población glial a la deprivación sensorial se utilizaron animales S100B-GFP y animales PLP-CreERT;tdTomato. Se determinó la densidad de células totales, GFP+ o tdTomato+. Para ello, se

cuantificó de manera manual el total de núcleos y células positivas para cada reportero en las capas glomerular y de fibras olfatorias y se relativizó la cantidad de células al área correspondiente a estas capas. Las células se consideraron positivas usando los criterios definidos en la sección [M.2.7.4](#). Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia de los marcadores GFP y tdTomato para la capa de fibras olfatorias y para los neuropilos de la capa glomerular, delimitados como en la sección [M.2.7.6](#). Se cuantificó el grado de cobertura de GFP y de tdTomato en la capa de fibras olfatorias y glomerular. Para ello, se aplicó sobre el canal correspondiente a GFP el algoritmo *Li* y para tdTomato el algoritmo *Huang*, ambos calculados automáticamente por el software ImageJ para obtener una imagen binaria. A partir de la imagen resultante se determinó el grado de cobertura de las proyecciones de células GFP+ y tdTom+ como fue detallado en la sección [M.2.7.7](#).

Para delimitar la capa de fibras olfatorias se utilizó como referencia la fluorescencia endógena de cada línea y la marca nuclear. Con los límites de la capa de fibras determinados se extrajeron los valores de grosor promedio de esta capa en cada bulbo (control y deprivado), para cada animal. Adicionalmente, utilizando la marcación nuclear con DAPI, se cuantificaron las células de toda la capa, para obtener el dato de densidad celular. Para el análisis del tamaño glomerular, se utilizó la marcación nuclear con DAPI para delimitar los neuropilos glomerulares y se cuantificó el área de todos los glomérulos con sección transversal completa incluidos en la imagen.

2.7.9. Cuantificación del tamaño de redes gliales:

a. Videos obtenidos en el puesto de registro:

A partir de videos obtenidos de las redes gliales en el puesto de registro, se cuantificó su tamaño contando el número de células totales con fluorescencia de Sulforodamina-B o Lucifer Yellow. Para ello se convirtieron los videos a imágenes utilizando el programa Virtual Dub (decimados cada 20 cuadros) y se seleccionaron las imágenes con la célula registrada en el centro del campo visual y dos imágenes con cambio de foco adyacentes. Se consideraron células con fluorescencia aquellas estructuras compatibles con somas celulares de glía envolvente (forma oval y tamaño cercano a 10 μm de diámetro). Únicamente

fueron consideradas células que cumplieron los criterios de calidad de registro detallados en la sección [M.2.5.3](#).

b. Imágenes obtenidas con microscopía confocal:

Se utilizó un protocolo de acople por colorante mediante la utilización de la molécula neurobiotina en la pipeta de registro. Esta tiene un tamaño pequeño, permea por las *gap junctions* y es susceptible de ser fijada dentro de las células, pero no posee fluorescencia intrínseca, por lo que debe ser revelada con estreptoavidina unida a un fluoróforo (ver [Tabla M.1](#)). En cada registro en el cual se incorporó neurobiotina en la pipeta también se utilizó Lucifer Yellow para la visualización del acople por colorante durante el registro y para facilitar la identificación de la célula registrada en la rodaja fijada. Las imágenes obtenidas con microscopía confocal fueron tomadas de manera de incluir la totalidad de la red en el eje Z, y ubicando a la célula registrada en el centro del campo del microscopio, con secciones ópticas tomadas cada 2 μm . A partir de estas imágenes, se seleccionó a cada núcleo en la sección óptica en la que se encontraba mejor representado (por observación de marcación con DAPI) dentro de un área de 150 μm de diámetro alrededor de la célula registrada, cubriendo todas las secciones ópticas, y se midió la intensidad de fluorescencia roja asociada a la marca de neurobiotina ([Figura M.5 A](#)). Para definir un umbral que permitiera determinar si una célula era NB+ o NB-, se calculó el promedio de la intensidad de fluorescencia de neurobiotina de 20 células adyacentes al área de análisis de cada experimento de acople. A partir de las coordenadas en X, Y, Z de cada célula, considerando el origen en la posición de la célula registrada, se obtuvo la distancia esta utilizando la siguiente ecuación: Distancia a la célula = $\sqrt{(X^2 + Y^2 + Z^2)}$; luego se construyeron gráficos de intensidad de fluorescencia de las células de la red en función de la distancia a la célula registrada, para cada red ([Figura M. 5 B](#)). Un método adicional de análisis utilizó todas las células identificadas en el radio de 150 μm . Se construyeron histogramas de frecuencia absoluta y de frecuencia acumulada para las intensidades de neurobiotina de todas las células identificadas en la imagen correspondiente ([Figuras M. 5 C y D](#)). Se utilizó la mediana de cada histograma de frecuencia acumulada para el análisis estadístico.

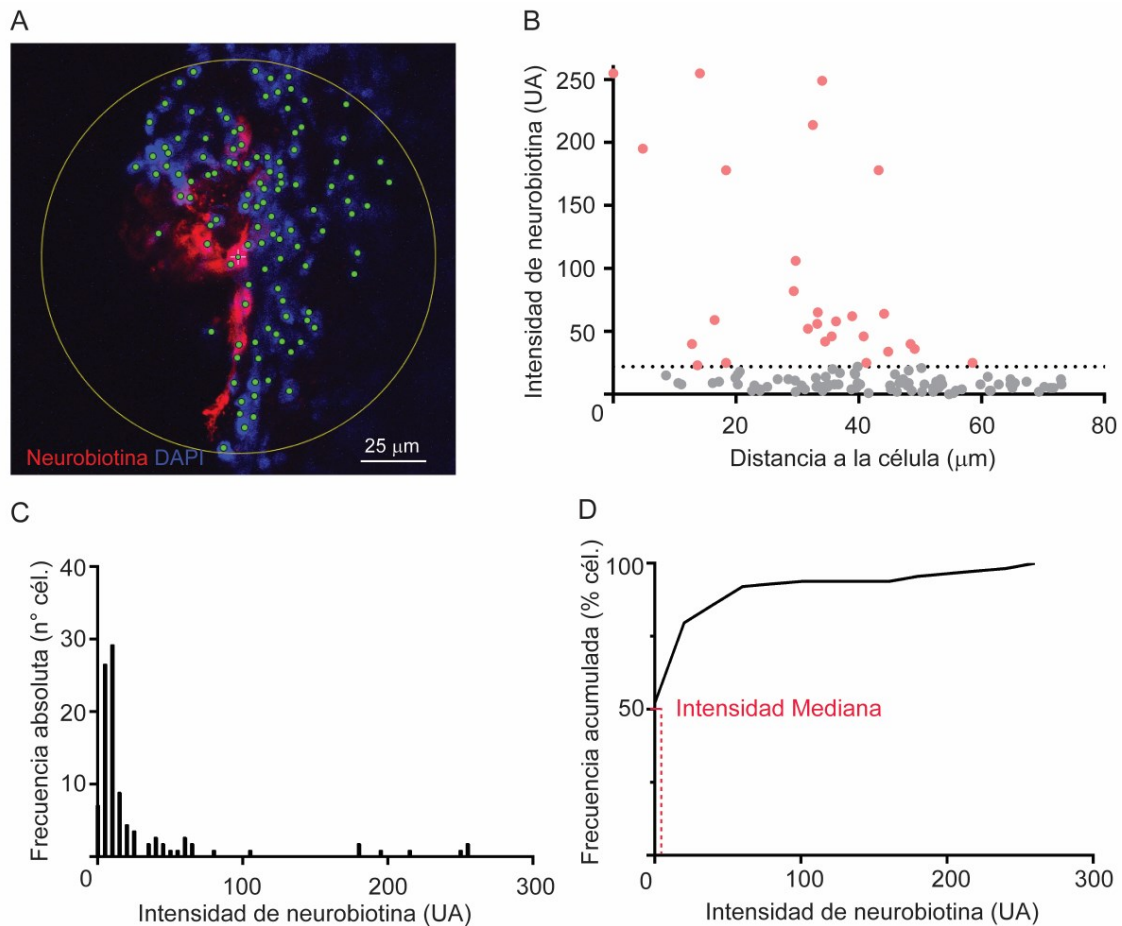


Figura M. 5. Procedimiento utilizado para el análisis del tamaño de una red glial a partir de experimentos de acople por colorante con neurobiotina **A.** Imagen representativa tomada con un microscopio confocal de una red glial de la capa de fibras olfatorias de una rodaja de bulbo olfatorio (proyección máxima de 6 secciones ópticas tomadas cada 3 μm). Se observa la marcación nuclear en azul (DAPI) y la marcación de neurobiotina en rojo (CY3). Además, se muestra el área analizada (círculo amarillo) centrada en la célula inyectada con neurobiotina. Con puntos verdes se indican las células analizadas. **B.** Se muestra la relación entre la distancia de cada célula analizada relativa a la célula registrada y la intensidad de marca de NB, reconstruido a partir de la imagen representativa. Cada célula está representada por un punto. Las células consideradas NB+ se indican en rosa, mientras que las que tienen valores de intensidad que corresponden al *background* se indican en gris (umbral: 22 U.A.). **C.** Histograma de frecuencia absoluta de valores de intensidad de neurobiotina para la población de células identificada. **D.** Histograma de frecuencia acumulada normalizada para la misma población mostrada en C. Se muestra en rojo la mediana de la intensidad que corresponde a esta red glial.

2.8. Ensayos conductuales

2.8.1. Registro de vocalizaciones ultrasónicas

Para evaluar la conducta olfativa de animales de edad neonatal (P4-12) se optimizó un ensayo de detección de las vocalizaciones ultrasónicas de

ratones neonatos inducidas por alejamiento del nido (ratones parentales e individuos de la misma camada). Este protocolo fue descrito previamente³⁰⁴ y permite estudiar la capacidad olfativa de ratones frente a olores aversivos (lecho usado por machos extraños o citral) que silencian las vocalizaciones ultrasónicas.

A partir de este trabajo desarrollamos en nuestro laboratorio una adaptación del *set-up* para realizar el ensayo. Para ello se colocaron ratones neonatos en una cámara insonorizada con ventilación forzada y con un micrófono para el rango de ultrasonido de 40 a 120 kHz (BatBox) conectado a una computadora con el programa de registro BatScan (Baton) y una plataforma para la presentación de distintos olores ([Figura M.6A](#)). El protocolo constó de la presentación de un olor neutro durante 90 segundos, seguido de un cambio de estímulo con la presentación de un segundo olor “prueba” durante 150 segundos, que podía ser nuevamente el olor neutro o un olor experimental ([Figura M.6B](#)). Cada ratón pasó por 4 ensayos en total, dos con estímulo neutro espaciados entre sí por 5 minutos y dos con olor de prueba experimental también espaciados por 5 minutos ([Figura M.6B](#)). El orden en que sucedieron estos pares de ensayos fue aleatorio y el intervalo fue de 1 hora. La sustancia neutra fue agua, el olor experimental fue citral de alta pureza (Sigma-Aldrich W230316-SAMPLE-K) al 10% en aceite mineral (ThermoFisher, E10159) como solvente.

En detalle, se procedió de la siguiente manera: La cámara insonorizada se ubicó en una habitación con puerta. Cada jaula contenía una camada de ratones neonatos (entre 4 y 10 ratones) y 3 ratones parentales (dos hembras y un macho). Se comenzó limpiando la cámara insonorizada y la plataforma con etanol 10% en agua. Se ubicó un hisopo con 20 μ l de agua en la plataforma dentro de la cámara. Se extrajo a un ratón neonato de su jaula, se lo ubicó en una grilla transportable y se dio inicio al programa de registro de las vocalizaciones. Rápidamente se trasladó al ratón dentro de la cámara insonorizada, se colocó la grilla a 10 cm de distancia del micrófono y sobre la plataforma para la presentación de olores, y se cerró la puerta de la cámara dando por iniciado el tiempo de evaluación de las vocalizaciones (este tiempo se encuentra señalizado en el registro por un artefacto sonoro característico del cierre de la puerta). Una vez cumplido el tiempo de exposición del olor control se

abrió la puerta de la cámara, se extrajo el hisopo con agua y se colocó un nuevo hisopo embebido con 20 μ l del olor “prueba” (o control de agua) y se cerró la puerta de la cámara. Una vez cumplidos 4 minutos del ensayo se detuvo el registro de vocalizaciones, se identificó al ratón con un número en el abdomen escrito con un marcador para piel (Securline) y se repuso al ratón en su jaula de origen. Antes de comenzar un nuevo ensayo se limpiaron con etanol 10% la cámara, la grilla transportable y la plataforma. En caso de utilizar como olor de prueba citral se desecharon el hisopo y papel para limpiar en un lugar fuera del cuarto de conducta y de la sala de espera de las jaulas experimentales, debido a que los olores son intensos. Luego de la limpieza, se dejó ventilar 5 minutos antes de comenzar un nuevo ensayo.

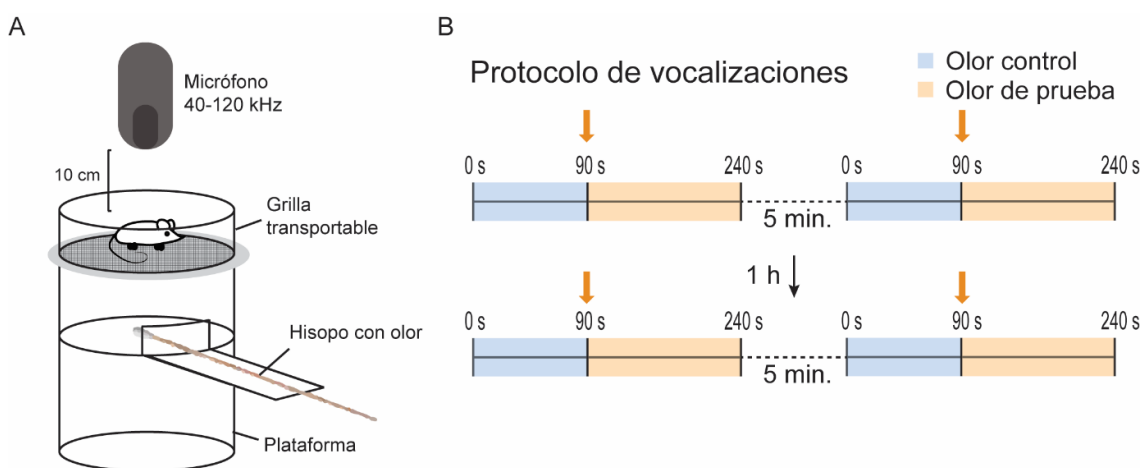


Figura M. 6. Prueba conductual para evaluar capacidad olfativa. **A.** Ilustración de la cámara de prueba diseñada para el registro de vocalizaciones en ultrasonido de ratones neonatos. **B.** Protocolo utilizado para el registro de vocalizaciones frente a la presentación de olores. Constó de 4 ensayos en total, dos con presentación de olor control por 90s seguido de olor control por 150s, y dos con olor control por 90s seguido de olor experimental por 150s. Las presentaciones del mismo tipo están separadas por una estadía de 5 minutos en la jaula de procedencia, y las de distinto tipo están separadas por 1 hora en dicha jaula.

2.8.2. Análisis de vocalizaciones ultrasónicas

Los registros de vocalizaciones (espectrogramas) generados por el programa BatScan ([Figura M.7A](#)) se exportaron en formato de imagen monocromática (.jpg) cubriendo ventanas de 20s de duración que luego se concatenaron cubriendo la duración total del registro (0 a 260s). Cada una de las imágenes fue invertida utilizando la herramienta “invert” del programa ImageJ y sobre éstas se aplicó un *macro* diseñado por Carlos Pretell-Annan (becario

doctoral del laboratorio colaborador dirigido por J. Belforte) para la detección de vocalizaciones en ultrasonido de animales adultos, adaptado para los registros de neonatos (ver sección [VII. Anexo](#)). El *macro* permite calcular la intensidad promedio en escala de grises (0-255 U.A.) a lo largo de la imagen, en cinco bandas frecuenciales registradas en función del tiempo: 95-105 kHz, 85-95 kHz, 75-85 kHz, 65-75 kHz y 55-65 kHz ([Figura M.7B](#)). A partir de las bandas de análisis se extrajo el registro de intensidad en escala de grises en función del tiempo. La banda de 80 kHz se utilizó para el análisis, de acuerdo a lo ya reportado ³⁰⁴ ([Figura M.7C](#)). Los perfiles de intensidad fueron alineados al momento de presentación del estímulo a los 90 segundos, y se utilizó la herramienta “*event detection*” del programa Clampfit 10.5 (Axon Instruments) para determinar los eventos considerados vocalizaciones, utilizando como criterio un umbral de detección de intensidad en la escala de grises de 160 U.A (equivalente a 25 dB). ([Figura M.7C](#)).

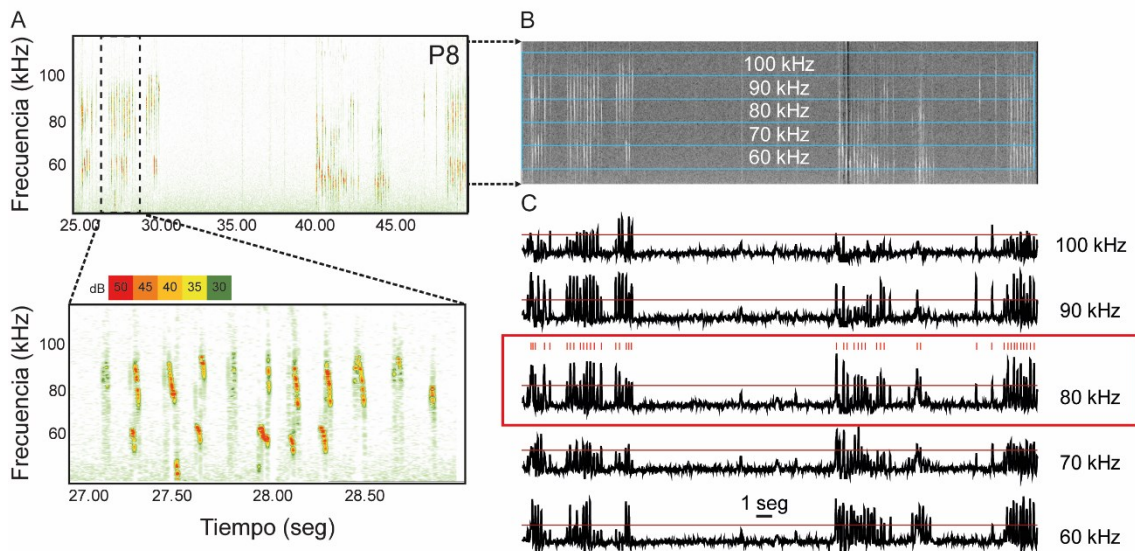


Figura M.7. Registro de vocalizaciones ultrasónicas de ratones neonatos. A. Registro representativo de vocalizaciones en la escala de frecuencias del ultrasonido (60-100 kHz) para un ratón de 8 días de edad (P8), obtenido mediante el programa BatScan. La intensidad de volumen en decibeles (dB) de la vocalización se indica con la escala de color indicada. En la parte inferior se muestra una ampliación de 2 segundos del registro superior, donde se ve el detalle de las vocalizaciones. **B.** A partir del registro en A. se convirtió la imagen a una escala de grises, donde negro es el valor de menor volumen, y blanco de mayor volumen (0-255 U.A.). Con un macro creado en el programa ImageJ, se extrajeron los valores de intensidad a partir de 5 bandas de análisis, cubriendo el rango de 60 a 100 kHz. **C.** A partir de las bandas de análisis se extrajo el registro de intensidad en escala de grises en función del tiempo. Se señalan en rojo los eventos considerados para el análisis, utilizando un umbral de 160 U.A.

Para cada animal, se cuantificó el número de vocalizaciones en ventanas de 30 segundos, desde el comienzo del registro. Se promedió para cada ventana el número de vocalizaciones emitidas en el primer y segundo registro del mismo tipo (separados por 5 minutos). Para el análisis de la respuesta a los estímulos, se utilizaron las ventanas de 30 segundos inmediatamente anterior y posterior al cambio de estímulo. Éstas mismas se utilizaron para el cálculo del índice de respuesta definido como:

$$\text{Índice respuesta} = \frac{N^{\circ} \text{ vocalizaciones post cambio estímulo}}{N^{\circ} \text{ vocalizaciones pre cambio estímulo}}$$

2.9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se detallan en los epígrafes de las figuras y se realizaron con el programa Graphpad Prism 6. En los casos en que se usaron análisis paramétricos primero se verificó que los datos cumplieran los criterios de normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y homocedacia (Test de Levene). Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$, y en todos los casos se muestra media \pm error estándar (EE), salvo que se indique lo contrario. Los tests paramétricos utilizados fueron: test de Student, ANOVA de dos vías y tests post-hoc de Tukey. Los tests no paramétricos fueron: test de Mann-Whitney y ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal-Wallis).

Para poder analizar los datos obtenidos en el modelo de privación sensorial, contamos con la colaboración de Diego Topsakalian, miembro del grupo y la Dra. Gilda Garibotti, de la Universidad Nacional del Comahue. Se utilizó un modelo no-lineal de efectos mixtos³⁰⁵, dado que nos permitía analizar la interacción entre el tratamiento (bulbo del lado control o privado) y la edad del animal o tiempo de privación sensorial (Semana), considerando que cada animal aporta varios datos para el bulbo control y privado. El animal se introdujo como un factor aleatorio, mientras que el lado (control o privado) y la semana de edad fueron factores fijos. El código del modelo mixto es el siguiente³⁰⁶:

```
m1<-lme(Intensidad ~Lado*Semana, random=list(~Lado|Animal), bd).
```

En este caso se analizó la variable intensidad de inmunofluorescencia en imágenes. Se utilizó un análisis de los residuales de la población para confirmar que se cumplía con los supuestos de normalidad y homocedacia, para luego aplicar un análisis de ANOVA de dos vías. En caso de no poder demostrar normalidad en los residuales de los datos, se optó por transformar la variable con funciones logaritmo, y se realizaron los análisis sobre estas variables.

IV. RESULTADOS

3.1. Capítulo 1: Propiedades electrofisiológicas y expresión de conexinas en las células de glía envolvente durante el desarrollo posnatal como indicadores de conectividad glial

Como se detalló en la [Introducción](#) de la presente tesis, las neuronas sensoriales olfatorias proyectan sus axones desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo olfatorio en el sistema nervioso central con un orden topográfico, lo que establece un mapa sensorial, tal que las neuronas que comparten especificidad sensorial convergen en uno o dos glomérulos del bulbo olfatorio. El mapa sensorial maduro se obtiene mediante un proceso de refinamiento posnatal del circuito que es dependiente de la experiencia sensorial.

Las células de glía envolvente olfatoria que acompañan a los axones de las neuronas sensoriales establecen redes conectadas por *gap junctions*, utilizando a la Cx43 como molécula clave para la formación de estos canales desde la etapa juvenil (P21). Además, muestran perfiles electrofisiológicos diversos, tal que las células con mayor conectividad tienen perfiles de corriente en función del voltaje lineales, mientras que las de conectividad acotada tienen predominantemente perfiles no lineales. Para investigar si las redes de glía envolvente maduran en paralelo con la maduración del mapa sensorial, en este capítulo abordamos la pregunta de si la glía envolvente sufre un proceso de refinamiento o maduración del grado de conectividad, de su perfil electrofisiológico y de la expresión de Cx durante el desarrollo posnatal.

3.1.1. S100B como marcador para distinguir las capas externas del bulbo olfatorio de ratones de edades posnatales tempranas

En trabajos anteriores donde se estudió el perfil electrofisiológico de la glía envolvente y su conectividad en ratones juveniles ³ se empleó a la línea transgénica de ratones S100B-GFP para identificar a estas células, aprovechando que las células de la glía envolvente expresan S100B, lo cual hace que en esta línea expresen GFP, que se distribuye hacia sus cuerpos celulares y proyecciones. En la capa de fibras olfatorias, la glía envolvente se encuentra

especialmente enriquecida, frente a los astrocitos que también expresan S100B, lo que determina que la amplia mayoría de las células identificadas mediante esta estrategia sean efectivamente glía envolvente ²⁸⁵.

Dados estos antecedentes y que S100B es expresado por la glía envolvente durante el desarrollo posnatal ³⁰⁷, quisimos verificar que el patrón de expresión de GFP en esta línea transgénica refleja un patrón similar al descrito para S100B endógena y al de otra línea transgénica con otro reportero controlado por el promotor de S100B ³⁰⁰. Para ello, se estudió el perfil de expresión de GFP en las capas externas del bulbo olfatorio de ratones de diferentes edades durante el desarrollo posnatal en ratones S100B-GFP. Para identificar la capa de fibras olfatorias, especialmente en los animales menores a 7 días, en los que la identificación morfológica de las capas se dificulta por su desarrollo incipiente, se utilizó la expresión del marcador VGlut2 (transportador vesicular de glutamato tipo 2) presente en la capa adyacente, en los terminales axónicos de las neuronas sensoriales olfatorias ubicados en los neuropilos de los glomérulos inmaduros.

En la [Figura R.1.1 A](#) se muestran imágenes representativas de la tinción de VGlut2 realizada en cortes de bulbo olfatorio de animales S100B-GFP, correspondientes a semanas 1, 2 y 3 de edad posnatal. En primer lugar, como se encontraba reportado ³⁰⁸, se observó que la marca de VGlut2 se circunscribe a los neuropilos en la capa glomerular para las 3 semanas analizadas, lo que permitió utilizar dicha marca para definir el límite externo de la capa glomerular, que se usó como referencia para alinear y comparar los perfiles de expresión de S100B-GFP en la capa externa adyacente, la capa de fibras olfatorias. En la [Figura R.1.1 B](#) se muestra el perfil de expresión de VGlut2 y S100B-GFP en función de la distancia a dicha referencia, abarcando las capas más externas del bulbo olfatorio.

Al analizar la expresión de S100B en las capas externas del bulbo olfatorio se pudo observar que la marca está presente en ambas capas, coincidente con lo reportado para animales juveniles ³. Sin embargo, se ve principalmente representada en la capa más externa, correspondiente a la capa de fibras olfatorias en desarrollo, para los tres rangos de edad analizados.

A partir de los perfiles de expresión se procedió a analizar la fluorescencia total (área bajo la curva del perfil de fluorescencia) de cada marcador y comparar su nivel para cada capa. Al comparar los valores de intensidad de fluorescencia de GFP y de la marca de VGluT2 correspondientes a las capas glomerular y de fibras olfatorias para las 3 edades analizadas ([Figura R.1.1 C](#)), se encontró que la marca de GFP es más intensa que la marca de VGluT2 en la capa de fibras olfatorias para los 3 rangos de edades analizados. Considerando que VGluT2 es un marcador de la capa glomerular, este resultado indica que la capa de fibras olfatorias se encuentra enriquecida con la marca de GFP.

En línea con lo anterior, se observó que la densidad de células positivas para GFP es significativamente mayor en la capa de fibras olfatorias que en la capa glomerular, para todas las edades analizadas ([Figura R.1.2](#)). Adicionalmente, hallamos una diferencia en la densidad de células GFP+ de la capa de fibras olfatorias, siendo mayor para la semana 1 que para las semanas posteriores.

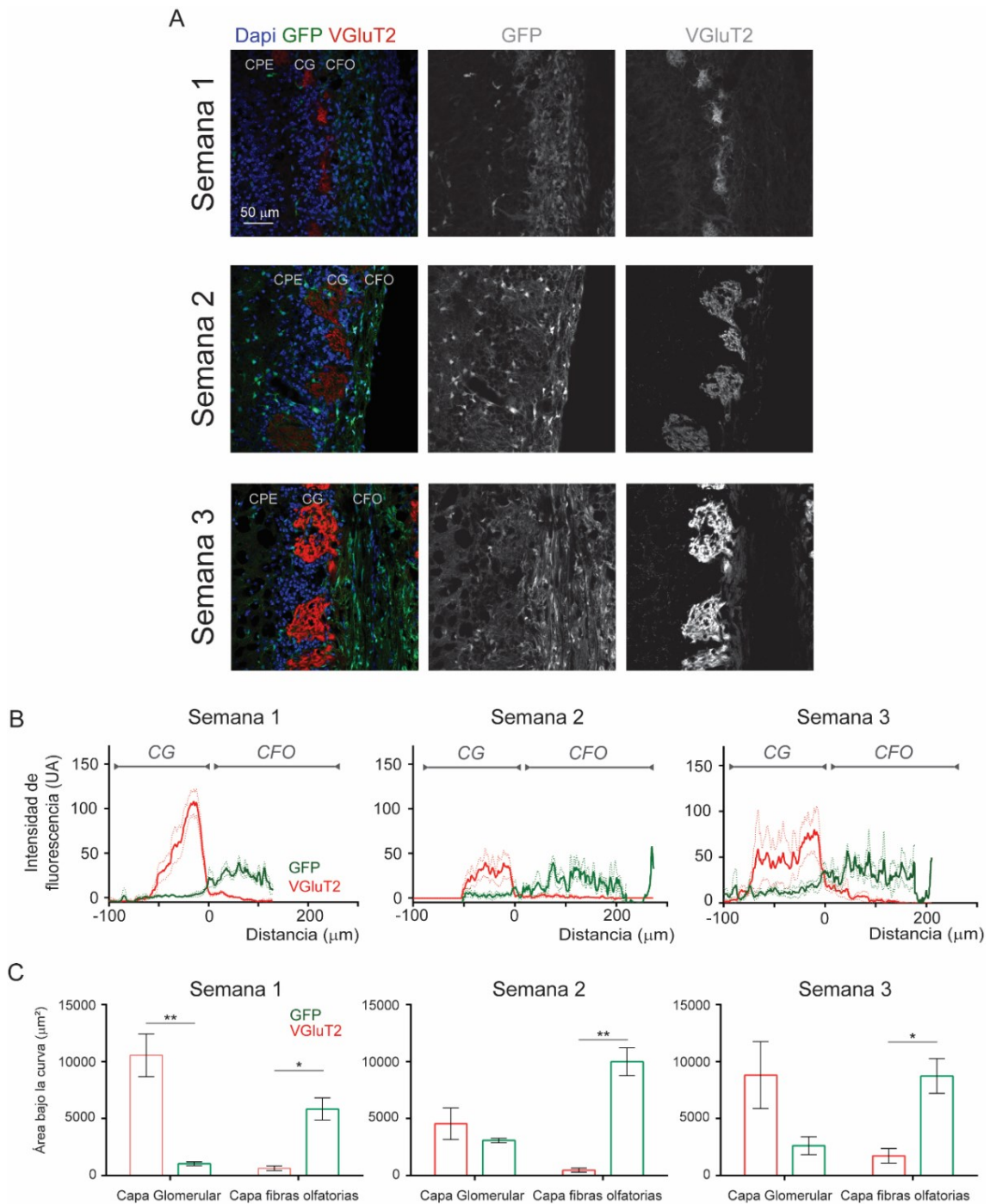


Figura R.1.1. Perfiles de expresión de GFP y VGlut2 en las capas externas del bulbo olfatorio durante el desarrollo posnatal de animales S100B-GFP. A. Imágenes representativas de tinciones de inmunofluorescencia contra VGlut2 (rojo) y los marcadores: nuclear DAPI (azul), GFP (verde) en cortes de bulbo olfatorio de ratones de la línea S100B-GFP de distintas edades neonatales Semana 1: P0, Semana 2: P14 y Semana 3: P21. Se muestran las imágenes RGB, y los canales verde y rojo por separado en escala de grises. Las capas del bulbo olfatorio que se observan en las imágenes son: Capa Plexiforme Externa (CPE), Capa Glomerular (CG) y Capa de Fibras Olfatorias (CFO). **B.** Perfil de expresión de los marcadores GFP y VGlut2 en las capas glomerular y de fibras olfatorias del bulbo olfatorio para las distintas edades neonatales estudiadas (n=4 para cada edad). **C.** Marca de fluorescencia total (área bajo la curva de B) de GFP y VGlut2 para las capas glomerular (CG) y de fibras olfatorias (CFO), para cada edad analizada. ANOVA de 2 vías con medidas repetidas en ambos factores

(localización y marcador). Semana 1: interacción significativa ($p < 0,001$); semana 2: interacción significativa ($p < 0,01$); semana 3: interacción significativa ($p < 0,01$); * $p > 0,05$ y ** $p < 0,01$ (comparaciones a posteriori utilizando el test de Sidak).

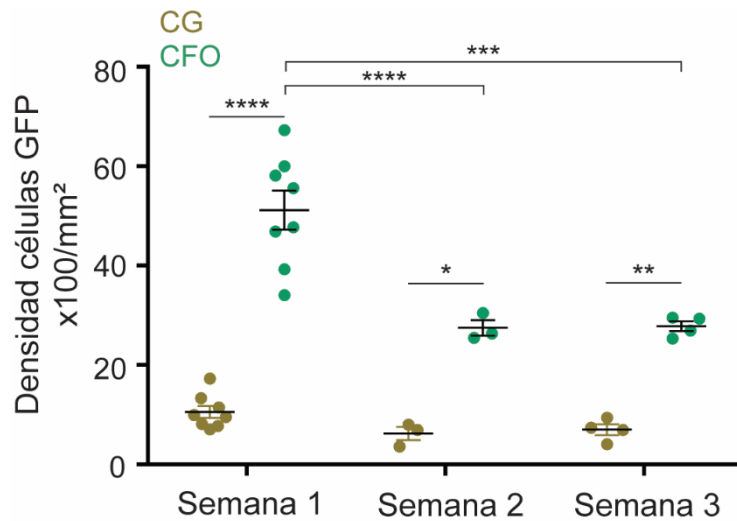


Figura R.1.2. Densidad de células positivas para GFP en las capas externas del bulbo olfatorio durante el desarrollo posnatal. Análisis de la densidad de células que expresan GFP en la capa glomerular (CG) y de fibras olfatorias (CFO) durante el desarrollo posnatal, en animales S100B-GFP. ANOVA de dos vías considerando los factores de localización (con medidas repetidas) y edad. Interacción significativa ($p < 0,05$). Comparaciones a posteriori utilizando el test de Sidak (CG vs CFO): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

En conjunto, estos resultados muestran la utilidad de la línea de ratones S100B-GFP como herramienta para identificar la capa de fibras olfatorias y a las células de la glía envolvente allí predominantes, de acuerdo a lo reportado con otras líneas reporteras bajo control del promotor de S100B en neonatos ²⁸³.

3.1.2. La glía envolvente olfatoria forma redes desde temprano en el desarrollo posnatal

Tal como fue detallado en la [Introducción](#), las células de glía envolvente de ratones juveniles y adultos forman redes y el grado de conectividad determina sus propiedades electrofisiológicas ³⁻⁵, tal que los perfiles electrofisiológicos con relación lineal entre la corriente y el voltaje, en protocolos de *voltaje-clamp*, corresponden a células más conectadas ³.

Con el fin de evaluar si las células de glía envolvente olfatoria de ratones neonatos se encuentran conectadas formando redes gliales, y si éstas maduran

durante el desarrollo posnatal del bulbo olfatorio, utilizamos en primera instancia la técnica de acople por colorante en células de glía envolvente registradas en rodajas agudas de bulbo olfatorio identificadas por su fluorescencia en animales S100B-GFP de edad correspondiente a Semanas 1 y 3. Existen múltiples colorantes posibles que por su tamaño pequeño y estructura pasan a través de las *gap junctions*, revelando estructuras de redes. Colocamos el colorante sulforodamina-B (de fluorescencia roja) dentro de la pipeta de registro, lo que nos permitió monitorear su difusión desde la célula que estaba siendo registrada, hacia las células vecinas que formaban parte de su red ([Figura R.1.3 A](#)).

Todas las células registradas mostraron difusión de Sulforodamina-B a al menos 1 célula vecina, evidencia de que forman redes inclusive desde P0. Las células de glía envolvente de animales de la semana 1 de edad presentaron un mayor número de células acopladas que las de la semana 3, lo que indica que forman redes de mayor tamaño temprano en el desarrollo posnatal ([Figura R.1.3 B](#)), al menos al evaluarse la conectividad con el colorante utilizado. Este resultado sugiere que las redes de glía maduran durante las primeras semanas posnatales, posiblemente haciéndose más selectivas.

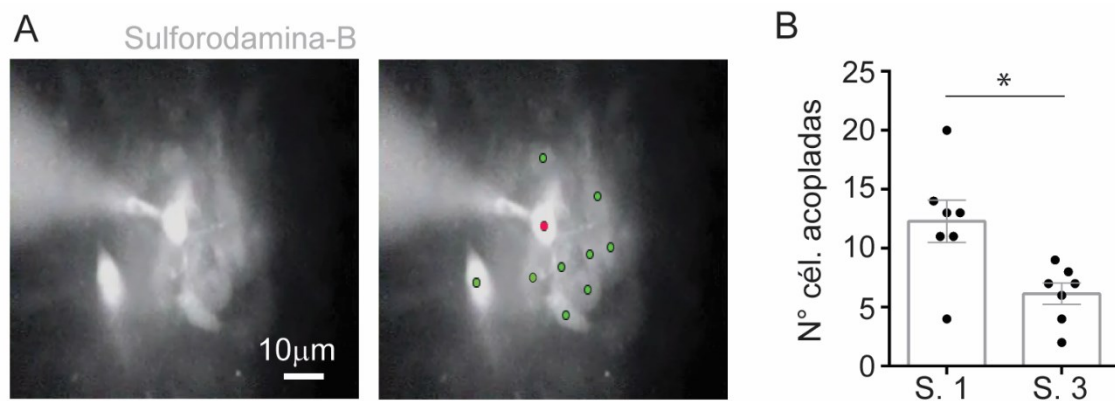


Figura R. 1.3. La glía envolvente de animales neonatos forma redes. A. Se muestran imágenes representativas de una célula de glía envolvente olfatoria (señalada en rojo) registrada a partir de una rodaja de BO, donde se observan células adyacentes que forman parte de la red (en verde) en un experimento de acople por colorante con sulforodamina-B. **B.** Análisis del número de células acopladas para animales de una semana de edad (n=7) y de 3 semanas de edad (n=7). Cada punto representa un experimento de acople por colorante diferente. Test t de Student: *p<0,05, diferencias significativas entre grupos.

Como se mencionó anteriormente, los perfiles electrofisiológicos de las células de glía envolvente de animales juveniles y adultos correlacionan con el

grado de conectividad, tal que las células acopladas mediante *gap junctions* presentan más frecuentemente perfiles lineales de corriente en función del voltaje en comparación con las células desacopladas. Para evaluar si en el caso de las redes de neonatos el grado de conectividad se ve reflejado en los perfiles de corriente de la glía envolvente, se realizaron registros electrofisiológicos de estas células en rodajas agudas de bulbo olfatorio ([Figura R.1.4 A](#)) procedentes de animales de la línea S100B-GFP en 2 etapas del desarrollo posnatal, semana 1 y 3.

Todas las células registradas, identificadas por la expresión de GFP presentaron un potencial de membrana en ausencia de estímulos de valor esperado para células gliales³⁻⁵, alrededor de -80 mV, siendo el promedio para Semana 1, -81 ± 2 mV y para Semana 3, -80 ± 1 mV.

Utilizando protocolos de registro en modo *voltage-clamp* y configuración *whole-cell* se midió la corriente macroscópica evocada por pulsos de voltaje ([Figura R. 1.4 A](#)). En la [Figura R.1.4 B](#) se muestran registros representativos de 2 células de glía envolvente, correspondientes a los 2 grupos de edad analizados durante el desarrollo posnatal y a su derecha las curvas I/V resultantes del registro.

Se ajustó a la curva I/V de cada célula analizada un modelo de regresión lineal para evaluar la linealidad de su perfil de corriente, y se utilizó el parámetro R^2 como indicativo de la bondad del ajuste lineal a los datos ([Figura R.1.4 B](#)). En todas las edades evaluadas la corriente macroscópica presentó en promedio un perfil lineal, compatible con la presencia de *gap junctions* de conductancia óhmica (semana 1: $R^2 0,9736 \pm 0,0091$; semana 3: $R^2 0,9792 \pm 0,0075$), en línea con los resultados de acople por colorante, que reflejaron la presencia de células acopladas para ambas edades.

Se realizó un análisis comparativo de las curvas I/V para los 2 grupos de edades posnatales ([Figura R.1.4 C](#)) que reveló que existe una interacción significativa entre la edad del animal de donde proviene la célula registrada y la amplitud de corriente evocada por el protocolo de *voltage-clamp*. La conductancia macroscópica extraída a partir de la pendiente de las curvas I/V de cada célula, reveló que no existe una correlación significativa entre la edad y la magnitud de este parámetro ([Figura R.1.4 D](#)). Adicionalmente, al analizar la

conductancia macroscópica agrupada por edades, se encontró que la conductancia total no presenta diferencias significativas entre semanas (test de Mann-Whitney: $p > 0,05$). La diferencia entre los resultados encontrados para la I/V y el análisis de la conductancia macroscópica sugiere que las diferencias entre semanas encontradas en la curva I/V se limitan a conductancias activables por los pulsos más hiperpolarizantes y no en todo el rango de voltaje analizado, como sería esperable para la conductancia óhmica de las *gap junctions*. Estos resultados señalan que la corriente macroscópica de las células de glía envolvente no refleja los cambios en el tamaño de las redes detectados mediante acople por colorante durante el desarrollo posnatal.

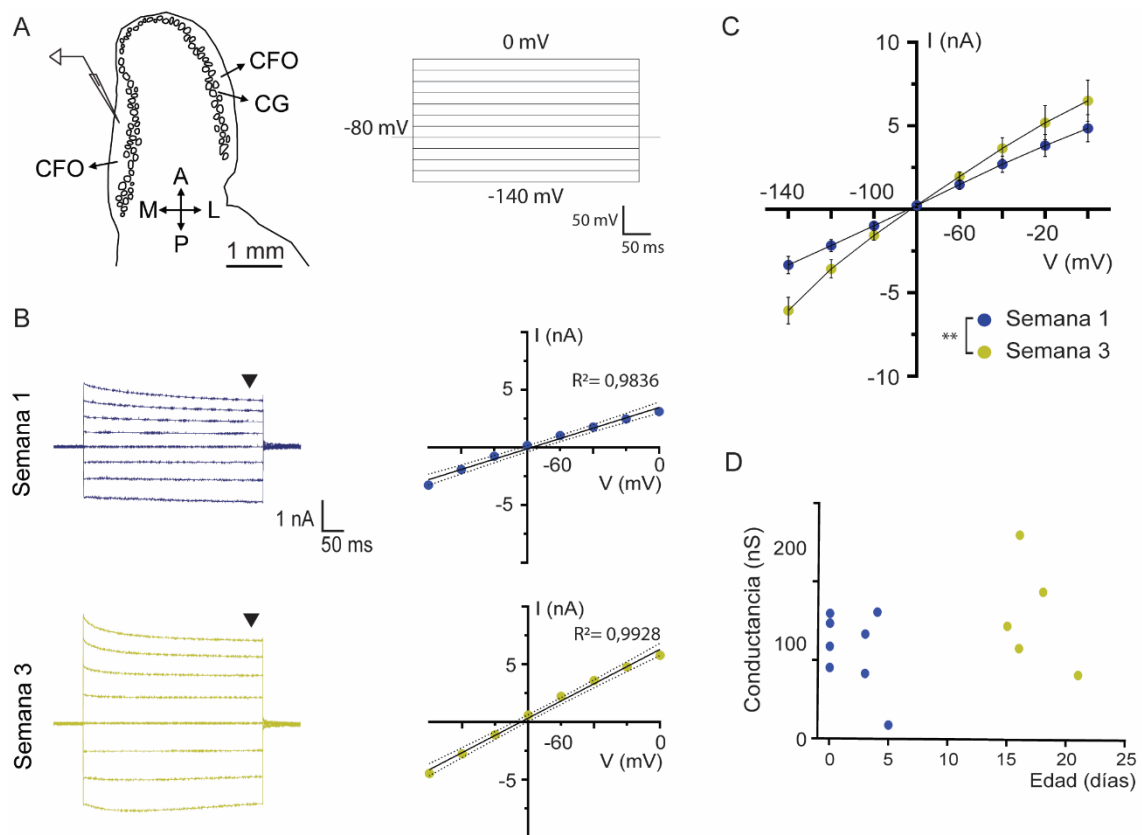


Figura R.1.4. Características electrofisiológicas de células de glía envolvente olfatoria de ratones durante el desarrollo posnatal. **A.** Se realizaron registros electrofisiológicos de células de glía envolvente a partir de rodajas agudas de bulbo olfatorio, en la capa de fibras olfatorias de animales S100B-GFP. Se utilizó un protocolo de *voltaje-clamp* (-140 a 0 mV). **B.** Se muestran registros representativos de corriente total en respuesta al protocolo utilizado para células registradas provenientes de animales de 0 y 18 días posnatales (P0 y P18), correspondientes a semanas 1 y 3 de edad, respectivamente. A la derecha se muestran las curvas I/V construidas a partir de la corriente total evocada en respuesta a distintos escalones de voltaje, para los registros representativos. Se muestra el ajuste lineal para cada ejemplo. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%. **C.** Curvas I/V promedio construidas a partir de la corriente total en respuesta a distintos escalones de voltaje de

-140 a 0 mV, para células de glía envolvente de animales de la semana 1 (n=8) y semana 3 (n=5). ANOVA de dos vías de medidas repetidas; Interacción significativa entre factores edad y voltaje; **p<0001. **D.** Correlación entre la conductancia macroscópica estimada a partir de la curva I/V y la edad del animal. Correlación de Spearman no significativa, p>0,05.

En animales de edad juvenil (semana 3 posnatal) y adulta (2 meses en adelante) el acople de las células de glía envolvente es sensible al tratamiento con ácido meclafenámico (MFA), un bloqueante de *gap junctions*, que reduce la amplitud de la corriente macroscópica, la linealidad de la curva I/V y el acople por colorante³⁻⁵.

Para evaluar si la glía envolvente olfatoria de neonatos presenta una conductancia sensible a MFA, característica de *gap junctions*, se registraron células de glía envolvente del bulbo olfatorio de animales S100B-GFP de 1 semana, antes y después de la adición de MFA al medio de registro. En la [Figura R.1.5 A](#) se muestran dos registros obtenidos de una misma célula en solución de registro control (ACSF) y luego de 10 minutos de tratamiento con MFA, que produjo una disminución marcada de la amplitud de la corriente total y el desenmascaramiento de corrientes activables por voltaje. En la muestra de células registradas, el tratamiento con MFA redujo la conductancia macroscópica ([Figura R.1.5 B](#)). Luego del bloqueo de las *gap junctions* mediante aplicación de MFA emergió un perfil no lineal de corriente solo en una de las tres células registradas, siendo el R² promedio para regresiones lineales ajustadas a la curva I/V para ACSF de $0,9854 \pm 0,0107$ y para MFA de $0,9828 \pm 0,0084$ (test con medidas repetidas de Wilcoxon, p>0,05). Resta evaluar si este resultado se mantiene en una muestra de mayor número de células.

Estos resultados indican que parte de la conductancia macroscópica de la glía envolvente de la primera semana de edad es compatible con la presencia de *gap junctions*, similar a lo reportado en edad juvenil y adulta, en línea con la observación de las redes reportadas en la [Figura R.1.3](#).

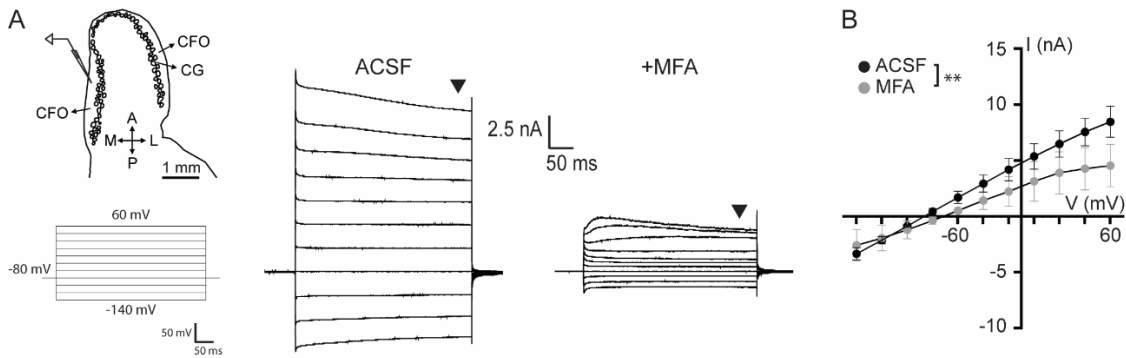


Figura R. 1.5. El perfil de corriente de la glía envolvente olfatoria es sensible a un bloqueante de *gap junctions* temprano en el desarrollo. A. Se realizaron registros electrofisiológicos de células de glía envolvente de la capa de fibras olfatorias en rodajas de bulbo olfatorio de animales S100B-GFP. Se utilizó un protocolo de *voltaje-clamp* (-140 a 60 mV). Se muestran registros de corriente total en respuesta al protocolo de pulsos de voltaje aplicado a una célula de un animal S100B-GFP de 4 días (P4) en presencia de la solución de registro control (ACSF) y luego de su reemplazo por una solución con el bloqueante de *gap junctions* MFA (100 μ M). **B.** Curvas I/V construidas a partir de la corriente total en respuesta a distintos escalones de voltaje, para células de glía envolvente de animales de la primera semana de edad antes (ACSF) y luego de agregar MFA (n=3). ANOVA de dos vías de medidas repetidas: **p<0,01 para el factor tratamiento (MFA).

El conjunto de los resultados presentados en esta sección indica que las células de glía envolvente olfatoria forman redes gliales mediadas por *gap junctions* desde P0. Adicionalmente, sugieren que las redes maduran reduciendo su tamaño durante el desarrollo posnatal del bulbo olfatorio, aunque esto no se refleja en el perfil electrofisiológico de las células individuales que las componen.

3.1.3. Expresión de Cx43 y Cx47 en la capa de fibras olfatorias durante el desarrollo posnatal

Las *gap junctions* se encuentran formadas por placas de múltiples canales formados por Cx que pueden ser de distinto tipo, dependiendo del tipo celular. Se ha demostrado que la Cx43 es la principal Cx expresada y constituyente de *gap junctions* de la glía envolvente olfatoria de animales juveniles y adultos ⁵. Dados estos antecedentes, nos propusimos evaluar si la Cx43 presentaba un perfil de expresión compatible con su participación en la formación de redes de glía envolvente desde temprano en el desarrollo posnatal.

Para ello, se realizó una tinción de inmunofluorescencia para detectar Cx43 en cortes de bulbo olfatorio de animales S100B-GFP de distintas edades

posnatales, de P0 a P14 ([Figura R.1.6 A](#)). La marca de Cx43 es característica por su apariencia puntiforme, formando *clusters* o placas constituidas por múltiples canales ³⁰⁹. Los resultados mostraron que a partir de P2 se puede apreciar marca en la capa de fibras olfatorias. A su vez la densidad de *clusters* aumenta conforme avanza la edad posnatal y se observa una marca significativamente mayor a P7 y P14, comparando con P0 ([Figura R.1.6 B](#)). Para la mayor parte de las edades se observa adyacente y externa a la capa de fibras olfatorias una intensa marca de Cx43, correspondiente a expresión en leptomeninges, la cual funciona como control interno de la técnica, especialmente en P0. La escasa marcación de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias a esta edad fue confirmada utilizando anticuerpos de distintas especies (conejo y ratón), con especificidad diferencial de epítopes, lo cual indica que los resultados no se deben a una baja sensibilidad de la técnica.

La Cx43 es utilizada tanto por astrocitos como por glía envolvente olfatoria como molécula mediadora de *gap junctions*, pero considerando la presencia mayoritaria de la glía envolvente, se infiere que la mayor parte de esta marca corresponde a la expresión de este tipo celular, dentro de la capa de fibras olfatorias.

La mínima densidad de *clusters* de Cx43 a P0 sugiere que la Cx43 no es utilizada principalmente para formar *gap junctions* a esta edad, y por lo tanto que podría haber un cambio en el sustrato molecular mediador de estas uniones durante el desarrollo posnatal temprano del bulbo olfatorio, es decir, que una Cx diferente de Cx43 medie estas uniones durante las primeras semanas y gradualmente ésta sea reemplazada o complementada en su función por Cx43.

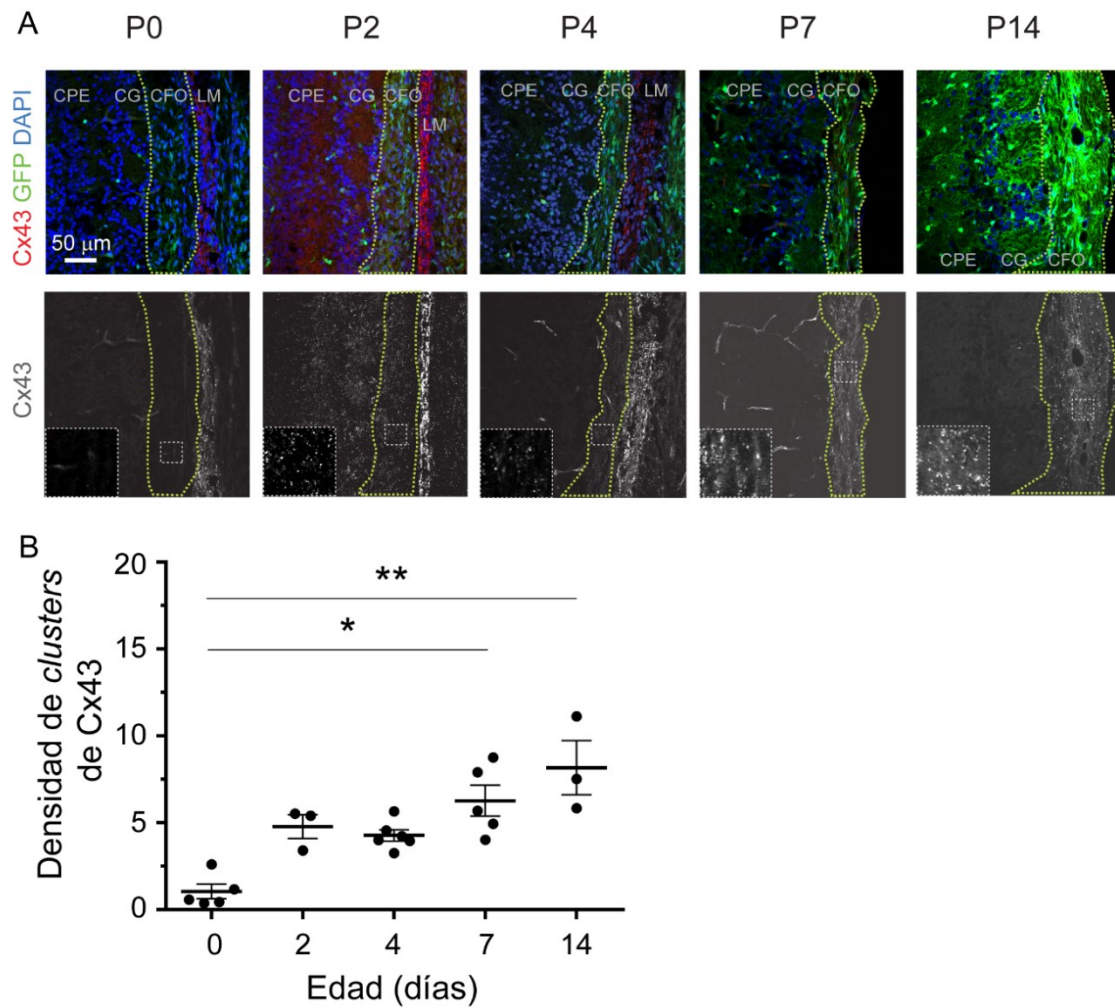


Figura R.1.6. Expresión de Cx43 en la capa de fibras olfatorias durante el desarrollo posnatal. **A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra Cx43 en el bulbo olfatorio de animales de la línea S100-GFP de diferentes edades posnatales (P0, P2, P4, P7, P14). La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), S100B-GFP en verde y Cx43 en rojo. El recuadro ampliado muestra la marca de Cx43. Las capas del bulbo olfatorio que se observan en las imágenes son: capa plexiforme externa (CPE), capa glomerular (CG) y capa de fibras olfatorias (CFO) dentro de la línea punteada y leptomeninges (LM). **B.** Análisis de la densidad de *clusters* de Cx43 (clusters cada 100 μ m²), en la CFO del bulbo olfatorio a lo largo del desarrollo posnatal. Se aplicó un ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal-Wallis), ** $p=0,0028$. Se utilizó el test post-hoc no paramétrico de Dunn para comparaciones múltiples; * $p<0,05$ y ** $p<0,01$. Número de animales: P0, $n=5$; P2, $n=3$; P4, $n=6$; P7, $n=5$; P14, $n=3$.

Con el objetivo de identificar Cx candidatas a formar parte predominante de las *gap junctions* a P0, realizamos tinciones de inmunofluorescencia para otras Cx comúnmente utilizadas por células gliales: Cx30, que típicamente complementa a la Cx43 en astrocitos y Cx47, típicamente oligodendroglial ([Figura R.1.7](#)) enfocándonos en la semana 1 del desarrollo posnatal.

Los resultados mostraron que en la capa de fibras olfatorias no se observa marca puntiforme de Cx30 en ninguna de las edades analizadas, siendo la densidad de *clusters* de Cx30 prácticamente nula ([Figura R.1.7 B](#)). Esto es coincidente con lo que sucede a edad juvenil y adulta en la misma zona del bulbo olfatorio ⁵. En la [Figura R.1.7 A](#) se observa que adyacente a la capa de fibras olfatorias (señalada dentro de la línea punteada) se observa una intensa marca de Cx30, correspondiente a expresión en leptomeninges. Esta marca sirve de control positivo de la técnica de inmunofluorescencia, validando la ausencia de marca de Cx30 en la capa de fibras olfatorias, descartándola como candidata probable a mediar las *gap junctions* de la glía envolvente olfatoria temprano en el desarrollo posnatal.

Al analizar la marca de Cx47 en cortes comparables de tejido, se pudo observar un gran número de *clusters* en las dos edades correspondientes a la Semana 1 de edad ([Figura R.1.7 D](#)) y que la densidad de *clusters* de Cx47 aumentó significativamente su abundancia con el avance del desarrollo posnatal, comparando la densidad de marca a P0-2 y P7.

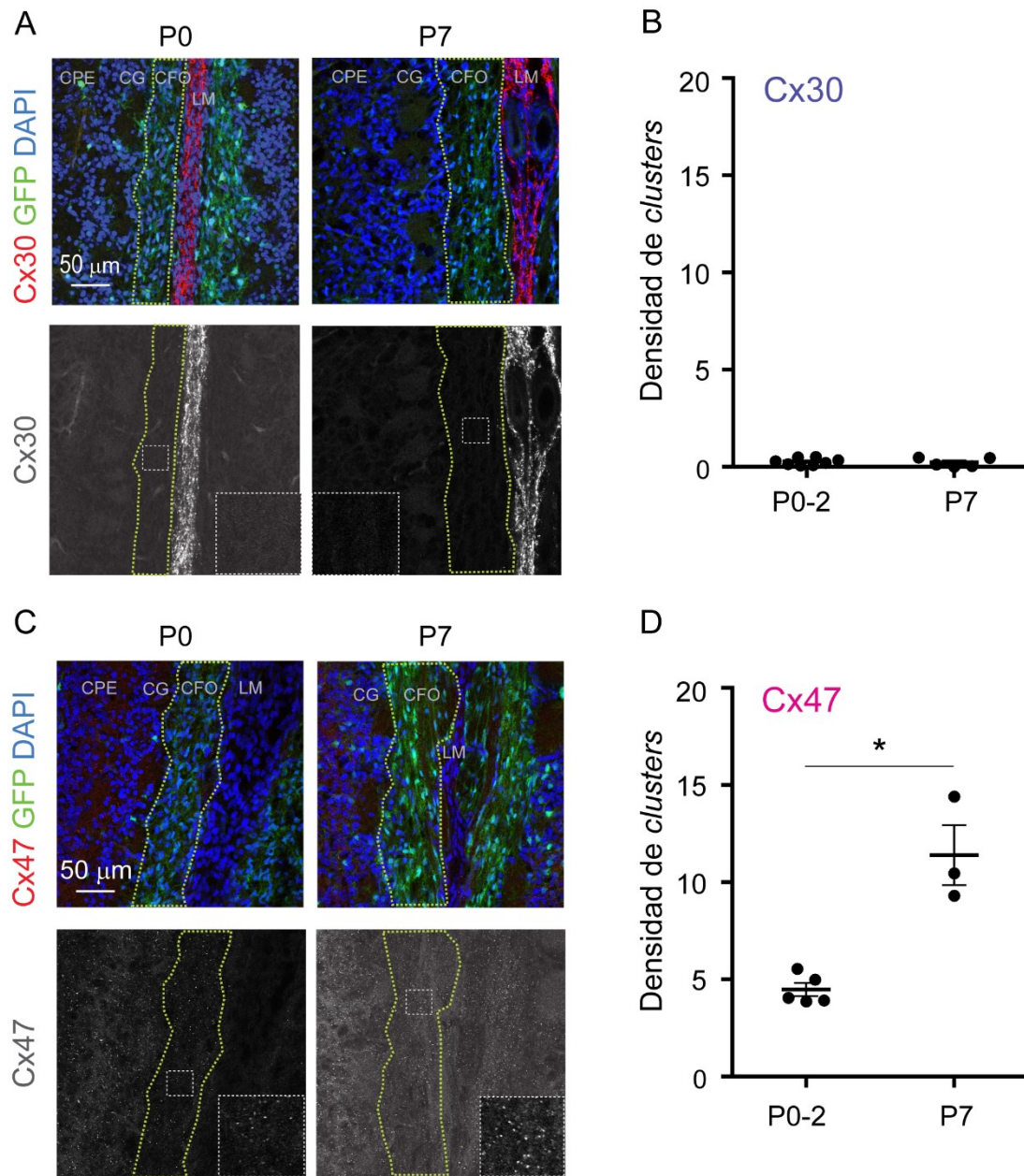


Figura R.1.7. Expresión de Cx30 y Cx47 en la capa de fibras olfatorias en la primera semana del desarrollo posnatal. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra Cx30 en el bulbo olfatorio de animales de la línea S100B-GFP de edad P0 y P7. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), la marca de GFP en verde y Cx30 en rojo. El recuadro ampliado muestra la marca de Cx30. Se indican las capas: plexiforme externa (CPE), glomerular (CG), de fibras olfatorias (CFO) y leptomeninges (LM). **B.** Análisis de la densidad de *clusters* de Cx30 (clusters cada $100 \mu\text{m}^2$), en la capa de fibras olfatorias del bulbo olfatorio de edades P0-2 y P7. Se aplicó test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney, $p > 0,05$. Número de animales: P0-2, $n=8$; P7, $n=5$. **C.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra Cx47 en el bulbo olfatorio de animales de la línea S100B-GFP de edad P0 y P7. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), la marca de GFP en verde y Cx47 en rojo. El recuadro ampliado muestra la marca de Cx47. Se indican las capas: plexiforme externa (CPE), glomerular (CG), de fibras olfatorias (CFO) y leptomeninges (LM). **D.** Análisis de la densidad de *clusters* de Cx47 (clusters cada $100 \mu\text{m}^2$) en la capa de fibras olfatorias del bulbo olfatorio de edad P0-2 y P7. Número de animales: P0-2, $n=5$, P7, $n=3$. Se aplicó test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney, $*p=0,0357$.

Adicionalmente, analizamos la co-localización de la marca de Cx47 y las estructuras marcadas con GFP, correspondientes predominantemente a los cuerpos celulares y procesos de las células de glía envolvente olfatoria, en la capa de fibras olfatorias ([Figura R.1.8](#)). Se observó tanto para P0-2 como para P7, que hay *clusters* de Cx47 que co-localizan con procesos GFP. El análisis arrojó que la marca de Cx47 co-localiza con cerca del 20% del área cubierta por GFP, y cerca del 60% del total de los *clusters* de Cx47 se encuentran co-localizados con la marca de GFP ([Figura R.1.8 B](#)). Además, la co-localización sobre GFP fue despreciable en imágenes obtenidas de controles negativos de la inmunofluorescencia de Cx47 (representada por la línea punteada en B, Test t de Student: $***p < 0,001$).

Se puede observar en la [Figura R.1.8 C](#) la típica estructura de lagunas revelada por la marca de GFP, que identifica a la glía envolvente, con gran densidad de *clusters* de Cx47 co-localizados con sus procesos.

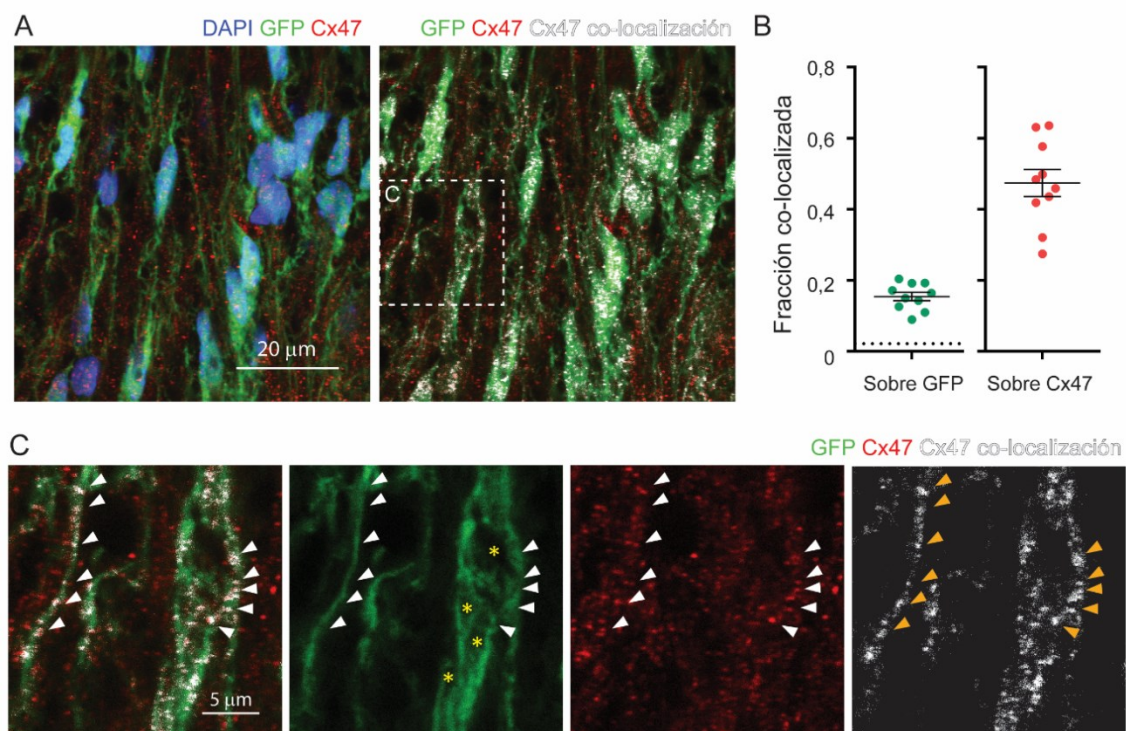


Figura R.1.8. Co-localización de la marca de Cx47 con células GFP+ en la capa de fibras olfatorias de animales S100B-GFP. **A.** Imagen representativa de inmunofluorescencia contra Cx47 en la capa de fibras olfatorias del bulbo olfatorio de animales de la línea S100B-GFP a P2. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), la marca de GFP en verde y Cx47 en rojo. A la derecha se muestran en blanco los *clusters* de Cx47 que co-localizan con GFP. **B.** Análisis de la fracción co-localizada de la marca de Cx47 en células GFP+, en cortes de bulbo olfatorio de animales de P0-7. A la izquierda se muestra la fracción colocalizada sobre *pixels* positivos para GFP

(Sobre GFP). La línea punteada a la izquierda indica la fracción co-localizada en un control negativo de la inmunofluorescencia de Cx47 (Media \pm EE: 0,022 \pm 0,001). A la derecha se muestra la fracción de *pixels* co-localizados sobre *pixels* positivos para Cx47 (Sobre Cx47). N=5 animales. **C.** Ampliación del recuadro en A. donde se señalan con flechas los *clusters* de Cx47 co-localizados en procesos celulares con marca de GFP y con asteriscos las lagunas formadas por la glía envolvente.

Estos resultados nominan a la Cx47 como un posible candidato a conformar las *gap junctions* responsables de la conectividad de la glía envolvente desde temprano en el desarrollo posnatal.

3.1.4. Conclusiones del Capítulo 1

Los resultados de este capítulo señalan que las células de glía envolvente olfatoria forman redes mediadas por *gap junctions* desde P0, que reducen su tamaño durante el desarrollo posnatal. No detectamos un proceso de maduración en paralelo del perfil electrofisiológico.

Así como se encuentra descrito para estas células a edad juvenil y adulta, los resultados sugieren que la Cx43 es una molécula clave en la formación de *gap junctions*, durante las primeras 3 semanas del desarrollo posnatal. El perfil de expresión de Cx43 mostró un aumento gradual en la densidad de *clusters* en relación a la edad. Finalmente, los resultados indican que la glía envolvente olfatoria expresa Cx47, una Cx típica de oligodendrocitos, que podría ser candidata a formar parte de las *gap junctions* desde más temprano que la Cx43 durante el desarrollo posnatal.

3.2. Capítulo 2: Rol de la Cx43 en la formación de redes de glía envolvente olfatoria a edades tempranas del desarrollo posnatal

Las Cx son proteínas transmembrana que pueden tener funciones de canales (*gap junctions*, hemicanales) y funciones no asociadas a canales (señalización intracelular y adhesión) ^{171,310}. La detección de las Cx por inmunofluorescencia no permite distinguir entre estos roles.

A edad juvenil y adulta se ha demostrado que la glía envolvente olfatoria expresa Cx43 y que es utilizada como componente de las *gap junctions*, como mediadora de la conectividad de estas células ⁵. Con el objetivo de determinar si la Cx43 media las redes de glía envolvente también durante el desarrollo posnatal, se eligió una estrategia de manipulación genética de la glía envolvente utilizando la línea transgénica de ratones PLP-CreERT, que expresa la recombinasa Cre inducible por Tamoxifeno (Tx) bajo secuencias regulatorias del gen de PLP1, expresado por la glía envolvente y oligodendrocitos ([sección M.2.1.3](#)).

En este capítulo, se detallan los resultados encontrados para la caracterización de la línea PLP-CreERT como herramienta de manipulación de la glía envolvente olfatoria, su utilización para reducir la abundancia de la Cx43 en esta glía, y sus efectos en la conectividad de la glía envolvente olfatoria de animales neonatos. Por último, se presenta la caracterización de un test conductual que podría utilizarse para evaluar el impacto de esta manipulación genética u otras que podrían afectar la función olfativa de animales neonatos.

3.2.1. La línea de ratones PLP-CreERT permite manipular a la glía envolvente olfatoria

La glía envolvente olfatoria expresa una diversidad de marcadores por los cuales se la puede distinguir de otros tipos celulares en la capa de fibras olfatorias. Sin embargo, en cuanto a los marcadores gliales mejor descritos, (S100B, BLBP) no expresa de manera exclusiva ninguno. En el capítulo anterior se han presentado resultados a partir de ensayos realizados con animales de la línea S100B-GFP, en los que la glía envolvente puede ser identificada por la

expresión del marcador S100B, debido a que es el tipo celular mayoritario de esta capa. A pesar de ello, este marcador es compartido con los astrocitos de la capa de fibras olfatorias por lo que no permite distinguir estos tipos gliales. La glía envolvente expresa la proteína DM-20, una variante de expresión del gen PLP1, compartiendo este marcador con oligodendrocitos⁹², células que no se encuentran presentes en la capa de fibras olfatorias.

Dados estos antecedentes, nos propusimos evaluar si podíamos utilizar la línea PLP-CreERT para la manipulación de la expresión de genes en la glía envolvente olfatoria. Primero, se evaluó el patrón de expresión de la recombinasa Cre en la línea PLP-CreERT. Para ello se cruzaron animales de esta línea con ratones de la línea reportera de la actividad de Cre, LSL-tdTomato, y se analizó la localización de las células positivas para tdTomato y su identidad en base a la expresión de marcadores gliales en tejido de animales de la descendencia (PLP-CreERT;LSL-tdTomato, que para simplicidad llamaremos PLP-Cre;Tom) tratados con Tx.

En primer lugar, se analizó en cortes de bulbo olfatorio de animales de semana 1 y 4 del desarrollo posnatal la ubicación y morfología de las células reportadas con tdTomato y se observó la presencia de lagunas formadas por los procesos de las células tdTom+ ([Figura R. 2.1 A](#)). Éstas se encontraron principalmente alojadas en la capa de fibras olfatorias, lo que permitió identificarlas con facilidad, y lo cual sugiere que para ambas edades las células reportadas son glía envolvente olfatoria. Se cuantificó el número de células reportadas con tdTomato en las primeras 70 μm y 150 μm desde la superficie del bulbo para los cortes de semana 1 y 4, respectivamente considerando el ancho promedio de la capa de fibras olfatorias para estas edades. A partir de este dato se calculó la densidad de células tdTom+ en la capa de fibras olfatorias para ambas edades, sin encontrar diferencias durante el desarrollo ([Figura R. 2.1 B](#)).

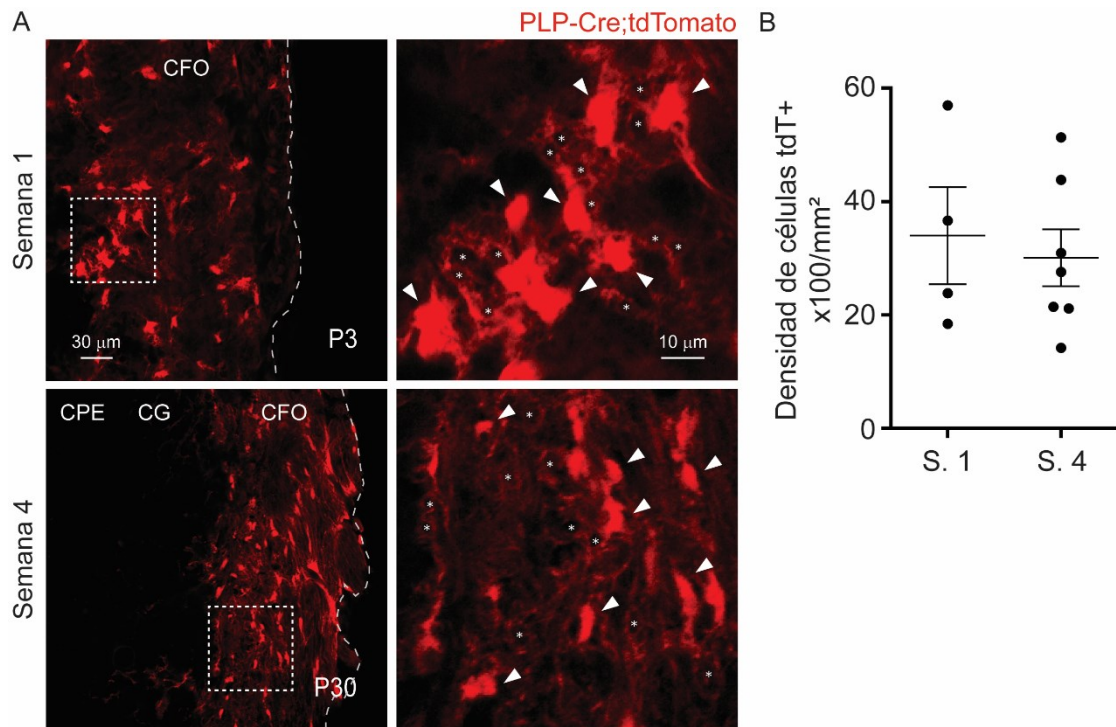


Figura R. 2.1. Análisis de la localización de células tdTomato en la capa de fibras olfatorias de animales de edad neonatal. A. Imágenes representativas de un corte coronal de bulbo olfatorio de la línea PLP-CreERT;tdTomato de un animal P3 y uno P30 (semana 1 y 4 del desarrollo posnatal, respectivamente), inyectados con Tx. Se muestra la expresión de tdTomato. Se observan la capa de fibras olfatorias (CFO), la capa glomerular (CG) y la capa plexiforme externa (CPE). Se indica en línea punteada gris el límite externo del bulbo olfatorio. A la derecha se muestra la ampliación de los recuadros, donde se señalan cuerpos celulares tdTom+ (flechas) y las estructuras de lagunas (asteriscos) de la glía envolvente en la capa de fibras olfatorias (CFO). **B.** Cuantificación de la densidad de células reportadas con tdTomato en la capa de fibras olfatorias en Semana 1 y 4 del desarrollo posnatal, expresada en número de células $\times 100/\text{mm}^2$; semana 1, $n=4$ animales; semana 4, $n=4$ animales. Test no paramétrico de Mann-Whitney, $p>0,05$, diferencias no significativas.

A continuación, analizamos en más detalle la distribución de las células positivas para tdTomato en el bulbo olfatorio de animales PLP-Cre;Tom juveniles ([Figura R. 2.2](#)). Se encontró que la gran mayoría de las células reportadas con tdTomato ($87.1 \pm 0.4\%$) se ubica en la capa de fibras olfatorias del bulbo olfatorio ([Figura R. 2.2 B](#)), encontrando pocos casos de células positivas para tdTomato en las capas internas del bulbo ([Figura R. 2.2 C y D](#)). Adicionalmente, la mayor parte de las células presentes en la capa de fibras olfatorias fueron reportadas con tdTomato ([Figura R. 2.2 D](#)). Ambos resultados apuntan a que las células de la capa de fibras olfatorias, principalmente células de glía envolvente olfatoria ⁴², pueden ser marcadas mediante esta estrategia.

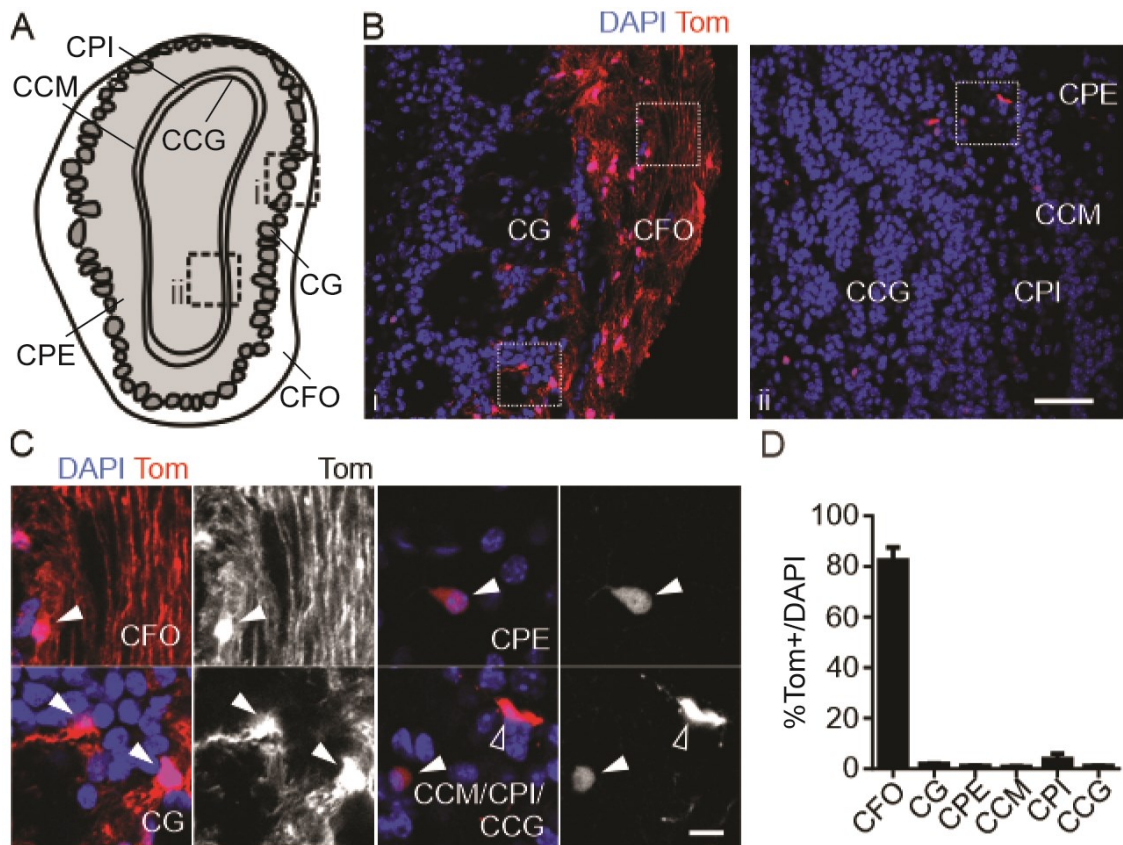


Figura R. 2.2. La línea PLP-CreERT dirige la expresión de Cre en el bulbo olfatorio principalmente a células de la capa de fibras olfatorias en ratones juveniles. **A.** Se muestra una representación esquemática de un corte coronal de bulbo olfatorio, donde se señala la ubicación de dos regiones de interés: i) capas externas y ii) capas internas del bulbo olfatorio, ejemplificadas en **B.** **B.** Imágenes representativas de un corte coronal de bulbo olfatorio de un animal P30 de la línea PLP-Cre;Tom, tratado con tamoxifeno de P14 a P19. Se muestra la marca nuclear con DAPI (azul) y la expresión de tdTomato (Tom) (rojo). En i) se observan la capa de fibras olfatorias (CFO) y la capa glomerular (CG). En ii) se muestran la capa plexiforme externa (CPE), capa de células mitrales (CCM), la capa plexiforme interna (CPI) y la capa de células granulares (CCG). La escala corresponde a 50 μ m. Los recuadros se muestran ampliados en **C.** **C.** Detalle de las células reportadas con tdTomato en las capas CFO, CG, CPE y una región que incluye parte de las CCM, CPI y CCG. Se muestra en azul la marca nuclear de DAPI y en rojo, y en escala de grises, tdTomato. La escala corresponde a 10 μ m. **D.** Cuantificación de la abundancia de células reportadas con tdTomato en cada capa del bulbo olfatorio, expresada en porcentaje respecto del número de células identificadas con DAPI, N=4 animales.

Para evaluar si las células reportadas a edad juvenil correspondían a glía envolvente olfatoria, se analizó su identidad mediante marcaje por inmunofluorescencia para BLBP, un marcador expresado por esta glía ([Figura R. 2.3 A, B y D](#)).

Se encontró que más del 80% de las células positivas para tdTomato en la capa de fibras olfatorias y más del 50% de ellas en la capa glomerular

expresan el marcador BLBP, y que casi la totalidad de las células que expresan BLBP fue reportada con tdTomato ([Figura R. 2.3 B](#)). Las células encontradas en la capa glomerular probablemente sean células de glía envolvente olfatoria ubicada entre las células periglomerulares ^{3,84}. Estos resultados indican que las células reportadas con tdTomato en la capa de fibras olfatorias expresan un marcador característico de glía envolvente. No se encontraron células reportadas con tdTomato que expresaran el marcador astrogial GFAP, y ninguna de las células identificadas como GFAP⁺ expresaron tdTomato ([Figura R. 2.3 C](#)). Adicionalmente, de las pocas células tdTomato encontradas en las capas internas del bulbo olfatorio (capa plexiforme externa, capa de células mitrales y capa de células granulares), ninguna presentó expresión para el marcador BLBP ([Figura R. 2.3 D](#)), lo que sugiere que son oligodendrocitos. Resta repetir esta caracterización en tejido de animales de edad neonatal.

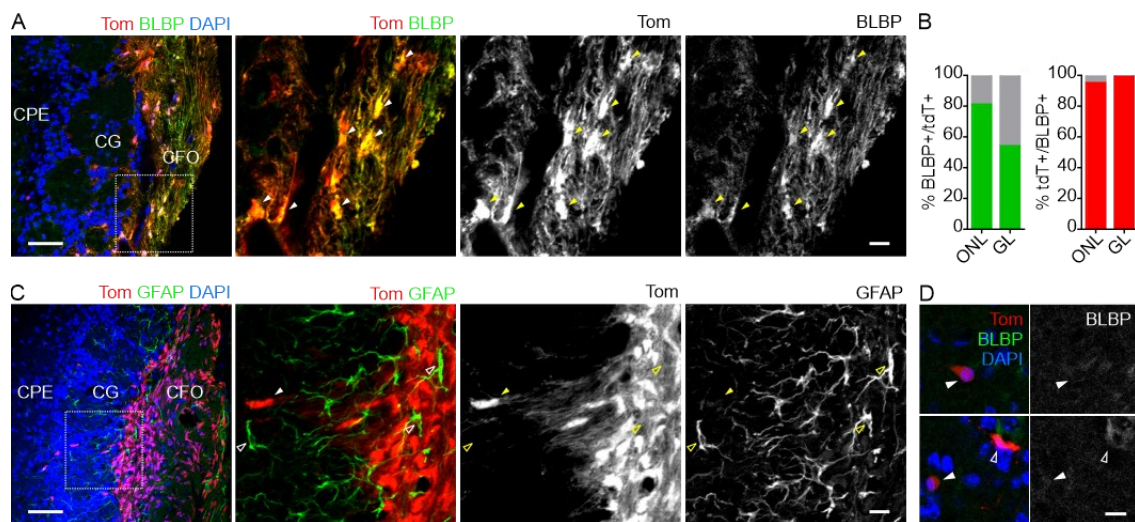


Figura R. 2.3. La línea PLP-CreERT permite manipular selectivamente a la glía envolvente olfatoria. **A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia para el marcador BLBP en un corte coronal de bulbo olfatorio de un animal P30 de la línea PLP-Cre;Tom, inyectado con tamoxifeno de P14 a P19. El recuadro de la figura de la izquierda se amplifica en las siguientes 3 imágenes hacia la derecha. Se muestra la marca nuclear con DAPI en azul, BLBP en verde y escala de grises, y la expresión de tdTomato (Tom) en rojo y escala de grises. Se indica la capa de fibras olfatorias (CFO), la capa glomerular (CG) y la capa plexiforme externa (CPE). La escala corresponde a 50 μ m (izquierda) y 10 μ m (derecha). Se señalan con flechas las células de interés, marcadas con BLBP y reportadas con Tom. **B.** A la izquierda se muestra el porcentaje de células BLBP⁺ del total de reportadas con tdTomato para las capas CFO y CG. A la derecha se muestra el porcentaje de células tdTomato⁺ del total de células que expresan BLBP para las capas de interés. N= 3 animales. **C.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia para el marcador GFAP en un corte coronal de bulbo olfatorio de un animal P30 de la línea PLP-Cre;Tom, inyectado con tamoxifeno de P14 a P19. El recuadro en la figura de la izquierda se amplifica en las siguientes 3 imágenes hacia la derecha. Se muestra la marca nuclear con DAPI en azul, GFAP en verde y escala de

grises, y la expresión de tdTomato en rojo y escala de grises. Se indican la CFO, CG y CPE. La escala corresponde a 50 μm (izquierda) y 10 μm (derecha). Se señalan con flechas llenas las células de interés reportadas con Tom y con flechas vacías las consideradas GFAP⁺. **D.** Detalle de células positivas para Tom y negativas para BLBP en las capas profundas del bulbo olfatorio. Arriba: Se muestra la imagen compuesta y el canal de BLBP en escala de grises. Abajo: Se indica con una flecha llena una célula reportada con tdTomato de la capa de células mitrales y con una flecha vacía una célula en la capa de células granulares. La escala corresponde a 10 μm . N= 3 animales.

La caracterización del patrón de expresión de la línea PLP-Cre mostrada en esta tesis forma parte de la caracterización general de la línea transgénica para su uso en varias líneas de investigación del laboratorio y un trabajo en colaboración con otros miembros del grupo, que mostró que la Cx43 media las redes de glía envolvente en animales juveniles y adultos ⁵. En resumen, el conjunto de resultados obtenidos permite concluir que la línea PLP-CreERT es de utilidad para dirigir de manera selectiva y eficiente manipulaciones genéticas mediante tecnología Cre-lox a la glía envolvente olfatoria.

3.2.2. Deleción condicional de Cx43 en la glía envolvente olfatoria de neonatos

Con el objetivo de analizar si la Cx43 media las redes de glía envolvente olfatoria en animales de edad neonatal, se realizaron cruzas entre la línea PLP-CreERT y la línea de ratones Cx43^{flox} y se caracterizaron las redes de glía envolvente en la descendencia. En la línea Cx43^{flox} los animales portan una inserción de secuencias loxP flanqueando el exón 2 del gen que codifica la Cx43, y mediante la cruce con la línea PLP-CreERT se obtiene una proporción de la descendencia en la que la administración de Tx permite la deleción permanente de esta porción del gen, impidiendo la expresión de Cx43. Nuestro grupo ha descrito que estos animales presentan una disminución de entre el 70 y el 90% en la expresión de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias de ratones de edad juvenil y adulta ⁵.

Para evaluar si esta manipulación genética es efectiva para eliminar la expresión de Cx43 de la glía envolvente en animales neonatos, se cruzaron las líneas PLP-CreERT y Cx43^{flox}, se inyectó a toda descendencia con Tx a P5 y 6, protocolo adaptado a partir de uno validado para neonatos ²⁹¹, y se analizó la expresión de Cx43 mediante inmunohistoquímica a P7 en cortes de bulbo

olfatorio. Los animales fueron genotipificados luego del sacrificio y clasificados en dos grupos: 1) Cx43 cKO (*knock-out* condicional de la Cx43) con un genotipo PLP-Cre^{+/-};Cx43^{fllox/fllox}; 2) grupo Cx43 Control: de genotipos PLP-Cre^{+/-};Cx43^{+/+} o PLP-Cre^{-/-};Cx43^{fllox/fllox}.

La [Figura R. 2.4 A](#) muestra la densidad de *clusters* de Cx43 en la capa de fibras olfatorias. Se observó que para el grupo Cx43 Control la densidad de *clusters* fue similar a la encontrada para esta edad en los animales S100B-GFP, mostrada en el Capítulo 1 de esta tesis ([Figura R. 2.4 B](#)). En cuanto a la expresión de Cx43 en el grupo Cx43 cKO, se observó que en la capa de las fibras olfatorias de estos animales la densidad de *clusters* de Cx43 disminuyó drásticamente, respecto al grupo Cx43 Control y del grupo S100B-GFP ([Figura R. 2.4 B](#)). Esta manipulación fue selectiva de la capa de fibras olfatorias, dado que se mantuvo la expresión de Cx43 en la capa de leptomeninges descrita en el capítulo 1 de esta tesis ([R.1.3](#)). Al analizar la densidad de células en la capa de fibras olfatorias para animales Cx43 cKO y Control, no se observaron diferencias entre grupos, lo que sugiere que la reducción de Cx43 no se debe a la muerte de células de la capa de fibras olfatorias ([Figura R. 2.4 C](#)).

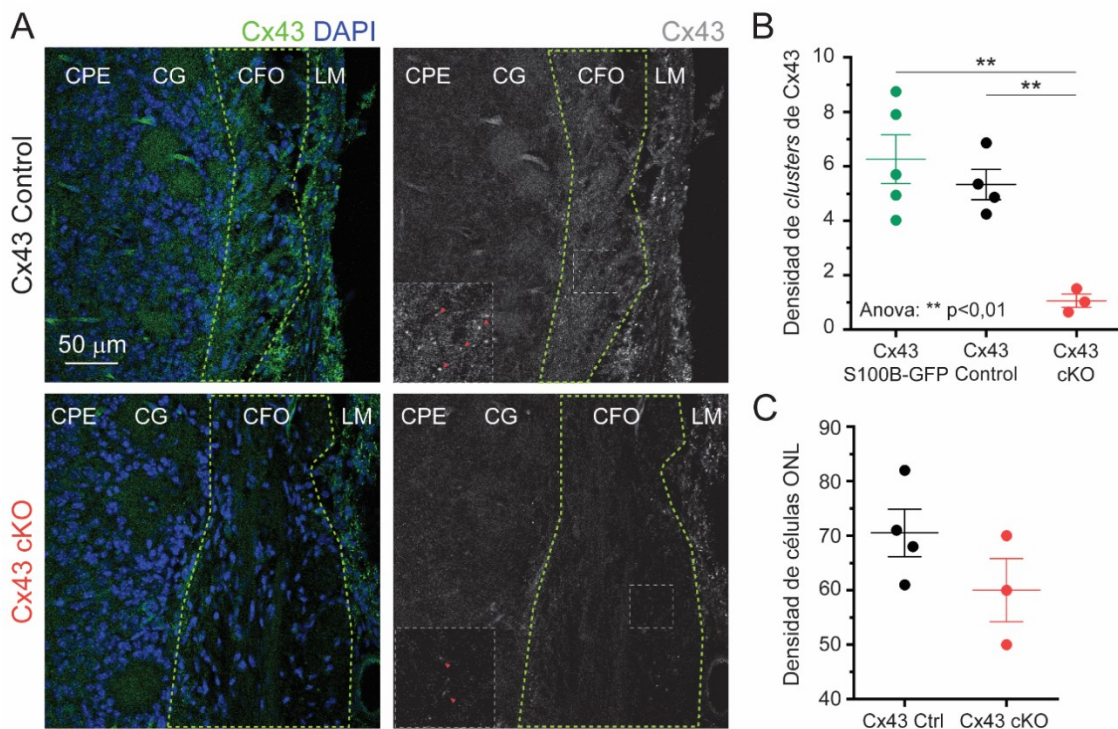


Figura R. 2.4. Disminución en la expresión de Cx43 en la capa de fibras olfatorias en animales Cx43 cKO de edad neonatal. A. Imágenes representativas de una inmunofluorescencia contra Cx43 en el bulbo olfatorio de animales de genotipo Cx43

Control y Cx43 cKO de edad P7, inyectados con una dosis diaria de Tx 50 mg/kg a P5 y P6. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI) y la marca de Cx43 en verde y en escala de grises. En el recuadro ampliado se indican con flechas rojas *clusters* de Cx43. **B.** Densidad de *clusters* de Cx43 (*clusters* cada 100 μm^2) en la capa de fibras olfatorias del bulbo olfatorio en animales P7 de la línea S100B-GFP y de los grupos Cx43 Control y Cx43 cKO. Se utilizó el análisis de ANOVA de una vía, $**p < 0,01$. Se utilizó el test pos-hoc de Holm-Sidak para comparaciones múltiples; $**p < 0,01$. Número de animales: S100B-GFP, n=5; Cx43 Control, n=4; Cx43 cKO, n=3. **C.** Densidad de células totales en la capa de fibras olfatorias de animales Cx43 Control y Cx43 cKO, expresada en número de células cada $\times 100/\text{mm}^2$. Se utilizó el análisis de Mann-Whitney, $p > 0,05$. Número de animales: Cx43 Control, n=4; Cx43 cKO, n=3.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el modelo de delección condicional inducible de Cx43 en células que expresan PLP1 permite disminuir su expresión de manera significativa en la capa de fibras olfatorias de animales neonatos. Adicionalmente, permite inferir que dos días consecutivos de inyección de Tx previos al sacrificio son suficientes para observar una reducción en la expresión de Cx43, por lo que avala este protocolo de inducción en animales de edad posnatal más temprana. Es pertinente mencionar que la delección de Cx43 en animales juveniles y adultos es dependiente del tratamiento con Tx ⁵, hecho que resta confirmar en animales de edad neonatal.

3.2.3. La Cx43 es una molécula central en la formación de redes de glía envolvente olfatoria a edades tempranas del desarrollo posnatal

Los resultados mostrados en la [sección 1.2](#) indican que a edades neonatales las células de glía envolvente olfatoria forman redes gliales acopladas y que la Cx43 podría estar involucrada en estos mecanismos al menos desde P2. Para evaluar si en el caso de animales de edad neonatal la Cx43 tiene un rol en la formación de *gap junctions* en la glía envolvente realizamos experimentos acople de colorante en animales de los grupos Cx43 Control y Cx43 cKO a edades tempranas del desarrollo posnatal (P2 a P11). La inducción con Tx se hizo mediante inyecciones diarias desde P0 a P2 en toda la descendencia y los resultados fueron asociados a los grupos correspondientes a partir de la genotipificación previa al sacrificio.

Se procedió a determinar el tamaño de las redes de glía envolvente mediante la técnica de acople por colorante, colocando en la pipeta de registro

una combinación de Lucifer Yellow (LY) y Neurobiotina (NB). La introducción de ambos trazadores permite monitorear la difusión de colorante durante el registro y la morfología típica de la glía envolvente. Estos animales no expresan proteínas fluorescentes como guía para identificar a estas células que fueron identificadas en estos experimentos mediante la observación directa de LY. La caracterización de la red se realizó mediante el revelado de NB a posteriori, que es de menor peso molecular y difunde más fácilmente. No se detectaron diferencias entre el tamaño de las redes reveladas mediante la difusión de LY y la de Sulforodamina-B utilizada en la [sección 1.2](#), para animales de semana 1 del desarrollo posnatal (LY: 5 ± 1 células, n=4 ensayos; SR: 12 ± 2 células, n=7; test no paramétrico de Mann-Whitney, $p > 0,05$). En este caso, fue preferible utilizar LY en lugar de Sulforodamina-B, porque presenta una estructura química que permite su mejor fijación luego del registro. Se realizó un experimento de acople por colorante en cada rodaja de bulbo utilizada, por lo que se asume que todas las células con marca corresponden a la misma red. Analizamos, en primer lugar, la difusión de LY a partir de videos obtenidos en el *setup* de registro. Luego realizamos un análisis de la distribución de NB en mayor detalle por microscopía confocal. Se utilizaron animales de los grupos Cx43 Control y Cx43 cKO, inyectados con Tx durante P0-2.

Para el análisis del tamaño de las redes mediante la difusión de LY, luego de 10 minutos de difusión del colorante se grabaron videos con el microscopio de registro, a partir de los cuales se cuantificó el tamaño de las redes gliales para animales de 1 semana y 2 semanas de edad ([Figura R. 2.5](#)).

Se observó que para los animales del grupo Cx43 Control, la mayoría de las células registradas presentaron células cargadas con LY en su vecindad ([Figura R. 2.5 A](#)), mientras que en el caso de células procedentes de animales Cx43 cKO, en ningún caso a excepción de uno, se encontraron células acopladas. Las redes del grupo Cx43 Control de la semana 1 no mostraron diferencias de tamaño con las de animales de la semana 2 ([Figura R. 2.5 B](#)). En los animales Cx43 cKO se redujo dramáticamente la probabilidad de encontrar redes en comparación con los animales Cx43 Control ([Figura R. 2.5 B](#)). Este resultado es independiente de la edad posnatal, sugiriendo que desde la semana 1 de edad, la Cx43 participa de la conectividad glial mediada por *gap junctions*.

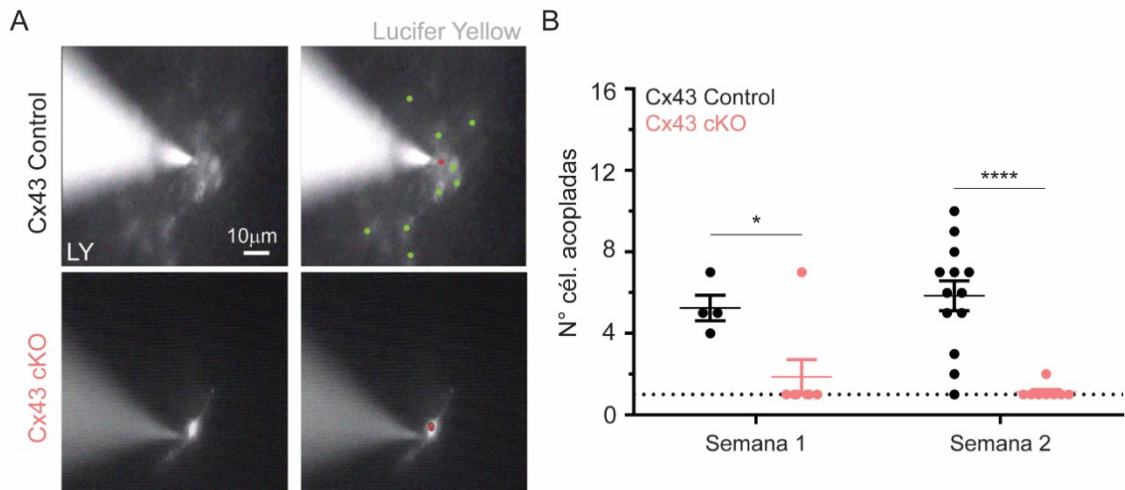


Figura R. 2.5. Los animales Cx43 cKO de edad neonatal no revelan redes gliales mediante la difusión del colorante Lucifer Yellow. **A.** Se muestran imágenes representativas del canal de fluorescencia verde (Lucifer Yellow - LY) durante el registro de células de glía envoltorio olfatoria obtenidas a partir de rodajas de BO procedentes de un animal Cx43 Control y de un animal Cx43 cKO. Arriba: Para el caso del animal Cx43 Control se observan células marcadas con LY (puntos verdes en el panel de la derecha) adyacentes a la célula registrada (punto rojo). Abajo: Para el animal Cx43 cKO se observa que la única célula marcada con LY es la célula registrada. **B.** Número de células acopladas para animales de semana 1 (P2-6) y semana 2 (P7-11) de los grupos Cx43 Control y Cx43 cKO. Número de células, animales: semana 1 - control: n= 4, 4; semana 1 - cKO: n= 5, 4; semana 2 - control: n= 13, 7; semana 2 - cKO: n= 8, 3. Cada punto representa un experimento de acople diferente. La línea punteada corresponde al valor 1 en el eje de ordenadas. ANOVA de 2 vías: factor Grupo ****p<0,0001. Se utilizó el test pos-hoc de Sidak para comparaciones múltiples; *p<0,05, ****p<0,0001.

Para evaluar si la ausencia de acople en la glía envoltorio de animales Cx43 cKO se mantenía analizando la difusión del trazador de menor peso molecular, evaluamos el tamaño de las redes de glía envoltorio a partir de la difusión de neurobiotina a partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal luego del revelado. Los resultados corresponden a animales de edades P7 a P11 ([Figura R. 2.6](#)). Se pudo comprobar que la NB es permeable por las *gap junctions* utilizadas por la glía envoltorio, lo cual no había sido evaluado previamente. Esto se evidenció al encontrar múltiples células (reconocidas por el marcador nuclear DAPI) con carga de neurobiotina, ubicadas en la cercanía de la célula registrada. La célula registrada fue identificada en cada red por ser la célula con mayor intensidad de fluorescencia dentro de la red.

Se graficó para cada red la intensidad de fluorescencia medida en cada soma de las células (identificado por la marca nuclear) en función de la distancia a la célula inyectada ([Figura R. 2.6](#) A, derecha). En los ejemplos representativos

se puede observar que la red de células correspondiente a un animal Cx43 Control tiene un mayor número de células marcadas en comparación con la red procedente de un animal Cx43 cKO. También, puede observarse que en la red representativa de animales Cx43 cKO se observan células marcadas con intensidad de fluorescencia alta (180 a 255 U.A.), en contraste con la red representativa de animales Cx43 Control.

Para una descripción poblacional, se muestra la intensidad de marca del trazador de cada célula en función de la distancia a la célula registrada, para todas las redes superpuestas de ambos grupos ([Figura R. 2.6 B](#)), donde se muestran las células con marca de NB en rosa y las células sin difusión de colorante (intensidad subumbral) en gris. Se puede observar que para el grupo Cx43 Control hay una mayor proporción de células marcadas con neurobiotina que para el grupo Cx43 cKO. En su mayoría las células con intensidad de fluorescencia baja a media se ubican más alejadas de la célula registrada que las células más brillantes para ambos grupos (correlación de Spearman significativa: Cx43 Control **** $p < 0,0001$; Cx43 cKO *** $p < 0,001$). En el caso de las redes de animales Cx43 cKO, se ve un desbalance pronunciado entre el gran número de células con intensidad de neurobiotina subumbral y las pocas células con fluorescencia supraumbral, siendo significativamente diferente a la proporción encontrada para el grupo Cx43 Control ([Figura R. 2.6 C](#)). Para cada caso, se calculó el porcentaje de células positivas para neurobiotina, respecto del total de células en la vecindad de la célula registrada y se realizó una comparación entre grupos. En los animales Cx43 cKO este porcentaje fue menor que en el grupo Cx43 Control y por lo tanto, la probabilidad de conexión es significativamente menor ([Figura R. 2.6 D](#)).

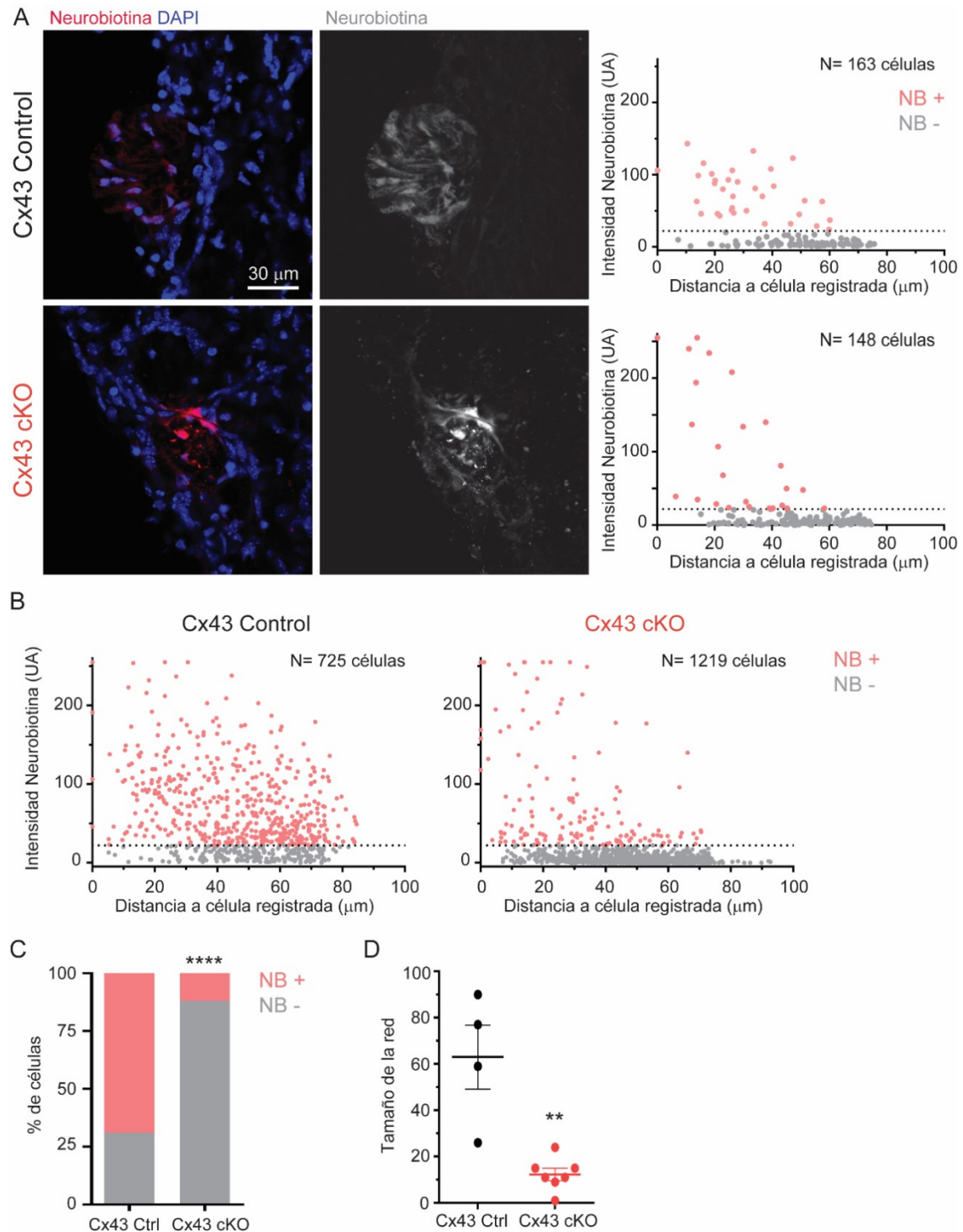


Figura R. 2.6. La Cx43 media la formación de redes de glía envolvente olfatoria de animales neonatos. A. Se realizaron experimentos de acople con neurobiotina en células de glía envolvente en rodajas de bulbo olfatorio de ratones Cx43 Control y Cx43 cKO de edad P7-11 tratados con tamoxifeno 50 mg/kg a P0-1. Se muestran imágenes representativas de redes de glía envolvente de animales de cada grupo, obtenidas por microscopía confocal, correspondientes a un plano en el eje Z donde se ve la marca nuclear con DAPI (azul) y Neurobiotina (NB, en rojo y escala de grises). A la derecha se muestra la intensidad de marca de NB para cada célula identificada por la marca nuclear en función de la distancia la célula registrada, determinadas a partir de las imágenes representativas. Cada célula está representada por un punto. Las células consideradas NB+ se indican en rosa, mientras que las que tienen valores de intensidad que

corresponden al *background* se indican en gris (umbral: 22 U.A.). **B.** Se muestran gráficos poblacionales de intensidad de marca en función de la distancia a la célula registrada para todas las redes analizadas superpuestas, para ambos grupos. Cx43 Control n=4 redes, 3 animales; Cx43 cKO n=7 redes, 3 animales. **C.** Se muestra la proporción de células, expresada en % de células, con intensidad subumbral (NB-) y supraumbral (NB+) para los grupos Cx43 Control (n=4 experimentos, 3 animales) y Cx43 cKO (n=7 experimentos, 3 animales). Test exacto de Fisher: ****p<0,0001. **D.** Porcentaje de células en el área de interés con una intensidad de neurobiotina mayor al *background* para los grupos Cx43 Control (n=4 experimentos, 3 animales) y Cx43 cKO (n=7 experimentos, 3 animales). Test de Mann-Whitney: **p<0,01.

Para descartar que las diferencias en la probabilidad de acople se debieran a diferencias en el número potencial de células disponibles para conectarse en la vecindad de las células registradas, se cuantificó el número de células promedio consideradas para cada experimento, identificadas por su marca nuclear, que fue de 181 ± 45 células para las redes provenientes de animales Cx43 Control y de 174 ± 29 células para las redes de animales Cx43 cKO. Estas diferencias no resultaron significativas (Mann-Whitney p>0,05).

Adicionalmente, para obtener una descripción de las redes que no estuviera sesgada por la definición de un umbral arbitrario para la marca del trazador, analizamos el tamaño de las redes utilizando los valores de intensidad de todas las células dentro del radio delimitado, sin aplicar un valor umbral. Para ello, para cada red teñida se construyó un histograma de frecuencia acumulada normalizado para los valores de intensidad de marca de neurobiotina medidos en cada célula, y se obtuvo un histograma promedio para cada grupo de animales ([Figura R. 2.7 A](#)).

Se observó un corrimiento marcado del histograma correspondiente al grupo Cx43 cKO hacia la izquierda, con respecto al correspondiente al grupo control, lo cual indica que la mayoría de las células de animales Cx43 cKO presentan baja marca de neurobiotina.

Para comparar estadísticamente los grupos, se extrajo de los histogramas de frecuencia acumulada el valor de mediana de la distribución de intensidades para cada red. El análisis comparativo de las medianas de cada grupo arrojó como resultado que el valor de intensidad mediana es significativamente mayor para el grupo Cx43 Control que para el grupo Cx43 cKO ([Figura R. 2.7 B](#)).

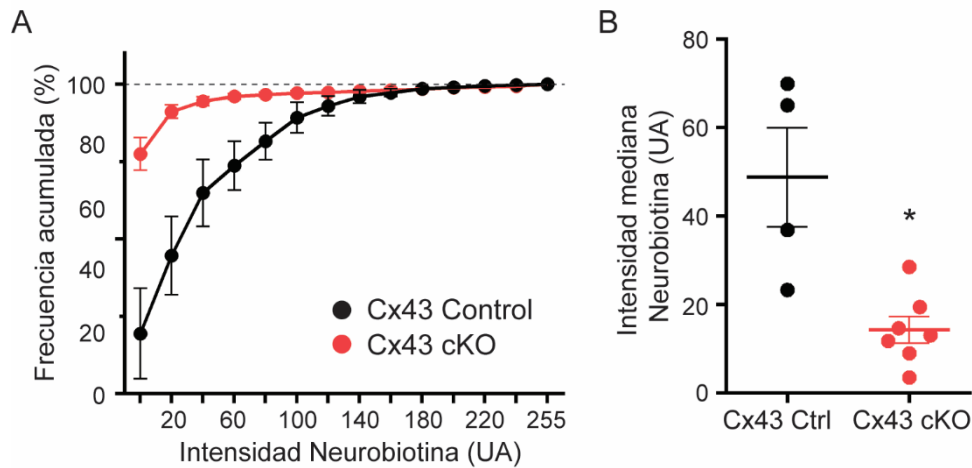


Figura R. 2.7. Análisis no sesgado de la difusión de neurobiotina en la glía envolvente de animales Cx43 cKO. **A.** Histogramas de frecuencia acumulada relativa promedio en función de la intensidad de neurobiotina para las células procedentes de redes de animales Cx43 Control (n=4 redes, 3 animales) y Cx43 cKO (n=7 redes, 3 animales). **B.** Valor mediano de la intensidad de neurobiotina para las células de redes de animales Cx43 Control y Cx43 cKO, obtenido a partir de los histogramas de frecuencia acumulada relativa. Test de Mann-Whitney: *p=0,0121.

En resumen, los resultados nos permiten afirmar que las redes de glía de animales Cx43 cKO son de menor tamaño que las del grupo Cx43 Control. Las caracterizaciones de las redes de glía envolvente utilizando LY y NB son complementarias y consistentes con la diferencia de peso molecular de dichos trazadores. En conjunto, los resultados presentados aportan evidencia de que la Cx43 es una molécula necesaria para la conformación de *gap junctions* en las células de glía envolvente, que median la formación de redes permeables a moléculas pequeñas desde la primera semana del desarrollo posnatal.

3.2.4. La delección de la Cx43 de la glía envolvente de animales neonatos se asocia con parámetros electrofisiológicos de desconexión de *gap junctions*

Animales de edad juvenil y adulta con el mismo tipo de manipulación que la utilizada en esta tesis manifiestan indicadores electrofisiológicos de disfunción de *gap junctions*, tales como una disminución de la corriente total de membrana y menor sensibilidad al bloqueante de *gap junctions* MFA ⁵.

En esta sección buscamos evaluar si en animales de edad neonatal se encuentra evidencia de la presencia de Cx43 en membrana a partir del análisis

de indicadores electrofisiológicos en la glía envolvente. Se realizaron registros electrofisiológicos en rodajas agudas de bulbo olfatorio de los grupos Cx43 cKO y Cx43 control, agregando el colorante LY a la pipeta de registro.

En primer lugar, analizamos posibles diferencias en la respuesta a pulsos de voltaje de las células de animales Cx43 Control (con trasfondo genético de la línea PLP-CreERT) con la línea S100B-GFP, descrita en la [sección R.1.2](#). Las células de animales Cx43 Control presentaron perfiles de corriente similares a las células registradas de animales S100B-GFP del mismo rango de edades ([Figura R. 2.8](#)), lo que indica un comportamiento electrofisiológico similar de la glía envolvente en las dos líneas transgénicas.

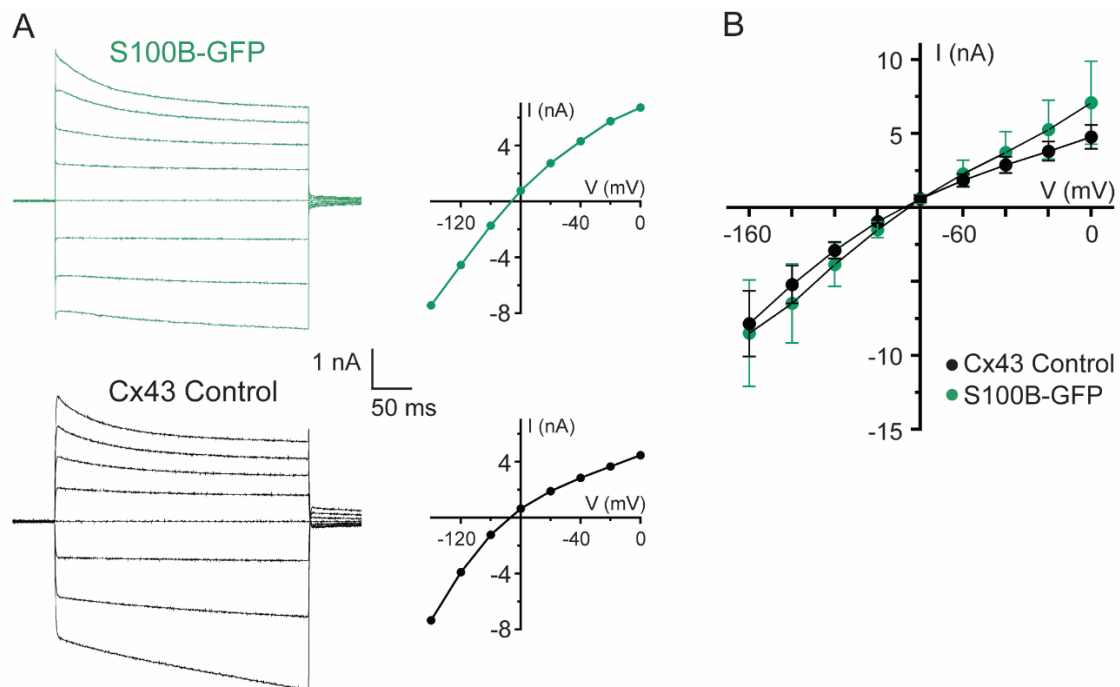


Figura R. 2.8. Comparación del perfil electrofisiológico de la glía envolvente olfatoria en animales S100B-GFP y Cx43 Control. **A.** Se realizaron registros electrofisiológicos de células de GEO a partir de rodajas de bulbo olfatorio en la capa de fibras olfatorias de animales Cx43 Control y S100B-GFP de edad P5-11. Se muestran registros representativos de corriente total en respuesta a un protocolo de *voltaje-clamp* (-140 a 0 mV) de una célula de un animal Cx43 Control y uno S100B-GFP, junto con su curva I/V. **B.** Curvas I/V construidas a partir de la corriente total en respuesta a distintos escalones de voltaje (-160 a 0 mV) de células de GEO de animales Cx43 Control (n=6) y S100B-GFP (n=5) de edad P5 a P11. ANOVA de dos vías de medidas repetidas: $p > 0.05$ para la interacción y el factor grupo.

En la [Figura R. 2.9](#) A se muestran registros representativos de 2 células de glía envolvente, correspondientes a los grupos Cx43 Control y Cx43 cKO,

respectivamente, donde se ve que la amplitud de las corrientes macroscópicas de la célula proveniente de un animal del grupo Cx43 cKO es marcadamente menor que para el grupo Cx43 Control. Este efecto se confirmó a nivel poblacional al analizar las curvas I/V promedio de cada grupo ([Figura R. 2.9 B](#)). La conductancia macroscópica de las células Cx43 cKO fue en promedio un 85% menor que la del grupo Control ([Figura R. 2.9 C](#)).

Dado que en animales juveniles la linealidad de la curva IV se reduce al desacoplar las *gap junctions* con MFA ³, se ajustó una regresión lineal a la curva I/V de cada célula registrada con el objetivo de describir la linealidad de las mismas. Se observó que la bondad del ajuste (R^2 promedio) para las células del grupo Cx43 Control fue $R^2 = 0.9634 \pm 0.0139$, y para el grupo Cx43 cKO fue $R^2 = 0.8970 \pm 0.0455$. Esta diferencia no fue significativa (Mann-Whitney, $p > 0.05$, $N = 6$ para ambos grupos).

El análisis del potencial de reposo (V_r) arrojó que ambos grupos presentaron un rango de V_r característico de células gliales, sin diferencias significativas entre las células de animales Cx43 cKO y Cx43 Control ([Figura R. 2.9 D](#)). Sin embargo, es notable que existe una mayor variabilidad en los datos del V_r del grupo Cx43 cKO (Coeficiente de variación - CV: 14,17%) en comparación con el grupo Cx43 Control (CV: 3.35%). Este fenómeno podría estar asociado al desacople eléctrico de la red, donde la glía envolvente de animales Cx43 cKO pueden expresar variaciones en su V_r no amortiguadas por la red ⁴.

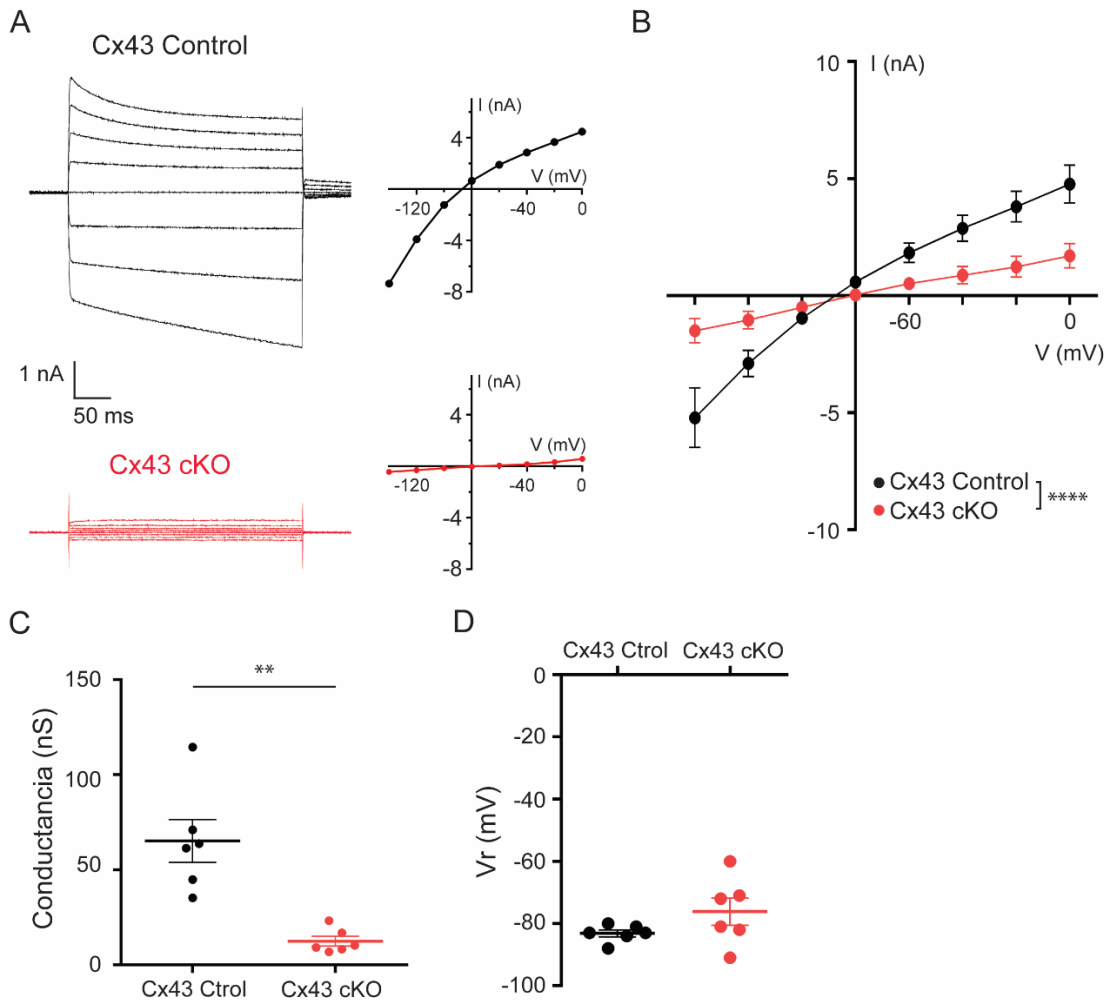


Figura R. 2.9. Impacto de la Cx43 en el perfil electrofisiológico de la glía envolvente olfatoria. **A.** Se realizaron registros electrofisiológicos de células de GEO a partir de rodajas de bulbo olfatorio en la capa de fibras olfatorias de animales Cx43 Control y Cx43 cKO de edad P5-11. Se muestran registros representativos de corriente total en respuesta a un protocolo de *voltaje-clamp* (-140 a 0 mV) de una célula de un animal Cx43 Control y uno Cx43 cKO. **B.** Curvas I/V construidas a partir de la corriente total en respuesta a distintos escalones de voltaje, de células de GEO de animales Cx43 Control (n=5) y Cx43 cKO (n=5). ANOVA de dos vías de medidas repetidas: $p < 0,0001$ para la interacción entre los factores grupo y voltaje. **C.** Conductancia macroscópica calculada a partir de la curva I/V de registros de glía envolvente de animales Cx43 Control (n=6) y Cx43 cKO (n=5). Test de Mann-Whitney: $**p < 0,01$, diferencias significativas entre los grupos. **D.** Valor de potencial de reposo de las células para los grupos Cx43 Control (n=6) y Cx43 cKO (n=6). Test de Mann-Whitney: $p > 0,05$, diferencias no significativas entre los grupos.

Consistente con lo anterior, la resistencia de entrada (R_i) de las células procedentes de animales Cx43 cKO fue significativamente mayor (Mann-Whitney, $**p < 0,01$) que la de las células Cx43 Control (mediana 86,3 M Ω y 16,55 M Ω , respectivamente).

En conjunto, estos resultados muestran que las células de glía envolvente de los animales Cx43 cKO tienen propiedades electrofisiológicas comparables a las descritas en animales juveniles y adultos ⁵ como características de células de glía envolvente con acople reducido vía *gap junctions*, tales como corriente total de menor amplitud, mayor Ri y menor conductancia total. Esto sugiere que la Cx43 no solo media las redes de glía envolvente en ratones juveniles y adultos, sino también en neonatos.

3.2.5. Evaluación de la capacidad olfativa de ratones de edad neonatal

La expresión de Cx por parte de la glía es esencial para sus efectos moduladores sobre la función neuronal. Es posible que la Cx43 de la glía envolvente soporte funciones tales como el mantenimiento de la homeostasis extracelular, la provisión de metabolitos energéticos y la liberación concertada de neurotrofinas. Nuestro grupo ha encontrado evidencias de que la falta de expresión de la Cx43 en la glía envolvente olfatoria de animales adultos genera signos de hiposmia en un test de conducta olfativa ¹⁸. En el contexto de esta tesis, nos propusimos establecer condiciones para evaluar si la expresión de Cx43 en la glía envolvente olfatoria durante el desarrollo posnatal del bulbo es necesaria para la función olfativa también.

En la literatura se han descrito algunos *tests* que permiten evaluar la capacidad olfativa de los animales neonatos utilizando conductas presentes en dichos animales ³¹¹⁻³¹⁴. En nuestro caso, requeríamos un test que nos permitiera evaluar un rango de edades desde la primera hasta la segunda semana de edad posnatal, para evaluar posibles diferencias de desempeño en animales experimentales del grupo Cx43 cKO en comparación con animales control. Desde el nacimiento, las crías de roedores que son separadas del nido emiten vocalizaciones ultrasónicas que modulan el comportamiento materno ^{315,316} y que actúan como guía para la localización de la cría y la devolución al nido ³¹⁷. Las vocalizaciones ultrasónicas son inhibidas por estímulos olfativos como el citral ³⁰⁴, son producidas en animales desde P1, pueden registrarse con equipamiento no sofisticado y no requieren de una capacidad locomotora desarrollada ^{304,318}.

Procedimos a replicar un test de olfacción para ratones de edad neonatal basado en la inhibición de vocalizaciones ³⁰⁴ ([sección M.2.8](#)).

En una primera cohorte de animales, se realizó el test en ratones de la línea transgénica S100B-GFP, de edad P8. Para ello se dispuso de una cámara insonorizada con un micrófono para el rango de ultrasonido (de 40 a 120 kHz) conectado a una computadora de registro, y un dispositivo con una zona para alojar al ratón a evaluar y una plataforma para la presentación de distintos olores (ver [sección M.2.8.1](#)). El protocolo constó de la presentación de un olor neutral (ON) durante 90 segundos y la presentación de un segundo olor “prueba” durante 150 segundos ([Figura R 2.10](#)). El olor neutral utilizado fue agua y el estímulo inhibitorio de las vocalizaciones, citral (C), se presentó como una dilución 1:10 en aceite mineral. Cada animal fue expuesto primero al protocolo donde el olor “prueba” fue una repetición de la presentación de agua (ON:ON) y luego al protocolo donde el olor “prueba” fue citral (ON:C). En la [figura R.2.10A](#) se pueden observar dos registros representativos de las vocalizaciones ultrasónicas emitidas por un mismo ratón ante el protocolo ON:ON (izquierda) y el protocolo ON:C (derecha). Se indica con una flecha naranja el momento de cambio del estímulo olfativo. Se puede ver que en el registro que corresponde al protocolo ON:ON los eventos de vocalizaciones emitidos durante los primeros 90 segundos de registro se mantienen luego del cambio al olor “prueba”, mientras que ese mismo animal ante el protocolo ON:C silencia las vocalizaciones ultrasónicas frente a la presentación de citral. Este fenómeno ya descrito para animales de esta misma edad de la cepa salvaje C57/BL6 ³⁰⁴, puede verse reproducido en la población de animales analizados ([Figura R.2.10B](#)), en la que el número de vocalizaciones se reduce después de la presentación de citral ([Figura R.2.10B](#), derecha).

Para el análisis estadístico comparamos las ventanas de 30 segundos inmediatamente previa y posterior a la presentación del estímulo “prueba” ([Figura R.2.10C](#)). Observamos que el protocolo ON:ON no altera el número de vocalizaciones emitida por los ratones. Por el contrario, con el protocolo ON:C ocurre un descenso significativo del número de vocalizaciones luego del cambio de olor neutral a estímulo citral. Para caracterizar la respuesta al estímulo de prueba, definimos un índice de respuesta ante el cambio de estímulo odorante

(Figura R.2.10D). Ante un descenso del número de vocalizaciones luego de la presentación del citral, el índice de respuesta toma valores menores a 1, significativamente menores al índice de respuesta que obtuvimos para los mismos animales en el protocolo ON:ON. Estos resultados indican que la sensibilidad de las vocalizaciones ultrasónicas al citral en animales de edad neonatal se reproducen en la línea S100B-GFP.

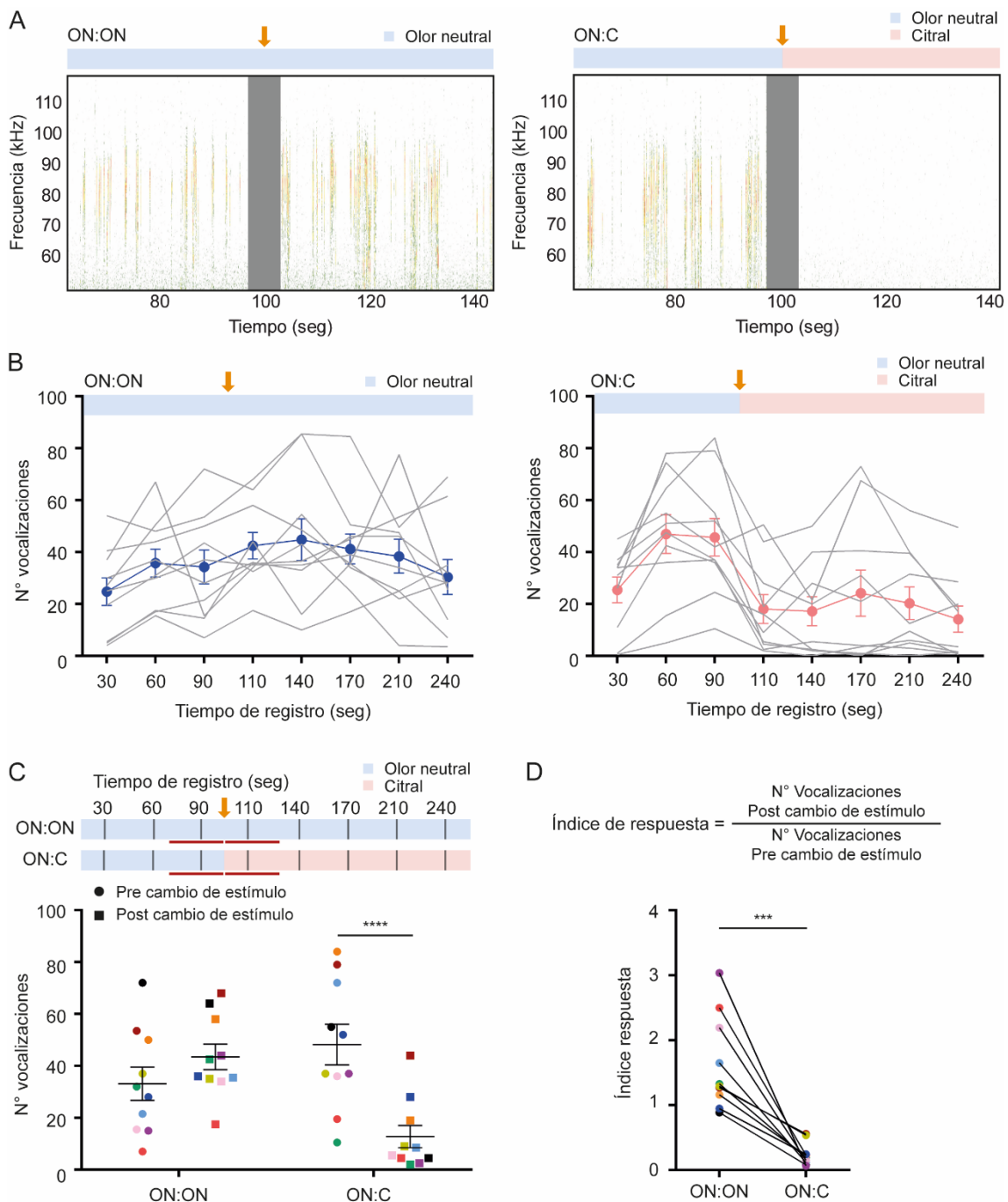


Figura R.2.10. Efecto de la presentación del estímulo olfativo citral en el número de vocalizaciones ultrasónicas en animales de edad neonatal de la línea S100B-GFP. A. Registros representativos de vocalizaciones ultrasónicas obtenidos a partir de

un animal S100B-GFP de edad posnatal P8 en un protocolo de presentación de un estímulo neutral (agua, izquierda), y un protocolo de presentación de citral (derecha), a los 90s del test. La presentación del estímulo está indicada por una flecha naranja. **B.** Análisis del número de vocalizaciones cuantificadas en ventanas de 30 segundos, durante todo el registro para el protocolo de presentación de olor neutral a olor neutral (ON:ON) a la izquierda, y para el protocolo de presentación de olor neutral a citral (ON:Citral) a la derecha. El cambio de estímulo a los 90 seg. se indica con la flecha naranja. N =10 animales. Se muestran los registros de cada animal en gris y el promedio en color. **C.** Comparación del número de vocalizaciones ultrasónicas para ambos protocolos, cuantificadas en las ventanas previa y posterior al cambio de estímulo (indicadas en rojo). Se identifica a cada animal con un color diferente. Se analizaron los resultados mediante una ANOVA de dos vías con medidas repetidas, con interacción significativa **** $p < 0,0001$; análisis pos-hoc de Sidak, *** $p < 0,001$. **D.** Se calculó para cada animal un índice de respuesta que relaciona el número de vocalizaciones posterior y previo al cambio de estímulo. Mediante un test t de Student de medidas repetidas se encontraron diferencias significativas entre los índices de respuesta para ambos protocolos, *** $p < 0,001$.

Para evaluar si este test detecta la incapacidad para distinguir olores, lo aplicamos a animales neonatos tratados con metimazol (MMZ), una droga anti-tiroidea con un efecto secundario olfatotóxico ³¹⁹ que elimina gran parte de las células del epitelio olfatorio, incluidas las neuronas sensoriales maduras e inmaduras, a excepción de las células madre del epitelio. El curso temporal e histológico de la degeneración y posterior regeneración del epitelio olfatorio se encuentra ampliamente estudiado en ratones adultos ^{320–322} y de edad neonatal ^{300,320}. Adicionalmente, los animales tratados con MMZ muestran, producto de la degeneración del epitelio olfatorio, hiposmia transiente que se traduce en una disminución marcada de la capacidad olfativa ^{292,294,296}.

Realizamos una nueva serie de experimentos con animales de la línea S100B-GFP tratados con MMZ o solución salina a P5 y sometidos a la prueba conductual a P10 ([Figura R. 2.11A](#)), cuando se espera que el epitelio olfatorio continúe degenerado y con déficit de neuronas sensoriales maduras ³²⁰. En la [Figura R. 2.11B](#) se muestra la cuantificación de la emisión de vocalizaciones para los animales tratados con solución salina y MMZ durante los protocolos ON:ON (izquierda) y ON:C (derecha). Al comparar el número de vocalizaciones antes y después del cambio de estímulo ([Figura R. 2.11C](#)), observamos que la capacidad de emitir vocalizaciones ultrasónicas de los animales tratados con MMZ frente al protocolo control ON:ON se mantuvo intacta e indistinguible de la del grupo tratado con salina. Como era de esperar, ante la presentación del protocolo ON:C el grupo tratado con solución salina manifestó un silenciamiento

de las vocalizaciones emitidas luego de la presentación de citral como olor “prueba”. Sorprendentemente, el grupo de animales tratados con MMZ respondió de manera indistinguible de la del grupo tratado con solución salina ante la presentación de citral ([Figura R. 2.11C](#), derecha). Este comportamiento también se vio reflejado en el análisis del índice de respuesta para los protocolos ON:ON y ON:C ([Figura R. 2.11D](#)), en el que se observan diferencias significativas entre los índices respuesta de los protocolos, pero no así entre los grupos de animales tratados con solución salina y MMZ. Ambos tratamientos muestran un índice de respuesta al protocolo ON:C significativamente diferente y menor al índice respuesta del protocolo ON:ON. Esto indica que ambos grupos silencian la emisión de vocalizaciones ultrasónicas frente a la presentación de citral.

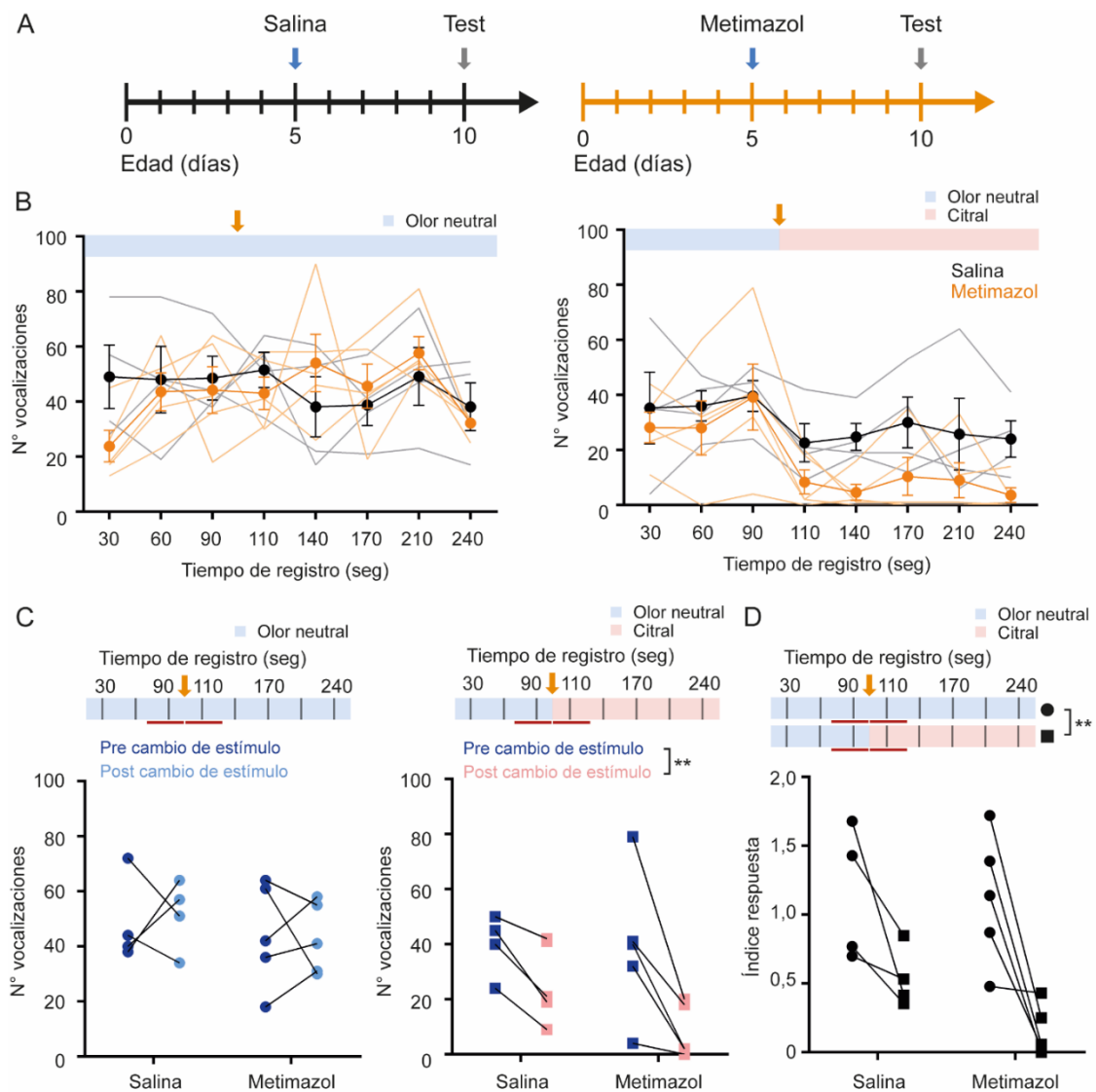


Figura R. 2.11. Análisis del efecto de la presentación del estímulo olfativo citral en el número de vocalizaciones ultrasónicas en animales tratados con metimazol. A. Se muestra el protocolo utilizado para la generación de un modelo de anosmia

transciente, mediante la inyección de metimazol o solución salina a animales de edad P5. Se testearon a los animales a edad P10. **B.** Cuantificación del número de vocalizaciones en ventanas de 30 segundos, durante todo el registro para el protocolo de presentación de Olor Neutral a Olor Neutral (ON:ON) a la izquierda, y para el protocolo de presentación de Citral (ON:Citral) a la derecha, para los grupos Salina (negro, N=4) y Metimazol (naranja, N=5). El cambio de hisopo a los 90 seg. se indica con la flecha naranja. **C.** Comparación del número de vocalizaciones ultrasónicas para ambos protocolos (ON:ON y ON:C), cuantificadas en las ventanas previa y posterior al cambio de estímulo (indicadas en rojo) para los grupos Salina y Metimazol. Se analizaron los resultados mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas. A la izquierda (ON:ON): factores Presentación del estímulo, Tratamiento e Interacción: $p > 0,05$. A la derecha (ON:C): factores Tratamiento e Interacción: $p > 0,05$, factor Presentación del estímulo: $**p < 0,01$. **D.** Se calculó para cada animal un índice de respuesta que relaciona el número de vocalizaciones posterior y previo al cambio de estímulo para los grupos Salina y Metimazol, tanto para el protocolo ON:ON (indicado en círculos), como el protocolo ON:C (indicado en cuadrados). Se analizaron los resultados mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas, factores Tratamiento e Interacción: $p > 0,05$, factor Protocolo: $**p < 0,01$.

Estos resultados no concuerdan con lo que esperábamos del comportamiento conductual del grupo tratado con MMZ, con una conducta olfativa deficiente en este test, reflejado en una inhibición de la respuesta de silenciamiento de las vocalizaciones frente a la presentación de citral. Ante estos resultados inesperados nos preguntamos si es posible que el test de silenciamiento de las vocalizaciones frente a la presentación de citral no fuese sensible ante un déficit de la capacidad de detección de olores y presentamos una discusión de posibles hipótesis a evaluar en la [Discusión](#) de esta tesis. Dado que la evaluación conductual de la conducta olfativa en neonatos mediante este ensayo necesita de confirmación de su sensibilidad a la anosmia experimental, queda para trabajo futuro determinar las condiciones necesarias para su aplicación. Si será suficiente con utilizar otros estímulos de prueba o si debe migrarse a otro ensayo, queda sin determinar esta tesis y, por lo tanto, no se realizó la evaluación conductual en los animales Cx43 cKO.

3.2.6. Conclusiones del Capítulo 2

Los resultados presentados señalan, en primer lugar, que la línea PLP-CreERT permite manipular la expresión de genes en la glía envolvente olfatoria desde edad neonatal. Tanto la caracterización a edad juvenil como a edad posnatal, señalan que esta línea dirige la expresión de genes principalmente a células localizadas en la capa de fibras olfatorias, y que esas células expresan

principalmente marcadores de glía envolvente, al menos en edad juvenil. Adicionalmente, mediante esta línea se pudo dirigir una manipulación para lograr una reducción de la expresión de Cx43 en la capa de fibras olfatorias de animales neonatos, al cruzarla con la línea Cx43^{flox}. Se encontró que la delección del gen de Cx43 en células que expresan PLP generó en la glía envolvente una reducción dramática de la conductancia total en registros electrofisiológicos, compatible con la disminución del tamaño de las redes gliales. Todos estos resultados indican que la Cx43 es una molécula central en la formación de *gap junctions* entre células de glía envolvente olfatoria durante el desarrollo posnatal.

3.3. Capítulo 3: La Cx43 es un marcador temprano de la privación sensorial durante el desarrollo posnatal

El tratamiento de privación sensorial por oclusión unilateral de nariz es un modelo utilizado para estudiar cómo el desarrollo posnatal del bulbo olfatorio depende de la actividad sensorial. En el contexto de esta tesis nos propusimos evaluar si las células gliales del bulbo son sensibles a la privación sensorial durante el desarrollo posnatal temprano del mapa sensorial, en especial, si la expresión de Cx es modulable por la actividad del circuito.

3.3.1. La expresión de tirosina hidroxilasa en la capa glomerular se reduce a partir de la tercera semana de privación sensorial

Una de las alteraciones más documentadas en la literatura producto de la privación sensorial olfativa es una marcada reducción en el número de interneuronas periglomerulares, en mayoría dopaminérgicas, que expresan la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Sin embargo, aún no se encuentra reportado si la marca histológica de TH es un indicador sensible para evaluar la eficacia de la privación sensorial temprano en el desarrollo posnatal.

Estudiamos la expresión de TH en animales de la línea PLP-CreERT;tdTomato con privación sensorial olfativa unilateral desde P0-1 durante las primeras 3 semanas posnatales (P5-7, P10-14 y P17-21, respectivamente). En este modelo el bulbo olfatorio ipsilateral a la oclusión resulta mayormente privado y el bulbo contralateral representa un control intraindividual. Analizamos distintos parámetros de la marca de TH a partir de imágenes obtenidas de tejido revelado contra TH mediante inmunofluorescencia hecha en cortes coronales que contenían el bulbo privado y el bulbo control de cada animal. En la [Figura R. 3.1 A](#) se muestra que las células dopaminérgicas glomerulares expresan la marca de TH en el cuerpo celular y en sus proyecciones hacia el neuropilo glomerular. Se compararon los lados privado y control en cuanto a la densidad de células positivas para TH ([Figura R. 3.1 B](#)), la intensidad de fluorescencia en el neuropilo glomerular ([Figura R. 3.1 C](#)) y el porcentaje del área de la sección glomerular ocupado por la marca de TH ([Figura](#)

[R. 3.1 D](#)). La densidad de células TH⁺ mostró una reducción en la semana 3 en el bulbo privado, con respecto al control ([Figura R. 3.1 B](#)). El mismo efecto se observó para los parámetros de intensidad media y cobertura de la marca de TH en el neuropilo glomerular, con diferencias significativas entre bulbo control y privado a las 3 semanas de privación sensorial ([Figura R. 3.1 C-D](#)). Cabe mencionar que para el bulbo control la marca de TH glomerular presentó un aumento significativo en función de la edad, ya descrito en la literatura, asociado a la maduración del circuito glomerular con la llegada de las interneuronas alrededor de P19-21¹¹³. Este aumento de la marca de TH asociado al desarrollo posnatal del bulbo, se encuentra impedido en el bulbo privado.

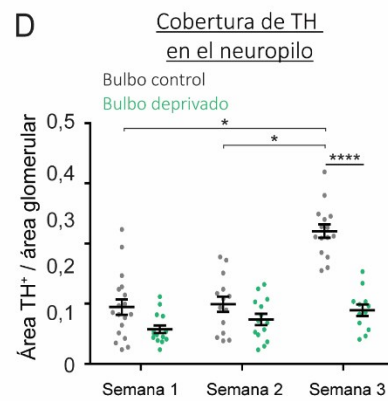
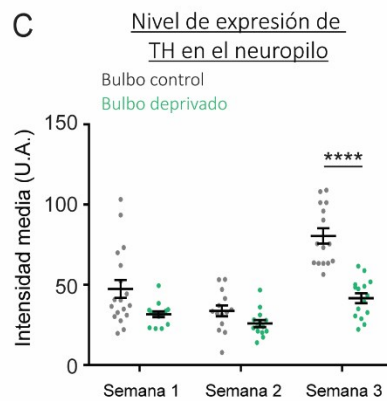
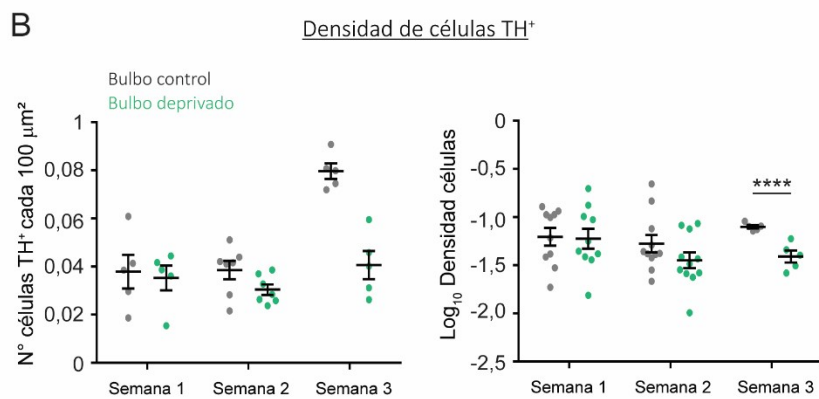
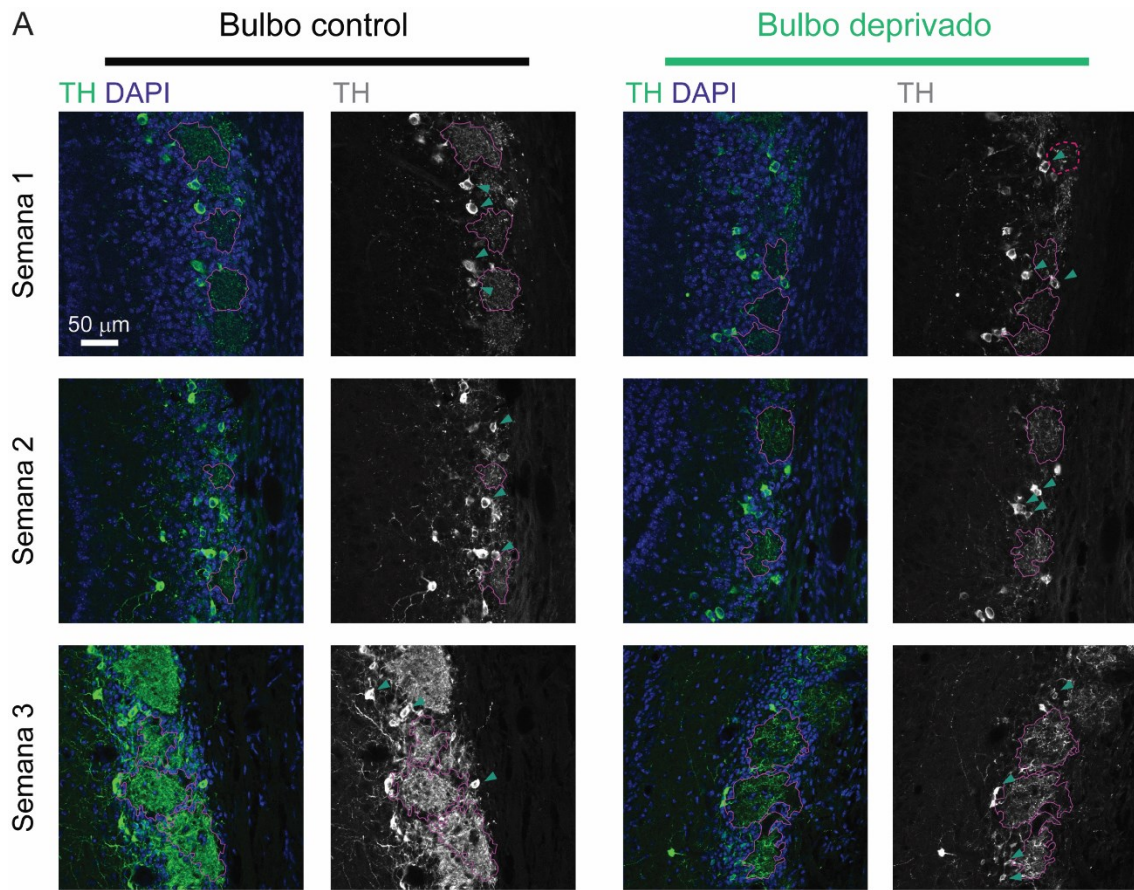


Figura R.3.1. Análisis de la expresión de TH luego de la deprivación sensorial durante el desarrollo posnatal. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra TH en el bulbo olfatorio de animales de la línea PLP-CreERT;tdTomato, con

oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5-7, P10-14, P17-21; semanas 1, 2 y 3 respectivamente). Se muestran el lado control y el lado privado de un mismo animal. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), y la marca de TH en verde y en escala de grises. Se indican con flechas verdes algunos cuerpos celulares con marca de TH y en magenta los glomérulos analizados. **B.** Análisis de la densidad de células TH⁺ en la capa glomerular (izquierda). En este caso, la variable no mostró una distribución normal de los datos, por lo que sufrieron una transformación para poder realizar el análisis correspondiente. Se muestra a la derecha la transformación de la densidad al logaritmo en base 10 de la densidad de células TH⁺, para el bulbo control y privado en función del desarrollo posnatal. **C.** Análisis de la intensidad de fluorescencia de TH en el neuropilo, para el bulbo control y privado en las 3 semanas. **D.** Análisis del área de cobertura de la marca de TH respecto al área glomerular, para el bulbo control y privado en función del desarrollo posnatal. **B, C y D.** Se utilizó un modelo lineal mixto, con varios datos para un mismo animal (N =3-4 animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías, considerando factores fijos a "semana" y "tratamiento", con "animal" como factor aleatorio. En caso de interacción significativa entre factores ($p < 0,05$) se realizó un análisis pos-hoc paramétrico para comparaciones múltiples; las diferencias significativas se indican en la figura, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

En conjunto, los resultados indican que la privación sensorial genera un impedimento para el aumento de la intensidad de marca de TH, del número de células TH⁺ y de su cobertura en el glomérulo, comenzando a partir de la tercera semana de oclusión y descartan la posibilidad de utilizar a la marca de TH como indicador temprano de la privación sensorial en este modelo.

3.3.2. Impacto de la privación sensorial en la glía envolvente olfatoria durante el desarrollo posnatal

La glía envolvente es capaz de responder a la estimulación de los axones de neuronas sensoriales con señales de Ca^{2+} ^{222,261} mediadas por glutamato y ATP ²⁸³. Esta respuesta es más prominente durante la primera semana posnatal, y decrece hacia la tercera semana posnatal ²⁸³. A partir de esta evidencia, nos propusimos evaluar si la glía envolvente olfatoria manifiesta respuestas a la privación sensorial mediante marcadores fisiológicos, con foco en la abundancia y morfología celular, y en la expresión de Cx43. Nos enfocamos en las primeras dos semanas del desarrollo posnatal, periodo durante el cual la expresión de Cx43 transiciona de niveles mínimos a niveles comparables a los del sistema maduro.

Para evaluar si la población de glía envolvente sufre remodelaciones tempranas debido a la privación sensorial, analizamos parámetros

descriptivos de la marca fluorescente reportada por la proteína tdTomato en cortes de bulbo olfatorio de animales de la línea PLP-CreERT;tdTomato con oclusión unilateral de narina entre P0 y P1, tratados con Tx de P1 a P3. Se analizaron el número de células positivas para tdTomato, la intensidad de expresión de tdTomato y el grado de cobertura de las proyecciones tdTomato en la capa de fibras olfatorias del bulbo control y privado de cada animal ([Figura R. 3.2](#)).

Los resultados muestran que la privación sensorial desde P0 no altera la densidad de células de la glía envolvente ([Figura R. 3.2B](#)), ni la intensidad de marca de tdTomato ([Figura R. 3.2C](#)), ni la cobertura de sus proyecciones ([Figura R. 3.2D](#)). Estos resultados indican que los parámetros medidos no son sensibles a la privación sensorial.

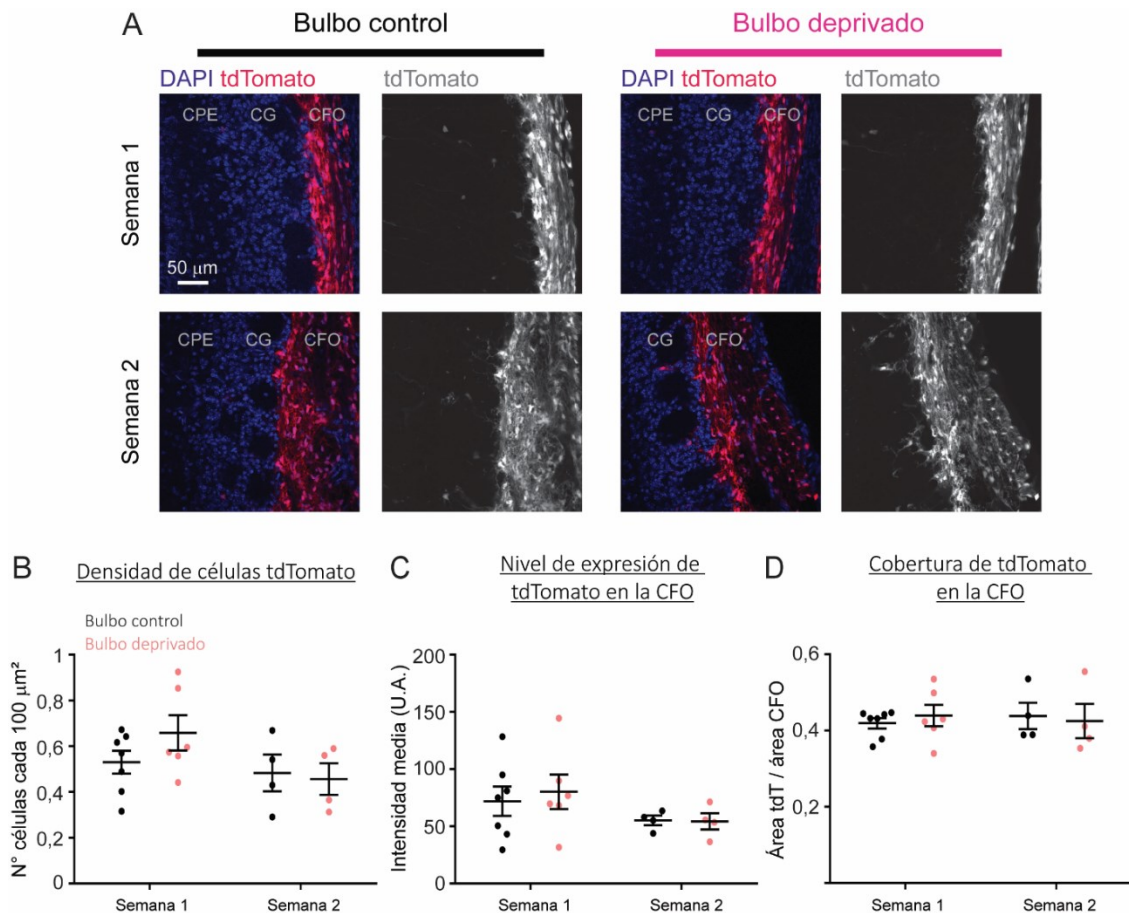


Figura R.3.2. Análisis de la expresión de tdTomato en animales PLP-CreERT;tdTomato con privación sensorial durante el desarrollo posnatal. A. Imágenes representativas de la expresión de tdTomato en el bulbo olfatorio de animales de la línea PLP-CreERT;tdTomato, con oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5, P10; semanas 1 y 2, respectivamente). Se muestra el lado control y privado de un mismo animal. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), y la marca de tdTomato en rojo y en escala de grises. Se muestran las capas:

externa plexiforme (CPE), glomerular (CG) y la de fibras olfatorias (CFO). **B.** Análisis de la densidad de células tdTomato en la capa de fibras olfatorias, para el bulbo control y privado para las 2 primeras semanas del desarrollo posnatal. **C.** Análisis de la intensidad de fluorescencia de tdTomato en la CFO, para el bulbo control y privado en las primeras 2 semanas del desarrollo posnatal. **D.** Análisis del área de cobertura de la marca de tdTomato con respecto al área de la CFO, para el bulbo control y privado para los mismos tiempos. **B, C y D.** Se utilizó un modelo lineal mixto, con varios datos para un mismo animal (N =3-4 animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías, considerando factores fijos a “semana” y “tratamiento”, y factor aleatorio al “animal”. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los análisis ($p > 0,05$ para todos los factores).

Aplicamos de igual manera el modelo de oclusión unilateral de narina a las líneas transgénicas PLP-CreERT;tdTomato y S100B-GFP. La línea S100B-GFP nos permite analizar adicionalmente la respuesta de los astrocitos a la privación sensorial. Realizamos un análisis comparativo de parámetros estructurales de ambas líneas transgénicas, que podrían derivar en diferencias entre líneas en la respuesta a la oclusión unilateral. Comparamos el grosor y la densidad de células totales de la capa de fibras olfatorias y el tamaño glomerular de cada línea transgénica en respuesta a la privación sensorial, y analizamos por separado estos parámetros para la semana 1 y semana 2 de edad posnatal ([Figura R. 3.3](#)).

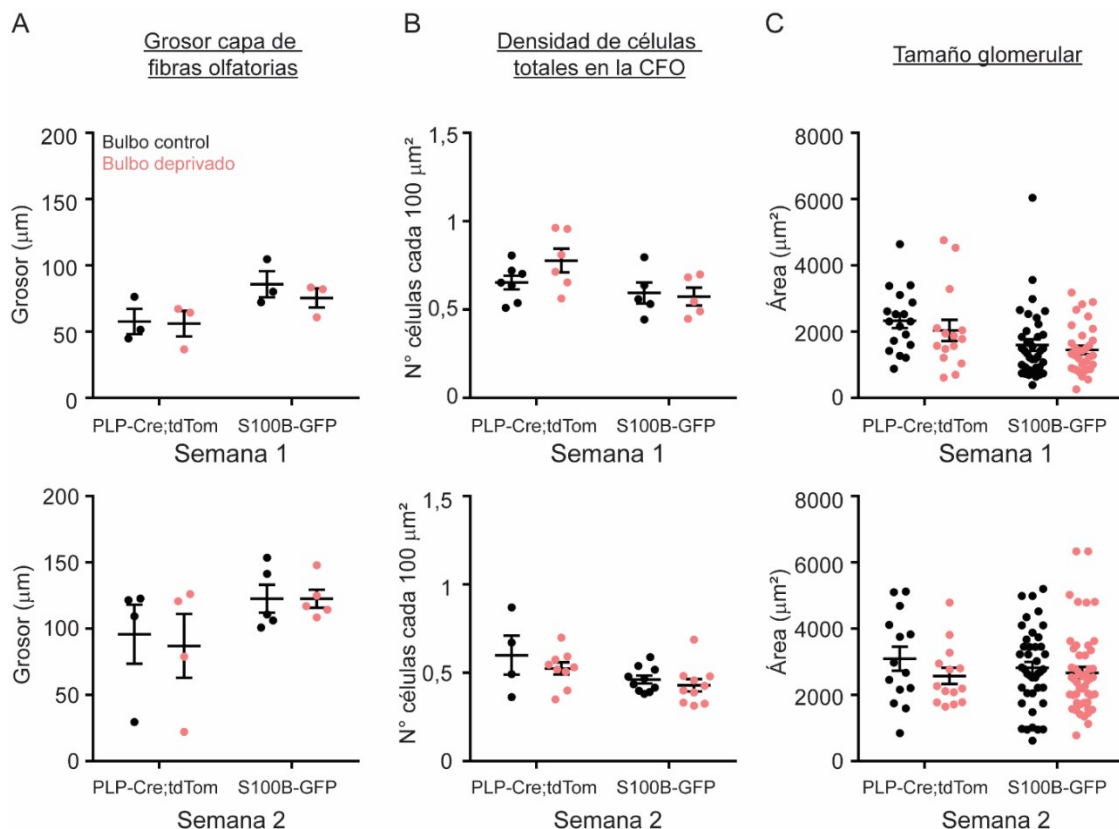


Figura R. 3.3. Comparación de las líneas transgénicas reporteras PLP-CreERT;tdTomato y S100B-GFP en animales con deprivación sensorial durante el desarrollo posnatal. **A.** Cuantificación del grosor de la capa de fibras olfatorias a partir de cortes coronales de bulbo olfatorio de animales de las líneas PLP-CreERT;tdTomato y S100B-GFP, con oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5, P10; semanas 1 y 2, arriba y abajo respectivamente). **B.** Análisis de la densidad de células en la capa de fibras olfatorias de animales de la línea PLP-CreERT;tdTomato y S100B-GFP, con oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5, P10; semanas 1 y 2, arriba y abajo respectivamente). **C.** Análisis del tamaño de glomérulos, expresado en área glomerular, determinado a partir de imágenes de microscopía confocal de cortes coronales de bulbo olfatorio de animales de la línea PLP-CreERT;tdTomato y S100B-GFP, con oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5, P10; semanas 1 y 2, arriba y abajo respectivamente). **A, B y C.** Se utilizó un modelo lineal mixto, con varios datos para un mismo animal (N =4-5 animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías, considerando factores fijos a "genotipo" y "deprivación", con "animal" como factor aleatorio. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los factores, en ninguno de los parámetros analizados ($p > 0,05$). Este análisis se realizó para cada semana por separado.

El análisis de estos parámetros se realizó a partir de imágenes obtenidas de cortes coronales de bulbo olfatorio de ratones de ambas líneas transgénicas, con oclusión unilateral de narina. Los resultados muestran que los parámetros de grosor de la capa de fibras olfatorias, densidad de células totales y tamaño glomerular no difirieron entre el bulbo control y el deprivado para ninguna de las dos líneas, independientemente del momento del desarrollo posnatal. Estos resultados indican que ambas líneas son comparables en estos parámetros morfológicos y que estos no son sensibles a la deprivación sensorial durante las dos primeras semanas del desarrollo posnatal.

Analizamos en tejido de ratones de la línea S100B-GFP la morfología y densidad de células reportadas por GFP en la capa de fibras olfatorias ([Figura R. 3.4](#)), para evaluar su posible modulación por la actividad sensorial. Sin embargo, al igual que lo observado utilizando la línea PLP-CreERT;tdTomato, no se observaron alteraciones en ninguno de los parámetros analizados basados en la fluorescencia de la proteína GFP expresada bajo control del promotor de S100B ([Figura R. 3.4B, C y D](#)).

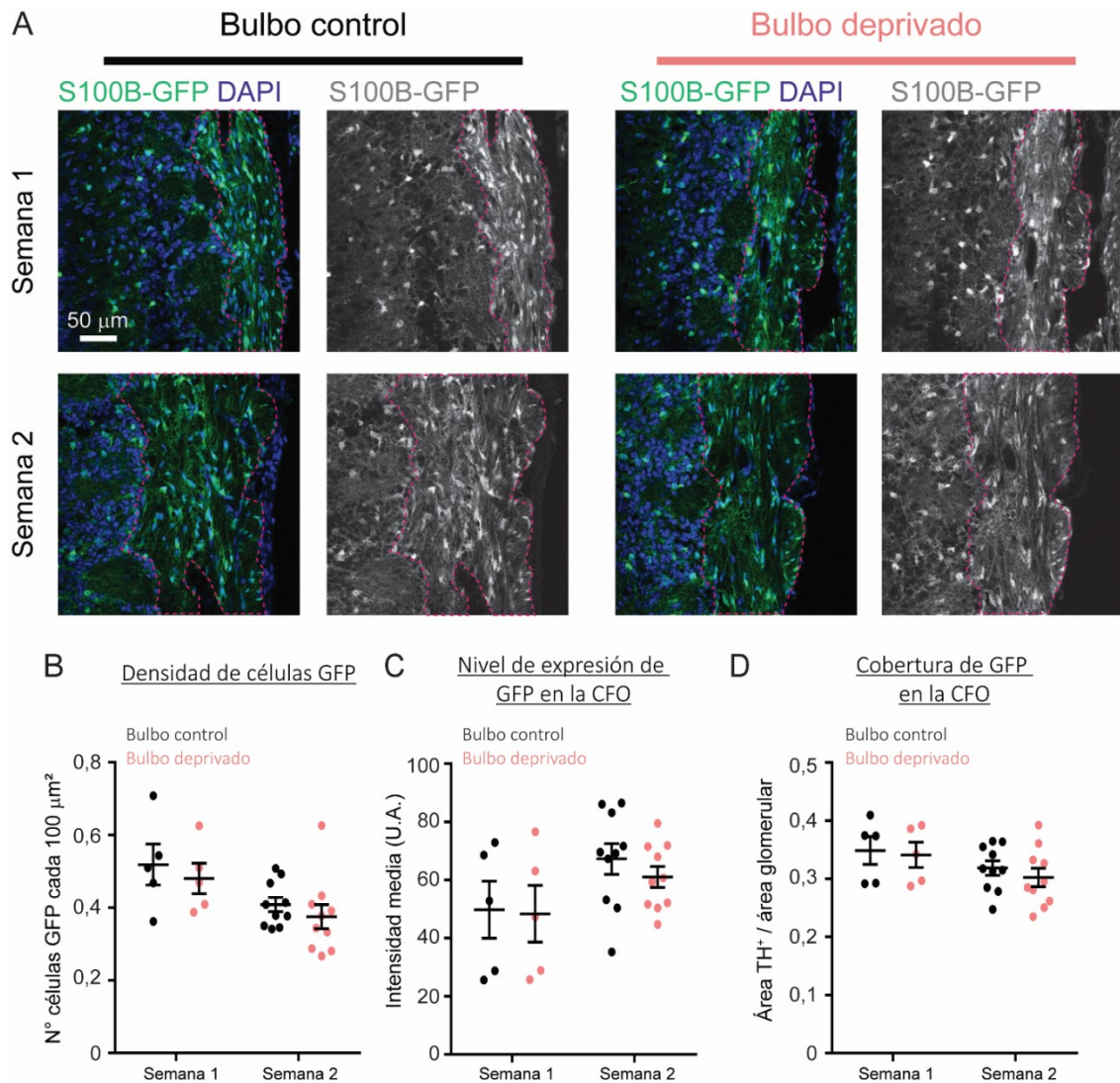


Figura R. 3.4. Análisis de la población de células S100B-GFP de la capa de fibras olfatorias en animales con privación sensorial durante el desarrollo posnatal. **A.** Imágenes representativas de cortes coronales de bulbo olfatorio de animales de la línea S100B-GFP con oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5, P10, Semanas 1 y 2 respectivamente). Se muestra el lado control y privado de un mismo animal. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), y la marca de S100B-GFP en verde y en escala de grises. Se señala el área de la capa de fibras olfatorias analizada con línea magenta. **B, C y D.** Se utilizó un modelo lineal mixto, con varios datos para un mismo animal (N =3-4 animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías, considerando factores fijos a “semana” y “tratamiento”, con factor aleatorio “animal”. **B.** Cuantificación de la densidad de células GFP+ en la capa de fibras olfatorias, para el bulbo control y privado; $p > 0,05$ para todos los factores. **C.** Análisis de la intensidad de fluorescencia de GFP en el neuropilo glomerular, para el bulbo control y privado para las 2 primeras semanas del desarrollo posnatal; $p > 0,05$ para todos los factores. **D.** Análisis del área de cobertura de la marca de GFP con respecto al área glomerular, para el bulbo control y privado en los mismos tiempos; $p > 0,05$ para todos los factores.

Las observaciones realizadas en ambas líneas transgénicas, utilizando proteínas fluorescentes bajo dos promotores diferentes activados en la glía envolvente, sugieren que la privación sensorial no altera la densidad de células de glía envolvente en la capa de fibras olfatorias, ni los niveles de expresión de estos promotores, o la estructura de las proyecciones gliales.

A continuación, nos planteamos estudiar el impacto de la falta de actividad sensorial en la expresión temprana de Cx43 en la capa de fibras olfatorias, enfocándonos en las primeras dos semanas luego de la oclusión de una narina. Para ello, realizamos tinción mediante inmunofluorescencia contra Cx43 en cortes de bulbo olfatorio de animales de la línea S100B-GFP, conteniendo los bulbos control y privado ([Figura R. 3.5 A](#)). En las imágenes se puede observar expresión de Cx43 en el bulbo control y privado, para las dos edades analizadas. Se cuantificó la densidad de *clusters* de Cx43 cada 100 μm^2 en la capa de fibras olfatorias para las dos edades, en 3 regiones de interés por bulbo. La comparación de la densidad de *clusters* de Cx43 no arrojó diferencias significativas entre el bulbo control y privado, en ninguna de las edades ([Figura R. 3.5 B](#)).

Como fue detallado en la sección de [Métodos 2.7.2](#), la cuantificación de *clusters* de Cx43 se realizó de manera manual, identificando la típica marca puntiforme. Si bien la metodología fue lo suficientemente sensible como para encontrar diferencias entre las distintas edades analizadas en el Capítulo 1 de esta tesis, este análisis no detecta efectos de la privación sensorial. Para confirmar este resultado mediante una metodología alternativa, sin aplicar el sesgo de selección manual de *clusters* de Cx43, se cuantificó la intensidad de marca de Cx43 para cada *pixel* en toda la capa de fibras olfatorias y se la representó en histogramas de frecuencia (relativa al total de *pixels*) para el bulbo control y privado de cada animal, para cada edad por separado ([Figura R. 3.5 C](#)). Observamos que para la Semana 1 se produjo un corrimiento a la izquierda del histograma de intensidades de marca de Cx43 para los bulbos privados, respecto del histograma de los bulbos control. Esto implica que la marca de Cx43 se encuentra reducida por la privación. Este fenómeno no fue observado en los histogramas promedio de la semana 2.

Para parametrizar los histogramas y poder compararlos estadísticamente se calculó la Intensidad mediana (I_{50}) para el histograma de cada región analizada y se comparó este parámetro entre los bulbos deprivado y control de cada animal, para cada edad (Figura R. 3.5 D). Se observó que para la semana 1 de deprivación, la I_{50} de fluorescencia fue significativamente menor para el bulbo deprivado que para el bulbo control. Esta diferencia desapareció en la semana 2.

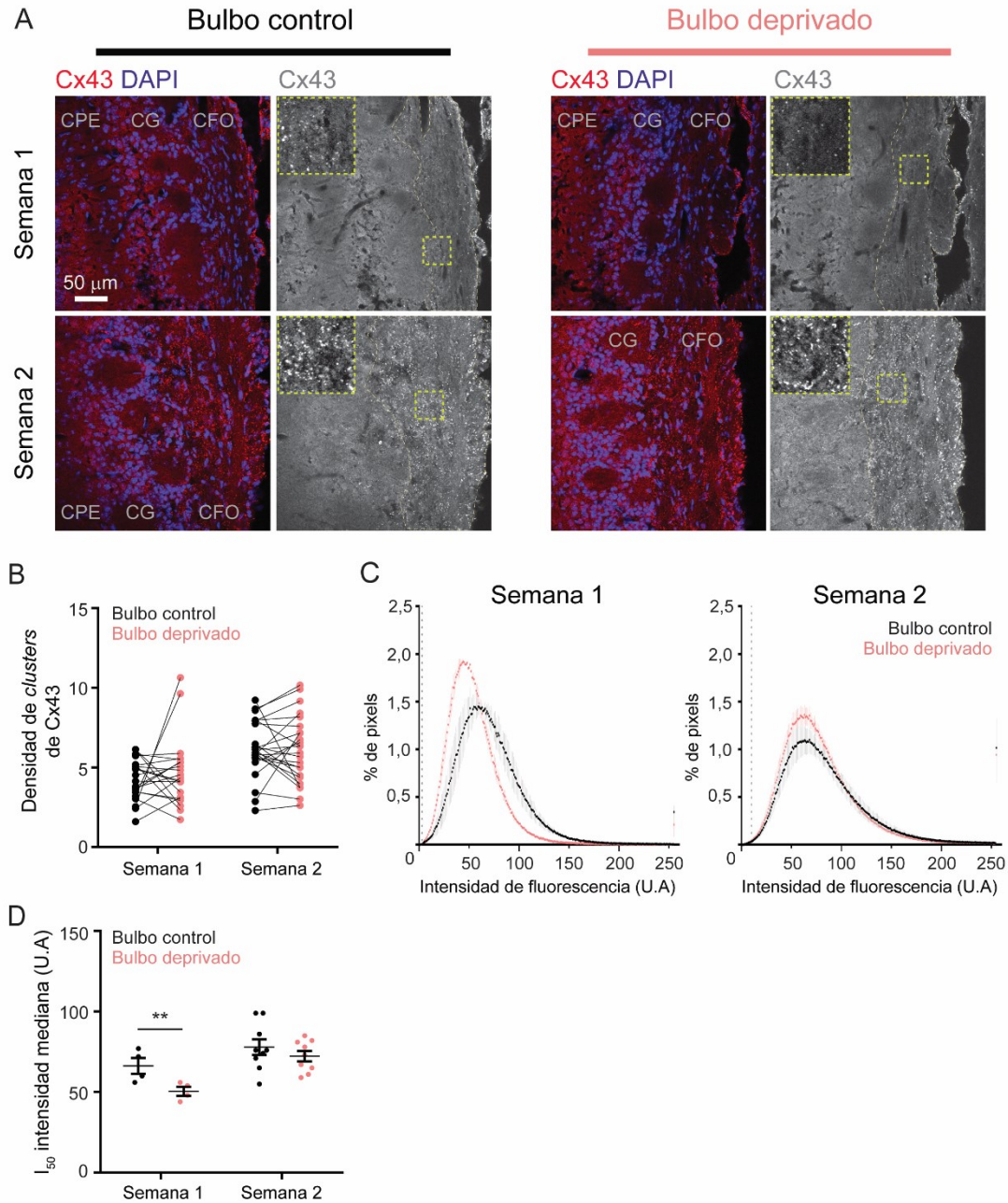


Figura R. 3.5. Efecto de la deprivación sensorial durante el desarrollo posnatal sobre la abundancia de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias del bulbo. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra Cx43 en el bulbo olfatorio de

animales de la línea S100B-GFP con oclusión de narina a P0-1 y observando a diferentes tiempos de la oclusión (semanas 1 y 2). Se muestra el bulbo control y privado de un mismo animal. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), y la marca de Cx43 en rojo y en escala de grises. Se muestra en el recuadro una ampliación de la marca de Cx43 y en línea punteada está delimitada la capa de fibras olfatorias. Se observan las capas: externa plexiforme (CPE), glomerular (CG) y de fibras olfatorias (CFO). **B.** Análisis de la densidad de *clusters* de Cx43 (*clusters* cada $100 \mu\text{m}^2$) en la CFO del bulbo olfatorio en el bulbo control y privado. Se utilizó un modelo lineal mixto, considerando factores fijos a “semana” y “tratamiento”, factor aleatorio “animal”, con varios datos para un mismo animal ($N = 3-5$ animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías; $p > 0,05$ para todos los factores. **C.** Se muestra el histograma promedio para los *pixels* de las imágenes en la CFO, para cada semana analizada. $N = 4-5$ animales por grupo. En línea punteada se muestra indica la intensidad de fluorescencia de Cx43 correspondiente al pico del histograma para el control negativo de la inmunofluorescencia. **D.** Análisis del valor mediana de la intensidad de fluorescencia de Cx43 (I^{50}) para el bulbo control y privado para las 2 primeras semanas del desarrollo posnatal. Se utilizó un modelo lineal mixto, considerando factores fijos a “semana” y “tratamiento”, con factor aleatorio “animal”, con varios datos para un mismo animal ($N = 3-5$ animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías; Interacción significativa: $****p < 0,0001$. Se realizó un análisis pos-hoc paramétrico para comparaciones múltiples, que detectó diferencias significativas entre el bulbo control y el privado para la semana 1 ($**p < 0,01$).

Los resultados presentados indican que la privación sensorial del bulbo reduce la expresión de Cx43 en la capa de fibras olfatorias durante la primera semana de desarrollo posnatal y que la diferencia se compensa al alcanzar la semana 2 de privación. La reducción en la expresión de Cx43 no parece estar asociada a un número menor de células de glía envolvente olfatoria, o una retracción de las proyecciones gliales. Estos resultados sugieren una demora en la maduración de la expresión de Cx43 por la glía envolvente como resultado de la privación.

3.3.3. La población de astrocitos periglomerulares se ve afectada por la privación sensorial en las primeras dos semanas del desarrollo posnatal

En el contexto de los resultados de la sección anterior, en relación al retraso en la maduración del perfil de Cx43 en la glía envolvente, planteamos la pregunta de si temprano en el desarrollo la expresión de Cx43 dada por astrocitos periglomerulares es susceptible a la actividad sensorial también. Para contestar esta pregunta, estudiamos su expresión en la capa glomerular durante las primeras dos semanas del desarrollo, en el modelo de privación sensorial en animales S100B-GFP.

Mediante inmunofluorescencia en cortes coronales de bulbo olfatorio de animales con deprivación unilateral, se comparó la expresión de Cx43 en bulbos control y deprivados ([Figura R. 3.6 A](#)). Se analizaron todos los glomérulos con sección transversal completa presentes en cada imagen para cada bulbo y se realizó una cuantificación manual de la densidad de *clusters* de Cx43 ([Figura R. 3.6 B](#)). Así como para la capa de fibras olfatorias, esta metodología de cuantificación de la expresión de Cx43 no arrojó diferencias entre grupos.

Nuevamente, se optó por utilizar el análisis no sesgado basado en los histogramas de intensidades de fluorescencia de cada imagen ([Figura R. 3.6 C](#)), con el que observamos para la semana 1 un claro corrimiento a la izquierda del histograma para los bulbos deprivados, con respecto a los bulbos controles. Esto revela una reducción de la marca de Cx43 producto de la deprivación. Este fenómeno no fue observado en los histogramas promedio de la semana 2. Tal como se realizó para el análisis de marca en la capa de fibras olfatorias, las comparaciones estadísticas se hicieron sobre la Intensidad mediana (I_{50}) de fluorescencia ([Figura R. 3.6 D](#)). Para la semana 1 de deprivación, la I_{50} de fluorescencia fue significativamente menor para el grupo deprivado que para el control y las diferencias entre el lado control y deprivado desaparecieron al avanzar el desarrollo posnatal.

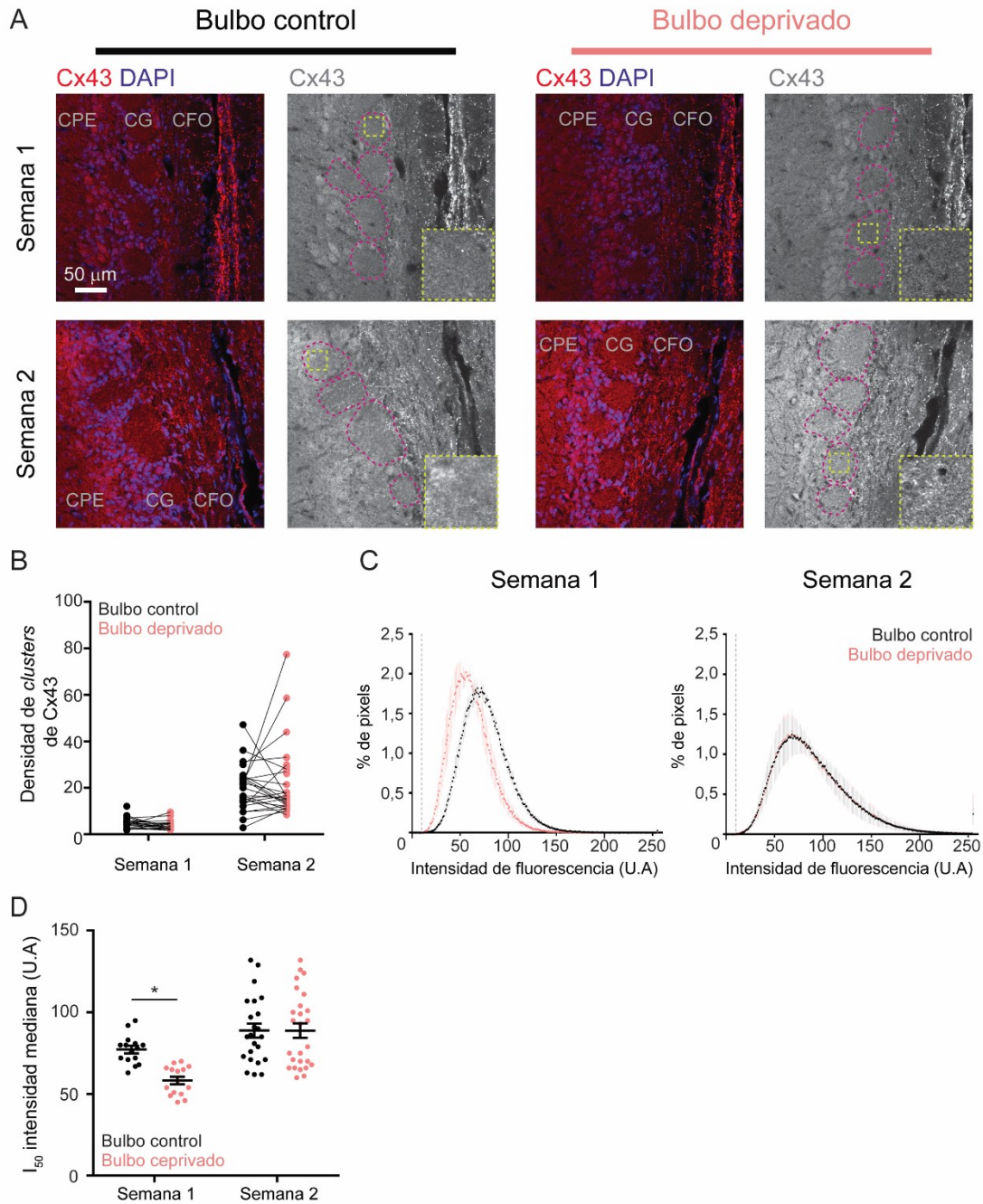


Figura R. 3.6. Análisis de la expresión de Cx43 en la capa glomerular en animales con privación sensorial durante el desarrollo posnatal. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra Cx43 en el bulbo olfatorio de animales de la línea S100B-GFP, con oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5, P10; semanas 1 y 2 respectivamente). Se muestra el lado Control y Deprivado de un mismo animal. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), y la marca de Cx43 en rojo y en escala de grises. Se muestra en el recuadro una ampliación de la marca glomerular de Cx43 y en línea punteada se señalan los glomérulos. **B.** Análisis de la densidad de *clusters* de Cx43 (clusters cada 100 μm^2), en la CG del bulbo olfatorio en el lado control y privado. Se utilizó un modelo lineal mixto, considerando factores fijos a “semana” y “tratamiento”, y un factor aleatorio “animal”, con varios datos para un mismo animal (N =3-5 animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías; $p > 0,05$ para todos los factores. **C.** Se muestra el histograma promedio del porcentaje de *pixels* en función de la intensidad de fluorescencia de Cx43

en la capa glomerular, para cada semana analizada; N = 4-5 animales por grupo. En línea punteada se muestra indica la intensidad de fluorescencia de Cx43 correspondiente al pico del histograma para el control negativo de la inmunofluorescencia. **D.** Análisis del valor mediana de la intensidad de fluorescencia de Cx43 (I^{50}) para el lado control y privado durante las 2 primeras semanas del desarrollo posnatal. Se utilizó un modelo lineal mixto, considerando factores fijos a “semana” y “tratamiento”, y un factor aleatorio “animal”, con varios datos para un mismo animal (N =3-5 animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías; Interacción significativa, **** $p < 0,0001$. Se realizó un análisis pos-hoc paramétrico para comparaciones múltiples, que arrojó diferencias significativas entre el hemisferio control y privado para la Semana 1 (* $p < 0.05$).

Los resultados observados para el análisis de Cx43 en la capa glomerular podrían reflejar una disminución del número de astrocitos en esta capa. Para evaluar esta posibilidad, realizamos un análisis del parámetro de densidad de células GFP+ en la capa glomerular (predominantemente astrocitos), junto con los parámetros de expresión de GFP y grado de cobertura de las proyecciones gliales hacia los glomérulos ([Figura R. 3.7](#)). El análisis de la densidad de células GFP+ en la capa glomerular no arrojó diferencias significativas entre los grupos control y privado para ninguna de las dos semanas analizadas ([Figura R. 3.7 B](#)). Sin embargo, se observó una reducción significativa de la intensidad de GFP y cobertura de las proyecciones en el neuropilo glomerular para la primera semana, para el lado privado ([Figura R. 3.7 C y D](#)). Además, en la segunda semana de privación se observó un aumento en el grado de cobertura de las proyecciones de GFP hacia los glomérulos para el lado privado ([Figura R. 3.7 D](#)). Estos resultados sugieren que la reducción de Cx43 en la primera semana en el grupo privado, puede estar asociada a una menor densidad de proyecciones astrocíticas. Alternativamente, y no de manera excluyente, los resultados sugieren que el promotor de S100B en los astrocitos periglomerulares es modulable por la actividad sensorial durante el desarrollo posnatal.

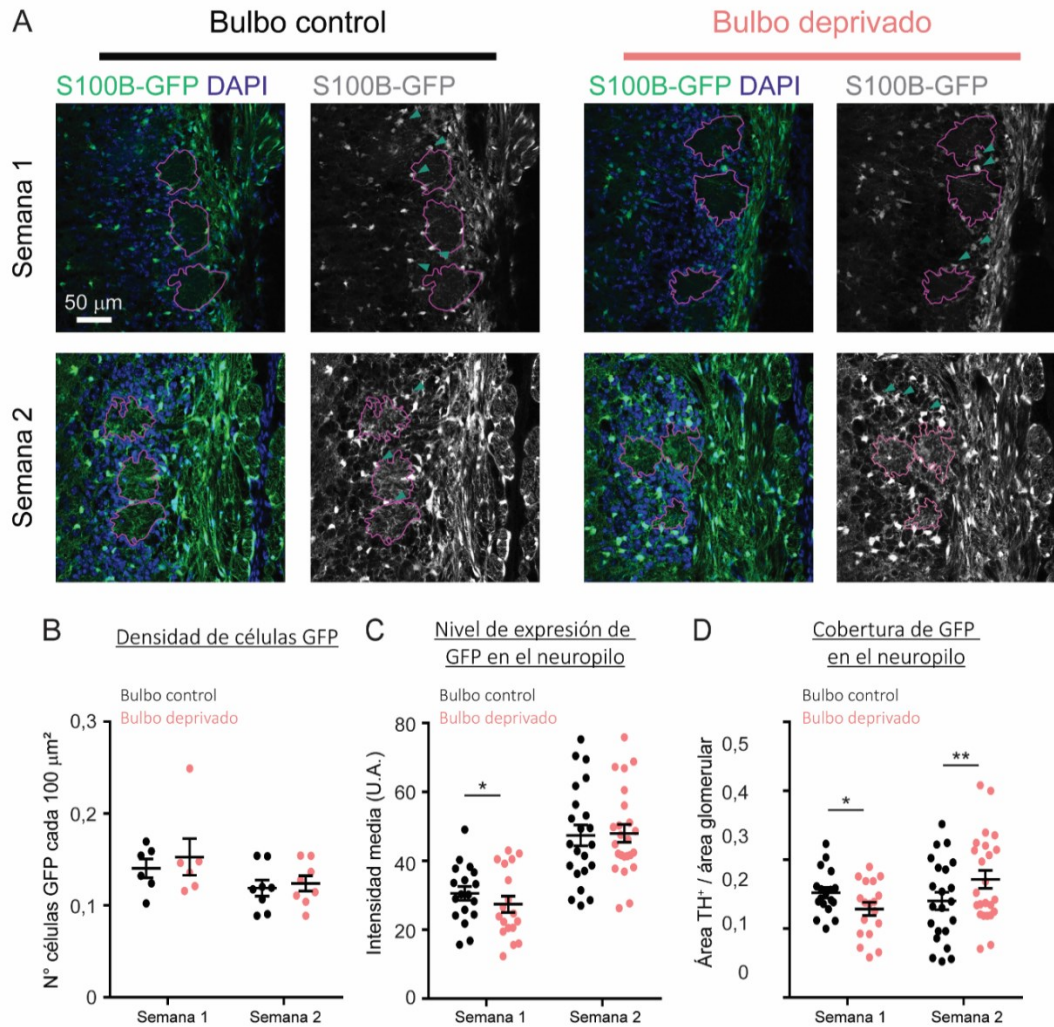


Figura R.3.7. Análisis de la población de células S100B-GFP de la capa glomerular en animales con privación sensorial durante el desarrollo posnatal. **A.** Imágenes representativas de cortes coronales de bulbo olfatorio de animales de la línea S100B-GFP con oclusión unilateral de narina, de diferentes edades posnatales (P5, P10, Semanas 1 y 2 respectivamente). Se muestra el lado control y privado de un mismo animal. La marca nuclear se encuentra en color azul (DAPI), y la marca de S100B-GFP en verde y en escala de grises. Se señalan en rosa los glomérulos analizados y con flechas verdes algunas células GFP⁺. **B, C y D.** Se utilizó un modelo lineal mixto, considerando factores fijos a “semana” y “tratamiento”, un factor aleatorio “animal”, con varios datos para un mismo animal (N =3-4 animales por grupo). Se realizó un ANOVA de dos vías. **B.** Cuantificación de la densidad de células GFP⁺ en la capa glomerular expresado en el número de células GFP⁺ cada 100 μm^2 , para el hemisferio control y privado; $p > 0,05$ para todos los factores. **C.** Análisis de la intensidad de fluorescencia de GFP en el neuropilo glomerular, para el hemisferio control y privado en las primeras 2 semanas del desarrollo posnatal; interacción significativa, **** $p < 0,0001$. Se realizó un análisis pos-hoc paramétrico para comparaciones múltiples; las diferencias significativas se indican en la figura; * $p < 0,05$. **D.** Análisis del área de cobertura de la marca de GFP con respecto al área glomerular, para el hemisferio control y privado en las 2 semanas; interacción significativa, **** $p < 0,0001$. Se realizó un análisis pos-hoc paramétrico para comparaciones múltiples; las diferencias significativas se indican en la figura; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.3.4. Conclusiones del Capítulo 3

En resumen, los resultados presentados en este capítulo indican que el impacto de la oclusión unilateral en la expresión de TH comienza a manifestarse recién a partir de la tercera semana posnatal, por lo que no constituye un buen marcador de privación temprana. Por otra parte, los resultados sugieren que la glía envolvente olfatoria es sensible a la privación sensorial, manifestándose en los niveles de expresión de la Cx43 durante la primera semana posnatal. Adicionalmente, se observó que en la capa glomerular los astrocitos periglomerulares responden a la privación sensorial con alteraciones en la morfología de sus proyecciones e intensidad de marca de S100B, y disminuyendo la expresión de Cx43 durante la primera semana posnatal. Estos hallazgos revelan que ambos marcadores gliales podrían servir como indicadores tempranos de la eficacia de la privación sensorial olfatoria experimental y posiblemente como indicadores de la reducción de actividad sensorial olfatoria durante el desarrollo posnatal.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

El bulbo olfatorio sufre una remodelación del cableado neuronal durante la edad posnatal temprana como parte del establecimiento del mapa sensorial olfativo ³²³. Uno de los procesos de remodelado mejor descritos durante el desarrollo del sistema olfatorio es el refinamiento, dependiente de la experiencia sensorial, de la inervación del bulbo por los axones sensoriales provenientes del epitelio olfatorio nasal ¹, que se encuentran asociados a glía especializada, la glía envolvente olfatoria. Esta glía es de particular interés dado que se le atribuyen propiedades que podrían explicar la plasticidad de la inervación del bulbo olfatorio, como la expresión de moléculas guía y factores neurotróficos ^{2,83-85,87,88,324}. La glía envolvente forma redes mediadas por Cx en animales juveniles y adultos ³⁻⁵, y el desarrollo de estas redes podría ser relevante como modulador del proceso de refinamiento de la inervación del bulbo por los axones a los que esta glía se asocia. Sin embargo, se desconoce la temporalidad de la aparición de estas redes durante el desarrollo posnatal, así como las características de dichas redes. Además, las Cx que median las redes gliales tienen funciones clave en procesos de adhesión celular durante el desarrollo que exceden su función en la formación de redes ¹⁷¹. El aporte de esta tesis consiste en haber hecho una caracterización detallada de la aparición y refinamiento de las redes de glía envolvente, y de la expresión y modulación de las Cx asociadas a dicha glía, durante el desarrollo posnatal.

El capítulo 1 analizó si la glía envolvente sufre un proceso de refinamiento o maduración del grado de conectividad mediado por *gap junctions* y de la expresión de Cx, utilizando un abordaje histoquímico y electrofisiológico. Para ello, en primer lugar, caracterizamos la línea transgénica S100B-GFP previamente utilizada para la identificación de la capa de fibras olfatorias y de las células de glía envolvente en edad juvenil ^{3,4} y verificamos que es apta para la identificación de las capas ricas en glía envolvente en diferentes edades del desarrollo posnatal. Si bien S100B es expresado tanto por astrocitos como por glía envolvente olfatoria ^{81,82} y en la capa de fibras olfatorias se espera que se encuentren reportados ambos tipos celulares, la alta densidad celular de glía envolvente frente a la de astrocitos, hace que probabilísticamente las células

reportadas sean glía envolvente. Esto resulta de utilidad para identificar a este tipo glial para el registro electrofisiológico.

En cuanto a si la glía envolvente olfatoria de neonatos se encuentra conectada formando redes gliales, como se observa desde edad juvenil ^{3,4}, los datos muestran que forma redes desde P0 en adelante y constituyen el primer reporte sobre el tamaño y selectividad de redes de glía envolvente olfatoria en animales neonatos. Los resultados mostraron también que las redes de animales de 3 semanas de vida son de menor tamaño que las de la semana 1, evidenciando un proceso de refinamiento de estas redes. La glía envolvente de neonatos exhibe una respuesta de aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} frente a la estimulación de los axones sensoriales, mediada por activación de los receptores mGluR1 y P2Y1, que es más prominente en las primeras dos semanas del desarrollo posnatal que en edad más tardía ²⁸³. Además, esta señal puede propagarse en olas de Ca^{2+} de una célula a otra a través de *gap junctions* ²²¹. Nuestros resultados son consistentes con estas observaciones, dado que una mayor respuesta de Ca^{2+} durante las primeras semanas posnatales podrían estar sustentadas, en parte, por un grado de conectividad mayor.

En animales juveniles, la presencia de Cx funcionales y el grado de conectividad glial se ven reflejados en los perfiles de corriente macroscópica de la glía envolvente en experimentos de *voltage clamp*. Las células que forman redes de mayor tamaño tienen conductancias mayores, y a su vez, perfiles de corriente lineales, mientras que las células desconectadas manifiestan perfiles de corriente no lineales ^{3,4}. Evaluamos si la maduración del tamaño de las redes observado en las primeras 3 semanas del desarrollo posnatal, correlacionaba con una maduración de los perfiles electrofisiológicos de estas células de acuerdo con lo esperado en base a lo descrito en animales juveniles. Esperábamos encontrar una reducción de la conductancia total en las células de la semana 3 en relación a la semana 1, y la posible emergencia de perfiles de corriente no lineales, asociados a una conectividad glial reducida. Sin embargo, no observamos cambios en la corriente macroscópica de las células de glía envolvente durante el desarrollo posnatal. Esto puede deberse a que la corriente macroscópica de las células refleja conductancias adicionales, además de la de las *gap junctions*, que pueden enmascararla. Por otro lado, este fenómeno se

asemeja a lo observado en astrocitos del hipocampo, donde los perfiles de corriente y la R_i no se relacionan con el grado de conectividad de estas células. Los astrocitos con un mayor grado de conectividad (evaluado por acople por colorante) manifiestan el mismo perfil de corriente y R_i que los astrocitos espontáneamente aislados, y que los astrocitos que forman redes en presencia de MFA ¹⁹⁰. Dado que los perfiles electrofisiológicos no lineales descritos para la glía envolvente de animales juveniles se asociaban predominantemente a células espontáneamente aisladas de una red y que el perfil lineal se observó en redes que en promedio tenían 5 células ³, la predominancia de perfiles lineales en neonatos podría explicarse porque las redes son de mayor tamaño que el mínimo necesario para manifestar dicho perfil. Por último, corroboramos que la corriente macroscópica de la glía envolvente neonatal es sensible a MFA, consistente con la presencia de Cx funcionales y *gap junctions* asociadas ³.

En animales de edad P14 a P21 se ha reportado que la glía envolvente expresa conductancias asociadas a canales de tipo K_{DR} (*delayed-rectifier*), sensibles al bloqueante TEA, y canales tipo K_{IR} (*inward-rectifier*) sensibles al bloqueo con bario ⁴. La observación de un comportamiento invariable de la conductancia total de la glía envolvente durante las primeras semanas, a pesar de una variación en el grado de conectividad glial, podría explicarse por la aparición con el desarrollo de conductancias asociadas a canales de potasio, que compensen una posible menor conductancia de *gap junctions* en la semana 3. Para evaluar esta hipótesis, resta determinar si la glía envolvente de neonatos expresa conductancias de potasio y si se modifican con el desarrollo posnatal, además de si la conductancia sensible a MFA madura con la edad.

Existen múltiples mecanismos que determinan la conductancia y selectividad de las *gap junctions*, entre ellas el tipo de Cx ^{173,178,182,263,325,326} y modificaciones post-transduccionales ³²⁷⁻³²⁹. La disociación entre los resultados de acople por colorante, que muestran una reducción del tamaño de las redes con el desarrollo posnatal, y la constancia del perfil electrofisiológico con el desarrollo podría explicarse, entonces también, por una modificación en la permeabilidad y/o conductancia de *gap junctions* a lo largo del desarrollo. De todas maneras, los resultados indican un cambio cuantitativo y/o cualitativo en la composición de las *gap junctions* en la glía envolvente durante las primeras 3

semanas del desarrollo posnatal, que podría determinar una permeabilidad diferencial para distintas moléculas.

La glía envolvente olfatoria de animales juveniles y adultos expresa Cx43^{3,4} y la utiliza como molécula principal para la formación de *gap junctions*⁵. A su vez, determina el perfil electrofisiológico característico de estas células cuando están interconectadas^{3,5}. Dado el rol central que la Cx43 cumple en la formación de redes gliales desde P30 en adelante, evaluamos si la Cx43 presentaba un perfil de expresión compatible con su participación en la formación de redes de glía envolvente desde temprano en el desarrollo posnatal. Observamos expresión de Cx43 desde la semana 1, hacia el fin de la cual adquirió niveles de expresión que luego se mantuvieron hasta finales de la semana 2 (P14).

Confirmamos que la Cx43 es expresada por la glía envolvente olfatoria de animales de edad neonatal mediante la utilización de la línea de ratones PLP-CreERT como herramienta para la manipulación condicional de la glía envolvente. Mostramos que en animales juveniles esta línea dirige modificaciones genéticas en este tipo celular, ya que las células modificadas con esta línea en la capa de fibras olfatorias expresan marcadores de glía envolvente y no expresan marcadores de astrocitos. Mostramos también que, en animales neonatos, las células modificadas por esta línea tienen morfología y localización compatible con células de la glía envolvente olfatoria, aunque resta realizar una caracterización más detallada, para descartar la posibilidad de una menor selectividad de esta línea por la glía envolvente durante el desarrollo posnatal temprano.

Mediante tecnología Cre-lox dirigida a la glía envolvente logramos producir un descenso en la expresión de Cx43 en la capa de fibras olfatorias, rica en esta glía sin afectar la densidad celular, consistente con resultados previos aplicando esta manipulación en animales adultos. Luego de la delección de Cx43, se observaron algunos *clusters* remanentes de Cx43, posiblemente expresada por células de la glía envolvente que no sufrieron recombinación, o por astrocitos de la capa de fibras olfatorias. Resta realizar un análisis de co-localización de la Cx43 remanente en la capa de fibras olfatorias con marcadores astrocíticos, para distinguir entre estas posibilidades. El protocolo de administración de Tx usado para inducir la delección de Cx43 fue adaptado de un

protocolo publicado que utilizaba una dosis diaria de Tx (50 mg/kg) durante 3 días ²⁹¹ y para esta tesis fue reducido a dos días de tratamiento con Tx, que fueron suficientes para reducir dramáticamente la expresión de Cx43. Este protocolo reducido fue necesario para poder realizar los experimentos de acople de colorante en animales Cx43 cKO y Cx43 Control de edad P2, a los que se administró Tx el día del nacimiento.

Resulta llamativo que a P0 observamos las redes gliales de mayor tamaño, cuando los niveles de expresión de Cx43 resultaron mínimos o indetectables. Una explicación posible es que a esta edad la Cx43 se exprese con una estructura conformacional o modificaciones post-transduccionales diferentes a las presentes en edades posteriores, y no pueda ser detectada por el anticuerpo usado para su detección. Este fenómeno ha sido descrito en detalle en la detección de Cx43 de astrocitos en el contexto de daño cerebral, en el que el daño induce enmascaramiento de epítomos de la Cx43, que impide su reconocimiento por algunos anticuerpos ^{330,331}. Descartamos un problema de capacidad de detección del anticuerpo primario utilizado para los resultados presentados en la [Sección R.3.1.3](#) (policlonal hecho en conejo ³³²), realizando un control de inmunofluorescencia con un anticuerpo alternativo (monoclonal hecho en ratón ³³³). Los anticuerpos utilizados reconocen porciones diferentes de la proteína Cx43, por lo que es poco probable que la baja expresión observada a P0 se deba a la expresión de una versión de la proteína con algún epítomo enmascarado. Además, el anticuerpo realizado en conejo reconoce a la proteína en cualquiera de sus estados de fosforilación ³³², por lo que su baja detección tampoco pareciera deberse a una variación en modificaciones post-transduccionales de este tipo entre las edades analizadas. De esta manera, los resultados observados con ambos anticuerpos confirman que a P0 la Cx43 es prácticamente indetectable y sugieren que la Cx43 no es utilizada principalmente para *gap junctions* a esta edad, y por lo tanto, que podría haber un cambio en el sustrato molecular mediador de las *gap junctions* durante el desarrollo posnatal temprano del bulbo olfatorio. Es decir, que una Cx diferente a Cx43 medie estas uniones durante los primeros días y gradualmente sea reemplazada o complementada en su función por Cx43.

Al explorar qué otras Cx podrían formar parte de las *gap junctions* a edad neonatal, descartamos a la Cx30 debido a la baja inmunorreactividad observada en la primera semana posnatal, coincidente con lo reportado en edad juvenil y adulta ⁵. Sin embargo, encontramos un alto nivel de expresión de la Cx47 en la capa de fibras olfatorias de tejido de animales S100B-GFP, lo que nos permitió realizar un análisis de colocalización, que reveló que esta Cx se encuentra localizada en las proyecciones de células positivas para GFP con características morfológicas de glía envolvente olfatoria, dada por las típicas estructuras lacunares de sus proyecciones ³. Este es el primer reporte de expresión de la Cx47 en la glía envolvente olfatoria, aunque existe un reporte previo de expresión de esta Cx en células que expresan S100B en tejido de materia blanca del sistema nervioso central ¹⁹⁶. Estos resultados indican que la Cx47 constituye un posible candidato a conformar *gap junctions* responsables de la conectividad desde temprano en el desarrollo posnatal. Resta evaluar si la Cx47 es el sustrato molecular responsable de la conectividad a P0 y si participa de *gap junctions* heteroméricas o heterotípicas junto con la Cx43 más adelante en el desarrollo posnatal. Estos resultados son un ejemplo más que muestra la heterogeneidad en el perfil de la glía envolvente, expresando marcadores de diferentes tipos gliales, incluyendo astrocitos y oligodendrocitos, y conforman el primer reporte de la co-expresión de ambas Cx en un mismo tipo celular.

Por otra parte, los astrocitos y los oligodendrocitos forman redes gliales en diferentes estructuras, utilizando *gap junctions* heterotípicas funcionales, donde la Cx43 y Cx47 son aportadas por los astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente ^{194,205,207}. La glía envolvente olfatoria al expresar ambas Cx, podría formar *gap junctions* heterotípicas con hemicanales homoméricos de Cx43 y Cx47 aportados por diferentes células, o alternativamente, formar *gap junctions* homotípicas con hemicanales heteroméricos, para formar redes gliales. La composición de las *gap junctions* determina la conductancia y permeabilidad a colorantes ^{167,179}. Se ha reportado en ensayos *in vitro* en oocitos, que las conexiones heterotípicas entre Cx43 y Cx47 manifiestan una permeabilidad a colorantes diferente a las homotípicas de Cx47, y que éstas presentan una permeabilidad diferencial frente a diferentes sustancias, diferenciándose de las conexiones homotípicas Cx43-Cx43 ²⁰¹. La selectividad a colorantes propia de los diferentes tipos de canales podría ser de utilidad para analizar la presencia

de canales heterotípicos y homotípicos en la glía envolvente olfatoria. La reducción del tamaño de las redes de glía envolvente que observamos en el transcurso de la semana 1 a 3 de edad posnatal podría explicarse por un cambio en la composición de Cx de las *gap junctions*, con progresiva predominancia de Cx43. Esta explicación necesita sustentarse en una permeabilidad diferencial de estas Cx al trazador usado, sulforodamina B, que no resulta predecible a partir de datos de la literatura. Al igual que en el caso de esta tesis, se observa disociación entre los valores de conductancia de Cx43 y Cx47 y permeabilidad a trazadores, ya que Cx43 presenta mayor permeabilidad al cAMP que Cx47, aunque su conductancia es menor³³⁴.

Se ha reportado que los astrocitos juxtaglomerulares del bulbo olfatorio y la glía envolvente forman redes heterocelulares comunicadas por canales sensibles a carbenoxolona, a través de los cuales propagan ondas de Ca^{2+} desde la segunda semana posnatal (P10 a P20)²⁶⁰. Estas redes podrían estar mediadas por canales homotípicos Cx43-Cx43 característicos de las redes atrocíticas, aunque también es posible que la expresión de Cx47 por parte de la glía envolvente aporte a la formación de *gap junctions* heterotípicas Cx47-Cx43, como las que median el acople entre oligodendrocitos y astrocitos.

La expresión de Cx43 detectada por inmunofluorescencia no permite distinguir entre los posibles roles de esta proteína (canal, señalización o adhesión). Para evaluar si la Cx43 conforma *gap junctions* en la glía envolvente olfatoria de animales de edad neonatal realizamos ensayos de acople por colorante y registros electrofisiológicos en rodajas de bulbo olfatorio de animales Cx43 cKO y controles. Las células de glía envolvente del grupo Cx43 cKO mostraron una reducción de la conectividad glial evaluada mediante experimentos de acople por colorante. En este caso se cubrió un rango de edades que abarcó la primera y segunda semana de edad posnatal, lo que nos permite concluir que la Cx43 es una molécula clave para formar las *gap junctions* de la glía envolvente desde P2 (mínima edad registrada en estos ensayos). Al evaluar una posible diferencia en el rol de la Cx43 en la formación de redes en diferentes edades, no observamos un efecto diferencial de la delección de Cx43 en la glía envolvente entre semanas 1 y 2, ya que en ambos casos el grado de desacople fue comparable. Estos resultados adicionalmente confirman que la

línea PLP;CreERT dirige la manipulación genética a glía envolvente olfatoria en neonatos.

El empleo de dos moléculas diferentes para los experimentos de acople por colorante (LY y neurobiotina) reveló que, si bien la conectividad de la glía envolvente se vio drásticamente reducida en animales con delección de Cx43, no fue nula. En los experimentos de acople con LY, todas las células de glía envolvente de animales Cx43 cKO estuvieron desacopladas (solo se marcó una célula), mientras que en los experimentos con neurobiotina, observamos redes de, en promedio, 12 células en este grupo. Esto indica que las dos moléculas difunden de manera diferencial por las *gap junctions* de la glía envolvente a edad neonatal, lo cual puede deberse a que la neurobiotina es una molécula de peso molecular menor al LY y a que se encuentran diferencialmente cargadas ^{179,244}. Adicionalmente, la observación de cierto grado de conectividad glial en los animales Cx43 cKO observada en los ensayos con neurobiotina puede explicarse por un efecto incompleto del tratamiento con Tx, o del alcance de la estrategia genética. Por último, al haber encontrado expresión de Cx47 en la glía envolvente olfatoria, es posible que parte de la conectividad sea sostenida por esta molécula.

Las células de la glía envolvente acopladas a otras células mediante *gap junctions* manifiestan un perfil biofísico con grandes amplitudes de corriente de membrana y alta sensibilidad al MFA, tanto en edad juvenil ³, como a edad neonatal (resultados mostrados en la [figura R. 1.5](#)). El MFA reduce la amplitud de la corriente de membrana, resultando en un perfil electrofisiológico de baja amplitud, característico de células espontáneamente desacopladas ^{3,4}. Al evaluar el perfil de corriente de membrana de las células de la glía envolvente olfatoria de los ratones Cx43 cKO a edad neonatal, observamos una importante reducción de la conductancia macroscópica (del 85% en promedio con respecto al grupo Cx43 Control), y consistentemente, un aumento de la Ri. La glía envolvente de los animales del grupo Cx43 cKO manifestó un perfil de corrientes de membrana que reprodujo el observado en animales de edad juvenil y adulta con esta misma manipulación genética ⁵, que fue también comparable con los registros de glía envolvente desacoplada (ya sea de forma espontánea o luego

del desacople inducido por la incubación con MFA) ^{3,4}. A diferencia de lo reportado en la glía envolvente de animales de edad juvenil ³, el desacople eléctrico no parece verse reflejado en una pérdida de linealidad de la curva I/V. En este sentido, es notorio que el perfil electrofisiológico de la glía envolvente de neonatos tratada con MFA tampoco manifiesta una pérdida de la linealidad de la curva I/V en todos los casos. Es posible que las conductancias activables por voltaje que emergen al eliminar la conductancia de *gap junctions*, sean prevalentes más tarde en el desarrollo posnatal.

A raíz de los resultados de esta tesis surgen nuevos interrogantes que deberían ser abordados en el futuro con el objetivo de entender el papel de la conectividad glial en el desarrollo posnatal. En animales de P10 a P20 fue reportado que la glía envolvente olfatoria se encuentra conectada mediante *gap junctions* a astrocitos ²⁶⁰. Queda pendiente evaluar si durante la primera semana de edad posnatal también se encuentra presente este tipo de conectividad, y si se restringe a la capa de fibras olfatorias, o incluye también la capa glomerular del bulbo. En el segundo caso, la glía envolvente podría influir en el refinamiento de la inervación del bulbo no solo a nivel de la modulación del crecimiento y navegación axonal, sino también en la modulación del entorno sinaptogénico de los glomérulos, al acoplarse a redes de astrocitos glomerulares. Por otra parte, será de interés evaluar el rol de la Cx47 en la formación de redes de glía envolvente olfatoria. Para evaluar su rol funcional, se podría utilizar una estrategia similar a la que utilizamos en esta tesis mediante la utilización de una línea Cx47^{flox} ³³⁵. Sin embargo, se debería utilizar una línea con la recombinasa Cre bajo control de otro marcador de la glía envolvente ^{336,337}, dado que la utilización de la línea PLP-CreERT afectaría la expresión de Cx47 también en oligodendrocitos, haciendo de la manipulación genética poco selectiva y con graves consecuencias motoras ¹⁹⁶. A pesar de ello, sería adecuada probablemente para la evaluación del papel de Cx47 durante la primera semana posnatal, cuando la mielinización aún es incipiente. Otra estrategia posible es utilizar un protocolo de administración de Tx intranasal ³³⁸, dirigiendo la recombinación al bulbo olfatorio de animales PLP-CreERT; Cx47^{flox}. Como análisis preliminar, se podría estudiar la expresión de la Cx47 en tejido de

animales Cx43 cKO, para evaluar posibles compensaciones, además de un análisis de co-localización que aporte evidencias sobre si el grado de conectividad glial reducido pero existente, se asocia a su participación. La farmacología selectiva dirigida a Cx es limitada: han sido reportados trabajos con bloqueantes de *gap junctions* y hemicanales formados por Cx43, por ejemplo los péptidos miméticos GAP26 y GAP19³³⁹ y la expectativa es que se sigan desarrollando otros dirigidos a otras Cx, como la Cx47 de interés para esta tesis.

Por último, queda pendiente estudiar el impacto de perturbar la expresión de Cx43, y la conectividad de la glía envolvente olfatoria durante el desarrollo posnatal, sobre la conducta olfativa. Nuestro objetivo fue utilizar un test de olfacción ya publicado³⁰⁴, para evaluar la conducta olfativa a diferentes tiempos en los animales con delección condicional de la Cx43 en la glía envolvente desde P0. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que el test de modulación de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas en neonatos por la exposición a citral, no permitió distinguir el comportamiento de animales control del de animales con hiposmia por tratamiento con metimazol (MMZ). El grupo que publicó esta metodología como una prueba que permite analizar la capacidad de detección de olores, expuso al test a ratones de edad neonatal tratados con 3-metilindol³⁰⁴, que genera daño en el epitelio olfatorio y provoca déficits en la capacidad de discriminar olores en ratones adultos^{340,341}. Sus resultados muestran que únicamente los ratones tratados con una dosis letal (ratones que murieron en el lapso de 5 días) manifestaron una incapacidad de responder a olores modulando la emisión de vocalizaciones. Animales tratados con una dosis no-letal, tuvieron un comportamiento similar al de los controles, disminuyendo la emisión de vocalizaciones frente a la presentación de citral u olores de ratones machos extraños³⁰⁴. Si bien la letalidad de la dosis fue asociada a la incapacidad de alimentarse por haber perdido la capacidad olfativa y fue tomada como indicador de la efectividad del tratamiento, impone al estado de salud de los animales como factor de confusión al interpretar su falta de respuesta a los estímulos moduladores de las vocalizaciones. Este antecedente sugiere, al igual que nuestros resultados, que los olores podrían haber actuado en un tejido quimiosensitivo independiente del epitelio olfatorio, como el sistema trigeminal. Se ha mostrado que el tratamiento con MMZ en animales neonatos, utilizado en esta tesis, elimina del epitelio olfatorio a las neuronas sensoriales olfativas

maduras e inmaduras 1 día luego del tratamiento, y comienzan a aparecer nuevas neuronas maduras entre los 7 y 11 días de recuperación luego de la inyección de MMZ ³²⁰. Es esperable que la realización de la prueba conductual 5 días luego del tratamiento con MMZ ocurra durante un período en el que aún no se encuentran presentes las nuevas neuronas olfatorias.

Para poder evaluar el efecto de la delección de Cx43 de la glía envolvente en la conducta olfativa podremos como trabajo futuro aplicar otros tests de conducta olfativa. En este sentido, se podría aprovechar la posibilidad de generar condicionamiento olfativo utilizando la temperatura como estímulo incondicionado ³¹⁴ y estímulos olfativos que activen exclusivamente el epitelio olfatorio y bulbo olfatorio principal.

Los resultados hasta el momento discutidos, confirman que la Cx43 tiene un rol clave en la conectividad de la glía envolvente olfatoria durante el desarrollo posnatal desde al menos P2, reflejado en los resultados de ensayos de acople por colorante en animales con delección selectiva de este gen. A su vez, tanto el grado de conectividad glial como el perfil de expresión de la Cx43 durante esta ventana temporal evidenciaron un proceso de maduración de las redes de glía envolvente. Como se detalló anteriormente, las remodelaciones del circuito reportadas durante este período, como la eliminación de axones de neuronas sensoriales en glomérulos heterogéneos y la maduración de las proyecciones de salida del circuito glomerular en las neuronas mitrales, dependen de la actividad sensorial olfativa ^{106,135,151,161}.

La privación sensorial por oclusión unilateral de narina a edad neonatal (P0-1) ha sido ampliamente utilizada para estudiar la influencia de la actividad sensorial en el desarrollo posnatal del bulbo olfatorio ^{106,135,151,161}. El principal parámetro de robustez y éxito de la manipulación es la disminución de la expresión de TH en la capa glomerular del bulbo ¹²⁶, que se ha reportado desde la tercera semana luego de la privación, coincidente con la semana 3 del desarrollo posnatal ^{68,147,148}. En esta tesis extendimos el análisis de la expresión de TH en contexto de oclusión unilateral, para aportar información sobre si este marcador histológico es un indicador sensible para evaluar la eficacia de la privación sensorial temprano en el desarrollo posnatal y si se observa en una

línea modificada genéticamente (PLP-CreERT;tdTomato). Los resultados obtenidos confirman los datos publicados, dado que hallamos una reducción del número de células TH+, del grado de cobertura glomerular por sus proyecciones y del nivel de expresión en la tercera semana luego de la deprivación. Sin embargo, no hallamos alteraciones de la expresión de TH durante las primeras dos semanas de deprivación sensorial. En conjunto estos resultados indican que la expresión de TH no es un marcador sensible a la deprivación durante las primeras semanas de luego de la manipulación.

El hecho de que hayamos observado reducción de los niveles de TH en el bulbo en animales de la línea PLP-CreERT;tdTomato sugiere que es un fenómeno general. Esta manipulación ha sido utilizada de forma reproducible en diferentes cepas salvajes de ratones, así como también múltiples líneas transgénicas ^{148,149,161,305,342,343}, y se espera que se sostenga en animales S100B-GFP, que resta ser confirmado.

En animales con deprivación olfativa unilateral observamos que, tanto en la capa de fibras olfatorias como en la glomerular del bulbo, la Cx43 disminuyó su expresión en el lado deprivado en la primera semana del desarrollo posnatal, y que sus niveles se recuperaron hasta niveles comparables a los del lado control en la segunda semana. Estas observaciones constituyen el primer reporte de alteraciones en la expresión de Cx43 debido a la deprivación sensorial olfativa, y sugieren que la expresión de la Cx43 por parte de la glía envolvente olfatoria y astrocitos del bulbo, es sensible a la actividad sensorial en la primera semana del desarrollo posnatal.

La reducción de la expresión de la Cx43 en la capa de fibras olfatorias no se vio asociada a una reducción en el número de células totales, ni de glía envolvente, ni a nivel estructural en el grado de cobertura de las proyecciones gliales. Estas observaciones coincidieron en las dos líneas reporteras utilizadas, una que marca glía envolvente y astrocitos (S100B-GFP) y otra que marca glía envolvente en las regiones analizadas (PLP-CreERT;tdTomato). Resta evaluar si la disminución de la Cx43 durante la primera semana de deprivación sensorial repercute en el tamaño y maduración de las redes de glía envolvente. En astrocitos se coexpresan las Cx43 y Cx30. Al deletar la Cx43, se produce un aumento compensatorio de la expresión de Cx30 ²⁵³ y, en este contexto, será de

interés evaluar si la reducción en la expresión de Cx43 debido a la privación sensorial conlleva un aumento compensatorio en la expresión de Cx47 u otras Cx.

Los resultados mostraron también que la privación sensorial no solamente provocó una disminución en la expresión de Cx43, sino también una reducción de la expresión de S100B y del grado de cobertura de las proyecciones de astrocitos (reportado por GFP) hacia el neuropilo de los glomérulos en la primera semana del desarrollo posnatal, que desaparece a la segunda semana, lo cual sugiere un retraso en el desarrollo de los astrocitos glomerulares. En los animales S100B-GFP, GFP se expresa por activación de las secuencias reguladoras de S100B, por lo que podemos esperar que una mayor intensidad o área GFP+ correlacione con una mayor activación de las secuencias promotoras del gen S100B y mayor síntesis de las proteínas bajo su regulación. Por esto, el cambio en la señal de GFP no necesariamente refleja un cambio estructural en las células reportadas, pero representa una medida independiente de la sensibilidad temprana de la glía a la privación sensorial. A futuro, se podrá evaluar si la privación sensorial determina una demora en el desarrollo del árbol de proyecciones astrocíticas durante la primera semana de la privación, utilizando un reportero constitutivo dirigido a astrocitos. En la bibliografía se reportó que las redes astrocíticas glomerulares del bulbo reducen su tamaño con 3 semanas de privación sensorial desde el nacimiento, pero no con 2 semanas de privación¹⁴⁸. Se argumentó que la sensibilidad a la actividad sensorial está dada por Cx30, ya que se pierde en animales con delección de esta Cx, que además no se expresa en astrocitos de esta región hasta la tercera semana de edad. Dados estos hallazgos, es importante que a futuro se estudie el grado de conectividad de las redes de astrocitos en la primera semana del desarrollo en contexto de privación sensorial, para determinar si la reducción que observamos en la expresión de Cx43 tiene un impacto funcional. Podría esperarse que el tamaño de las redes no se vea afectado por la privación esta edad, o que tenga un efecto transitorio, ya que durante la segunda semana de privación no se observan diferencias en el tamaño de las redes de astrocitos¹⁴⁸ ni en la abundancia de Cx43 (esta tesis). No descartamos que la Cx43 pueda cumplir un rol diferente del de formar canales y que este sea dependiente de la

actividad neuronal, aunque esa posible función no ha sido abordada experimentalmente en esta tesis.

En este modelo de privación sensorial se han reportado numerosos procesos compensatorios a nivel del circuito bulbar, que podrían mantener la función olfativa a pesar a la privación sensorial ³⁴⁴. A nivel de la primera sinapsis del bulbo se ha observado luego de dos semanas de privación posnatal temprana que aumenta la probabilidad de liberación de neurotransmisores por parte de las neuronas sensoriales ³⁴⁵. También se han reportado posibles compensaciones en componentes de la segunda sinapsis del bulbo olfatorio, dado que las neuronas mitrales del lado privado responden con mayor probabilidad frente a la exposición del animal a odorantes ³⁴⁶. La disminución de la presencia de dopamina luego de la oclusión unilateral, es seguida de un aumento de la densidad de receptores de tipo D2 para dopamina ³⁴⁷. También, la reducción del número de células granulares en el bulbo privado se ve compensada por un aumento de la excitabilidad de las neuronas granulares remanentes ¹³⁶. En este contexto, el aumento de la marca de GFP en la capa glomerular del lado privado en la semana 2 luego de la oclusión unilateral podría deberse a una compensación ante la reducción observada en la primera semana.

En resumen, esta tesis aporta información sobre la sensibilidad de parámetros gliales a la actividad sensorial olfatoria durante el desarrollo posnatal del bulbo. En particular, la expresión de Cx43 por la glía envolvente y astrocitos del bulbo es sensible al *input* sensorial y resulta el marcador tisular más temprano descrito para verificar la eficacia de la privación sensorial en el modelo de oclusión unilateral de una narina. Resta evaluar si el nivel de expresión de Cx43 en la glía del bulbo es sensible a reducciones menos drásticas de *input* sensorial olfatorio durante el desarrollo posnatal.

El objetivo general de esta tesis fue evaluar si las redes gliales del bulbo olfatorio se refinan durante el desarrollo posnatal y si son sensibles a la experiencia sensorial, con la hipótesis de trabajo de que las redes gliales se harían más selectivas durante el desarrollo posnatal, acompañando la selectividad y modulación por la experiencia que se han descrito para la

inervación del bulbo por las neuronas sensoriales a las que la glía se asocia. En esta línea de trabajo, aportamos resultados que señalan que la conectividad de la glía envolvente se refina durante el desarrollo posnatal, en conjunto con la maduración del perfil de expresión de Cx. Adicionalmente, los resultados revelan el rol protagónico de la Cx43 en la formación de redes de glía envolvente desde edad neonatal, e indican que la expresión de esta proteína es sensible al *input* sensorial.

Durante las últimas décadas se ha acumulado evidencia de que las células gliales son actores centrales en la regulación de las funciones de los circuitos neuronales, y que sus funciones requieren de la existencia de redes gliales entre cuyas propiedades se encuentra la capacidad de dar respuestas rápidas, de largo alcance, selectivas y plásticas, que impactan en la homeostasis del medio externo celular y en la señalización neuronal ¹⁶³. Los resultados de esta tesis sientan las bases para el estudio del rol causal de las redes de glía envolvente olfatoria y sus Cx mediadoras en el desarrollo posnatal del bulbo olfatorio. El trabajo futuro permitirá evaluar directamente si el establecimiento del mapa olfatorio, además de mecanismos autónomos y no autónomos mediados por las neuronas, que se encuentran investigados en gran profundidad ^{116,121,151}, incluye mecanismos sensibles a la experiencia mediados por la glía.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Mori, K. & Sakano, H. How is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 110301101035033- (2010).
2. Vincent, A. J., West, A. K. & Meng, I. C. Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *Journal of Neurocytology* vol. 34 65–80 (2005).
3. Relá, L., Bordey, A. & Greer, C. A. Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* **58**, 665–678 (2010).
4. Relá, L., Piantanida, A. P., Bordey, A. & Greer, C. A. Voltage-dependent K(+) currents contribute to heterogeneity of olfactory ensheathing cells. *Glia* (2015) doi:10.1002/glia.22834.
5. Piantanida, A. P. *et al.* Selective Cre-mediated gene deletion identifies connexin 43 as the main connexin channel supporting olfactory ensheathing cell networks. *J. Comp. Neurol.* **527**, 1278–1289 (2019).
6. Pannasch, U. *et al.* Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8467–8472 (2011).
7. Breer, H., Fleischer, J. & Strotmann, J. The sense of smell: Multiple olfactory subsystems. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1465–1475 (2006).
8. Firestein, S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* vol. 413 211–218 (2001).
9. Lin, W., Arellano, J., Slotnick, B. & Restrepo, D. Odors Detected Mice Deficient in Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit A2 Stimulate the Main Olfactory System. *J. Neurosci.* **24**, 3703–3710 (2004).
10. Luo, M., Fee, M. S. & Katz, L. C. Research article: Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science (80-.)*. **299**, 1196–1201 (2003).
11. Mandiyan, V. S., Coats, J. K. & Shah, N. M. Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice. *Nat. Neurosci.* **8**, 1660–1662 (2005).
12. Spehr, M. *et al.* Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *J. Neurosci.* **26**, 1961–1970 (2006).
13. Wang, Z. *et al.* Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium. *J. Neurosci.* **26**, 7375–7379 (2006).
14. Xu, F. *et al.* Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J. Comp. Neurol.* **489**, 491–500 (2005).
15. Sam, M. *et al.* Odorants may arouse, instinctive behaviours. *Nature* **412**, 142 (2001).
16. Trinh, K. & Storm, D. R. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat. Neurosci.* **6**, 519–525 (2003).
17. Marshall, D. A. & Maruniak, J. A. Masera's organ responds to odorants. *Brain Res.* **366**, 329–332 (1986).
18. Piantanida, A. P. Rol de la conexina 43 en las propiedades fisiológicas de la glía envolvente y en la plasticidad de la vía aferente olfatoria. (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2016).
19. Brechbühl, J., Klaey, M. & Broillet, M. C. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science (80-.)*. **321**, 1092–1095 (2008).
20. Purves, D. Neurociencia.
21. Sullivan, S. L., Bohm, S., Ressler, K. J., Horowitz, L. F. & Buck, L. B. Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium. *Neuron* **15**, 779–789 (1995).

22. Elsaesser, R. & Paysan, J. The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neuroscience* vol. 8 (2007).
23. Buck, L. & Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175–187 (1991).
24. Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A. & Mombaerts, P. Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the B2AR. *Cell* **117**, 833–846 (2004).
25. O'Dowd, B. F., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 67–83 (1989).
26. Frings, S., Benz, S. & Lindemann, B. Current recording from sensory cilia of olfactory receptor cells in situ. II. Role of mucosal Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ ions. *J. Gen. Physiol.* **97**, 725–47 (1991).
27. Nakamura, T. & Gold, G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* vol. 325 442–4 (1987).
28. Firestein, S. & Werblin, F. Odor-induced membrane currents in vertebrate-olfactory receptor neurons. *Science* **244**, 79–82 (1989).
29. Leinders-Zufall, T. *et al.* Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14507–14512 (2007).
30. Lin, W., Margolskee, R., Donnert, G., Hell, S. W. & Restrepo, D. Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2471–2476 (2007).
31. Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J. R. & Smith, D. P. Targeted mutation of a Drosophila odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J. Neurosci.* **23**, 9906–12 (2003).
32. Keller, A. & Vosshall, L. B. Influence of odorant receptor repertoire on odor perception in humans and fruit flies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5614–9 (2007).
33. Kreher, S. A., Mathew, D., Kim, J. & Carlson, J. R. Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron* **59**, 110–124 (2008).
34. Su, C. Y., Menuz, K. & Carlson, J. R. Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell* vol. 139 45–59 (2009).
35. Caggiano, M., Kauer, J. S. & Hunter, D. D. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* **13**, 339–352 (1994).
36. Jia, C., Doherty, J. P., Crudgington, S. & Hegg, C. C. Activation of purinergic receptors induces proliferation and neuronal differentiation in Swiss Webster mouse olfactory epithelium. *Neuroscience* **163**, 120–8 (2009).
37. Schwob, J. E., Huard, J. M., Luskin, M. B. & Youngentob, S. L. Retroviral lineage studies of the rat olfactory epithelium. *Chem Senses* **19**, 671–682 (1994).
38. Kim, E. J., Leung, C. T., Reed, R. R. & Johnson, J. E. In Vivo Analysis of Ascl1 Defined Progenitors Reveals Distinct Developmental Dynamics during Adult Neurogenesis and Gliogenesis. *J. Neurosci.* **27**, 12764–12774 (2007).
39. Beites, C. L., Kawauchi, S., Crocker, C. E. & Calof, A. L. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res* **306**, 309–316 (2005).
40. Rodriguez-Gil, D. J. *et al.* Odorant receptors regulate the final glomerular coalescence of olfactory sensory neuron axons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201417955 (2015) doi:10.1073/pnas.1417955112.
41. Graziadei, G. A. & Graziadei, P. P. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory

- sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* **8**, 197–213 (1979).
42. Au, W. W., Treloar, H. B. & Greer, C. A. Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J. Comp. Neurol.* **446**, 68–80 (2002).
 43. Doucette, J. R. The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat Rec* **210**, 385–391 (1984).
 44. Doucette, R. PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J Comp Neurol* **312**, 451–466 (1991).
 45. Fraher, J. P. The transitional zone and CNS regeneration. *J Anat* **196** (Pt 1, 137–158 (2000).
 46. Doucette, R. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* **3**, 433–449 (1990).
 47. Ramón-Cueto, A. & Valverde, F. Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* **14**, 163–173 (1995).
 48. Price, J. L. & Powell, T. P. S. the Morphology of the Granule Cells of the Olfactory Bulb. *J. Cell Sci* **7**, 91–123 (1970).
 49. Valverde, F. & Lopez-Mascaraque, L. Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J. Comp. Neurol.* **307**, 658–674 (1991).
 50. Kosaka, K. *et al.* Distinct domanical and lamellar distribution of clustered lipofuscin granules in microglia in the main olfactory bulb of young mice. *Neurosci. Res.* **65**, 286–295 (2009).
 51. Wu, C. H., Chien, H. F., Chang, C. Y. & Ling, E. A. Heterogeneity of antigen expression and lectin labeling on microglial cells in the olfactory bulb of adult rats. **28**, 67–75 (1997).
 52. Pinching, a J. & Powell, T. P. The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J. Cell Sci* **9**, 379–409 (1971).
 53. Locatelli, F. F. & Relat, L. Mosaic activity patterns and their relation to perceptual similarity: Open discussions on the molecular basis and circuitry of odor recognition. *J. Neurochem.* **131**, 546–553 (2014).
 54. Mori, K., Nagao, H. & Yoshihara, Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* **286**, 711–5 (1999).
 55. Barrios, A. W., Núñez, G., Sánchez Quinteiro, P. & Salazar, I. Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front. Neuroanat.* **8**, 63 (2014).
 56. Liebich, H. G. [Structure of the upper airways of the white rat (*Mus rattus norvegicus*, var. albinos)]. *Anat. Anz.* **138**, 170–9 (1975).
 57. Ressler, K. J., Sullivan, S. L. & Buck, L. B. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* **73**, 597–609 (1993).
 58. Vassar, R., Ngai, J. & Axel, R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* **74**, 309–318 (1993).
 59. Ressler, K. J., Sullivan, S. L. & Buck, L. B. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* **79**, 1245–1255 (1994).
 60. Mombaerts, P. Targeting olfaction. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 481–486 (1996).
 61. Feinstein, P. & Mombaerts, P. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* **117**, 817–831 (2004).
 62. Miyamichi, K. Continuous and Overlapping Expression Domains of Odorant Receptor Genes in the Olfactory Epithelium Determine the Dorsal/Ventral Positioning of Glomeruli in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* **25**, 3586–3592 (2005).
 63. Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M. & Axel, R. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* **93**, 47–60 (1998).

64. Macrides, F. & Schneider, S. P. Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol* **208**, 419–430 (1982).
65. Yan, Z. *et al.* Precise Circuitry Links Bilaterally Symmetric Olfactory Maps. *Neuron* **58**, 613–624 (2008).
66. Schoppa, N. E. & Urban, N. N. Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends Neurosci* **26**, 501–506 (2003).
67. Whitman, M. C. & Greer, C. A. Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Dev. Neurobiol.* **67**, 1079–1093 (2007).
68. Baker, H. Unilateral, neonatal olfactory deprivation alters tyrosine hydroxylase expression but not aromatic amino acid decarboxylase or gaba immunoreactivity. *Neuroscience* **36**, 761–771 (1990).
69. Kawamoto, M. *et al.* The alteration of odor-induced c-Fos immunoreactivity in the rat olfactory bulb after olfactory nerve transection. *J Neurol* **250**, 51–54 (2003).
70. Sawada, M. *et al.* Sensory Input Regulates Spatial and Subtype-Specific Patterns of Neuronal Turnover in the Adult Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* **31**, 11587–11596 (2011).
71. Briñón, J. G. *et al.* Coexpression of neurocalcin with other calcium-binding proteins in the rat main olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* **407**, 404–414 (1999).
72. Liberia, T. *et al.* Characterization of a population of tyrosine hydroxylase-containing interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *Neuroscience* **217**, 140–153 (2012).
73. Iwema, C. L., Fang, H., Kurtz, D. B., Youngentob, S. L. & Schwob, J. E. Odorant Receptor Expression Patterns Are Restored in Lesion-Recovered Rat Olfactory Epithelium. *Neuroscience* **24**, 356–369 (2004).
74. Xiong, W. & Chen, W. R. Dynamic gating of spike propagation in the mitral cell lateral dendrites. *Neuron* **34**, 115–126 (2002).
75. Nagayama, S., Homma, R. & Imamura, F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits* **8**, 98 (2014).
76. Igarashi, K. M. *et al.* Parallel Mitral and Tufted Cell Pathways Route Distinct Odor Information to Different Targets in the Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* **32**, 7970–7985 (2012).
77. Nagayama, S. Differential Axonal Projection of Mitral and Tufted Cells in the Mouse Main Olfactory System. *Front. Neural Circuits* **4**, 1–8 (2010).
78. Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R. & Fishell, G. The Distinct Temporal Origins of Olfactory Bulb Interneuron Subtypes. *J. Neurosci.* **28**, 3966–3975 (2008).
79. Doucette, R. Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech* **24**, 113–130 (1993).
80. Au, E. & Roskams, A. J. Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* **41**, 224–236 (2003).
81. Vincent, A. J., Taylor, J. M., Choi-Lundberg, D. L., West, A. K. & Chuah, M. I. Genetic expression profile of olfactory ensheathing cells is distinct from that of Schwann cells and astrocytes. *Glia* **51**, 132–147 (2005).
82. Donato, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1450 191–231 (1999).
83. Astic, L., Pellier-Monnin, V. & Godinot, F. Spatio-temporal patterns of ensheathing cell differentiation in the rat olfactory system during development. *Neuroscience* **84**, 295–307 (1998).
84. Valverde, F., Santacana, M. & Heredia, M. Formation of an olfactory glomerulus: Morphological aspects of development and organization. *Neuroscience* **49**, 255–275 (1992).

85. Franceschini, I. A. & Barnett, S. C. Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol* **173**, 327–343 (1996).
86. Ubink, R., Halasz, N., Zhang, X., Dagerlind, Å. & Hökfelt, T. Neuropeptide tyrosine is expressed in ensheathing cells around the olfactory nerves in the rat olfactory bulb. *Neuroscience* **60**, 709–726 (1994).
87. Barnett, S. C., Hutchins, A. M. & Noble, M. Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Dev. Biol.* **155**, 337–350 (1993).
88. Ubink, R. & Hökfelt, T. Expression of neuropeptide Y in olfactory ensheathing cells during prenatal development. *J. Comp. Neurol.* **423**, 13–25 (2000).
89. Feng, L., Hatten, M. E. & Heintz, N. Brain lipid-binding protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* **12**, 895–908 (1994).
90. Murdoch, B. & Roskams, A. J. A novel embryonic nestin-expressing radial glia-like progenitor gives rise to zonally restricted olfactory and vomeronasal neurons. *J. Neurosci.* **28**, 4271–4282 (2008).
91. Miller, S. J. *et al.* Brain lipid binding protein in axon-Schwann cell interactions and peripheral nerve tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2213–24 (2003).
92. Dickinson, P. J. *et al.* Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: Evidence from developmental studies. *J. Neurocytol.* **26**, 181–189 (1997).
93. Timsit, S. *et al.* Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J. Neurosci.* **15**, 1012–24 (1995).
94. Michalski, J.-P., Anderson, C., Beauvais, A., De Repentigny, Y. & Kothary, R. The proteolipid protein promoter drives expression outside of the oligodendrocyte lineage during embryonic and early postnatal development. *PLoS One* **6**, e19772 (2011).
95. Doucette, R. Development of the nerve fiber layer in the olfactory bulb of mouse embryos. *J. Comp. Neurol.* **285**, 514–527 (1989).
96. Fairless, R., Frame, M. C. & Barnett, S. C. N-cadherin differentially determines Schwann cell and olfactory ensheathing cell adhesion and migration responses upon contact with astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 253–263 (2005).
97. Royet, J. P., Distel, H., Hudson, R. & Gervais, R. A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Res.* **788**, 35–42 (1998).
98. Bozza, T. C. & Mombaerts, P. Olfactory coding: Revealing intrinsic representations of odors. *Current Biology* vol. 11 (2001).
99. Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C. & Mombaerts, P. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J. Neurosci.* **22**, 3033–3043 (2002).
100. Lodovichi, C., Belluscio, L. & Katz, L. C. Functional topography of connections linking mirror-symmetric maps in the mouse olfactory bulb. *Neuron* **38**, 265–276 (2003).
101. Schoenfeld, T. A. & Cleland, T. A. The anatomical logic of smell. *Trends in Neurosciences* vol. 28 620–627 (2005).
102. Buck, L. B. Olfactory Receptors and Odor Coding in Mammals. *Nutr. Rev.* **62**, S184–S188 (2004).
103. Conzelmann, S., Malun, D., Breer, H. & Strotmann, J. Brain targeting and glomerulus formation of two olfactory neuron populations expressing related receptor types. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1623–1632 (2001).
104. Royal, S. J. & Key, B. Development of P2 olfactory glomeruli P2-internal ribosome entry site- tau-LacZ transgenic mice. *J. Neurosci.* **19**, 9856–9864 (1999).
105. Potter, S. M. *et al.* Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J. Neurosci.* **21**, 9713–9723 (2001).

106. Zou, D. J. *et al.* Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science (80-)*. **304**, 1976–1979 (2004).
107. Bailey, M. S., Puche, A. C. & Shipley, M. T. Development of the olfactory bulb: Evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J. Comp. Neurol.* **415**, 423–448 (1999).
108. Gonzalez, M. D. L., Malemud, C. J. & Silver, J. Role of astroglial extracellular matrix in the formation of rat olfactory bulb glomeruli. *Experimental Neurology* vol. 123 91–105 (1993).
109. Hinds, J. W. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *J. Comp. Neurol.* **134**, 305–321 (1968).
110. 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.* **137**, 433–457 (1969).
111. Bayer, S. A. 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.* **50**, 329–340 (1983).
112. Rosselli-Austin L, A. J. The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol* (1979).
113. Luskin, M. B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173–189 (1993).
114. Treloar, H. B., Miller, A. M., Ray, A. & Greer, C. A. Development of the olfactory system. in *The Neurobiology of Olfaction* 131–155 (CRC Press, 2009). doi:10.1201/9781420071993-c5.
115. Whitman, M. C. & Greer, C. A. Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: Basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J. Neurosci.* **27**, 9951–9961 (2007).
116. Serizawa, S. *et al.* Negative Feedback Regulation Ensures the One Receptor-One Olfactory Neuron Rule in Mouse. *Science (80-)*. **302**, 2088–2094 (2003).
117. Lewcock, J. W. & Reed, R. R. A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1069–1074 (2004).
118. Tian, H. & Ma, M. Activity plays a role in eliminating olfactory sensory neurons expressing multiple odorant receptors in the mouse septal organ. *Mol. Cell. Neurosci.* **38**, 484–488 (2008).
119. Sengoku, S. *et al.* Axonal projection of olfactory sensory neurons during the developmental and regeneration processes. *Neuroreport* **12**, 1061–1066 (2001).
120. Takeuchi, H. *et al.* Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell* **141**, 1056–1067 (2010).
121. Imai, T. *et al.* Pre-Target axon sorting establishes the neural map topography. *Science (80-)*. **325**, 585–590 (2009).
122. Cutforth, T. *et al.* Axonal ephrin-As and odorant receptors: Coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell* **114**, 311–322 (2003).
123. Serizawa, S. *et al.* A Neuronal Identity Code for the Odorant Receptor-Specific and Activity-Dependent Axon Sorting. *Cell* **127**, 1057–1069 (2006).
124. Angely, C. J. & Coppola, D. M. How does long-term odor deprivation affect the olfactory capacity of adult mice? *Behav. Brain Funct.* **6**, 26 (2010).
125. Cheetham, C. E. J., Park, U. & Belluscio, L. Rapid and continuous activity-dependent plasticity of olfactory sensory input. *Nat. Commun.* **7**, 1–11 (2016).
126. Brunjes, P. C. Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res Brain Res Rev* (1994) doi:10.1016/0165-0173(94)90007-8.
127. Brunjes, P. C., Caggiano, A. O., Korol, D. L. & Stewart, J. S. Unilateral olfactory deprivation: effects on succinate dehydrogenase histochemistry and [3H]leucine

- incorporation in the olfactory mucosa. *Dev. Brain Res.* **62**, 239–244 (1991).
128. Farbman, A. I., A.I., Brunjes, P.C., Rentfro, L., Michas, J. and R., S., .I. *Newosci.*, **8** (1988) & 3290-3295. The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J Neurosci* (1988).
 129. Cummings, D. M. & Brunjes, P. C. Changes in cell proliferation in the developing olfactory epithelium following neonatal unilateral naris occlusion. *Exp. Neurol.* **128**, 124–128 (1994).
 130. Benson, T. E., Ryugo, D. K. & Hinds, J. W. Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system: A light and electron microscopic, morphometric analysis. *J. Neurosci.* **4**, 638–653 (1984).
 131. Skeen, L. C., Due, B. R. & Douglas, F. E. Neonatal sensory deprivation reduces tufted cell number in mouse olfactory bulbs. *Neurosci. Lett.* **63**, 5–10 (1986).
 132. Skeen, L. C., Due, B. R. & Douglas, F. E. Effects of early anosmia on two classes of granule cells in developing mouse olfactory bulbs. *Neurosci. Lett.* **54**, 301–306 (1985).
 133. Brunjes, P. C. & Borrer, M. J. Unilateral odor deprivation: Differential effects due to time of treatment. *Brain Res. Bull.* **11**, 501–503 (1983).
 134. Cummings, D. M. & Brunjes, P. C. The Effects of Variable Periods of Functional Deprivation on Olfactory Bulb Development in Rats. *Exp. Neurol.* **148**, 360–366 (1997).
 135. Frazier-Cierpial, L. & Brunjes, P. C. Early postnatal cellular proliferation and survival in the olfactory bulb and rostral migratory stream of normal and unilaterally odor-deprived rats. *J. Comp. Neurol.* **289**, 481–492 (1989).
 136. Saghatelian, A. *et al.* Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron* **46**, 103–116 (2005).
 137. Brunjes, P. C. Unilateral odor deprivation: Time course of changes in laminar volume. *Brain Res. Bull.* **14**, 233–237 (1985).
 138. Frazier, L. L. & Brunjes, P. C. Unilateral odor deprivation: Early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number. *J. Comp. Neurol.* **269**, 355–370 (1988).
 139. Baker, H. & Farbman, A. I. Olfactory afferent regulation of the dopamine phenotype in the fetal rat olfactory system. *Neuroscience* **52**, 115–134 (1993).
 140. Baker, H. *et al.* Olfactory bulb dopamine neurons survive deafferentation-induced loss of tyrosine hydroxylase. *Neuroscience* **11**, (1984).
 141. Baker, H., Kawano, T., Margolis, F. L. & Joh, T. H. Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J. Neurosci.* **3**, 69–78 (1983).
 142. Baker, H., Morel, K., Stone, D. M. & Maruniak, J. A. Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res.* **614**, 109–116 (1993).
 143. Kosaka, T., Kosaka, K., Hama, K., Wu, J. Y. & Nagatsu, I. Differential effect of functional olfactory deprivation on the GABAergic and catecholaminergic traits in the rat main olfactory bulb. *Brain Res.* **413**, 197–203 (1987).
 144. Stone, D. M., Grillo, M., Margolis, F. L., Joh, T. H. & Baker, H. Differential effect of functional olfactory bulb deafferentation on tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase messenger RNA levels in rodent juxtglomerular neurons. *J. Comp. Neurol.* **311**, 223–233 (1991).
 145. Stone, D. M., Wessel, T., Joh, T. H. & Baker, H. Decrease in tyrosine hydroxylase, but not aromatic l-amino acid decarboxylase, messenger RNA in rat olfactory bulb following neonatal, unilateral odor deprivation. *Mol. Brain Res.* **8**, 291–300 (1990).
 146. Bautze, V. *et al.* Mammalian-specific OR37 receptors are differentially activated by distinct odorous fatty aldehydes. *Chem. Senses* **37**, 479–493 (2012).
 147. McLean, J. H., Darby-King, A. & Bonnell, W. S. Neonatal olfactory sensory deprivation decreases BDNF in the olfactory bulb of the rat. *Dev. Brain Res.* **128**, 17–24 (2001).

148. Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G. & Giaume, C. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18442–18446 (2011).
149. Grier, B. D., Belluscio, L. & Cheetham, C. E. J. Olfactory sensory activity modulates microglial-neuronal interactions during dopaminergic cell loss in the olfactory bulb. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, (2016).
150. Carmen Martinez Garcia, M., Cuervas-Mons Finat, M., Latorre Macarron, E., Bullon Sopelana, M. & Gayoso Rodriguez, M. J. Responses of the astroglia in sensory deprived olfactory bulb of developing rats. *Histol. Histopathol.* **6**, 235–239 (1991).
151. Nakatani, H., Serizawa, S., Nakajima, M., Imai, T. & Sakano, H. Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost zone specificity in the olfactory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 2425–2432 (2003).
152. Yu, C. R. *et al.* Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* **42**, 553–566 (2004).
153. Imai, T. & Sakano, H. Odorant receptor-mediated signaling in the mouse. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 18 251–260 (2008).
154. Imai, T., Suzuki, M. & Sakano, H. Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science (80-)*. **314**, 657–661 (2006).
155. Zheng, C., Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I. & Mombaerts, P. Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* **26**, 81–91 (2000).
156. Zhao, H. & Reed, R. R. X Inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell* **104**, 651–660 (2001).
157. Cao L, Dhilla A, Mukai J, Blazeski R, Lodovichi C, Mason C, G. J. Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition in vivo. *Curr Biol* **9**, 19–22 (2007).
158. Blanchart, A., De Carlos, J. A. & López-Mascaraque, L. Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* **496**, 529–543 (2006).
159. Lin, D. M. *et al.* Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron* **26**, 69–80 (2000).
160. Matsutani S, Y. N. Differentiation of mitral cell dendrites in the developing main olfactory bulbs of normal and naris-occluded rats. *J Comp Neurol.* (2000) doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000320)418:4<402::AID-CNE3>3.0.CO.
161. Maher, B. J., McGinley, M. J. & Westbrook, G. L. Experience-dependent maturation of the glomerular microcircuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16865–16870 (2009).
162. Wilson, D. A. & Sullivan, R. M. The D2 antagonist spiperone mimics the effects of olfactory deprivation on mitral/tufted cell odor response patterns. *J. Neurosci.* **15**, 5574–5581 (1995).
163. Pannasch, U. & Rouach, N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci.* **36**, 405–17 (2013).
164. Goodenough, D. A., Goliger, J. A. & Paul, D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry* vol. 65 475–502 (1996).
165. Theis, M., Söhl, G., Eiberger, J. & Willecke, K. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* **28**, 188–195 (2005).
166. Nualart-Marti, A., Solsona, C. & Fields, R. D. Gap junction communication in myelinating glia. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 69–78 (2013).
167. Nielsen, M. S. *et al.* Gap junctions. *Compr. Physiol.* **2**, 1981–2035 (2012).
168. Orellana, J. A. *et al.* Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 11 369–399 (2009).

169. Bennett, M. V. L., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F. & Sáez, J. C. New roles for astrocytes: Gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends in Neurosciences* vol. 26 610–617 (2003).
170. Roux, L. *et al.* Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J. Neurosci.* **35**, 15339–15352 (2015).
171. Elias, L. A. B., Wang, D. D. & Kriegstein, A. R. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* **448**, 901–907 (2007).
172. Kardami, E. *et al.* The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* vol. 94 245–264 (2007).
173. Bruzzone, R., White, T. W. & Paul, D. L. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* **238**, 1–27 (1996).
174. White, T. W., Paul, D. L., Goodenough, D. A. & Bruzzone, R. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell* **6**, 459–470 (1995).
175. Brink, P. R. *et al.* Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **273**, (1997).
176. Falk, M. M. Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J. Cell Sci.* **113**, 4109–4120 (2000).
177. Bruzzone, R. & Giaume, C. Connexins and information transfer through glia. *Adv. Exp. Med. Biol.* **468**, 321–337 (2000).
178. Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D. & Rouach, N. Astroglial networks : a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, (2010).
179. Eifgang, C. *et al.* Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* **129**, 805–817 (1995).
180. Bevans, C. G., Kordel, M., Rhee, S. K. & Harris, A. L. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J. Biol. Chem.* **273**, 2808–2816 (1998).
181. Barrio, L. C. *et al.* Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8410–8414 (1991).
182. Yum, S. W. *et al.* Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotypic channels. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **293**, (2007).
183. Wallraff, A. The Impact of Astrocytic Gap Junctional Coupling on Potassium Buffering in the Hippocampus. *J. Neurosci.* **26**, 5438–5447 (2006).
184. Nagy, J. I. *et al.* Connexin26 in adult rodent central nervous system: Demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J. Comp. Neurol.* **441**, 302–323 (2001).
185. Mercier F, H. G. Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *J Comp Neurol* (2001) doi:10.1002/1096-9861(20010226)431:1<88::aid-cne1057>3.0.co;2-d.
186. Nagy, J. I. & Rash, J. E. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res. Rev.* **32**, 29–44 (2000).
187. Yamamoto, T., Ochalski, A., Hertzberg, E. L. & Nagy, J. I. On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression. *J. Comp. Neurol.* **302**, 853–883 (1990).
188. Dahl, E. *et al.* Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J. Biol. Chem.* **271**, 17903–17910 (1996).
189. Bolaños, J. P. & Medina, J. M. Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **66**, 2091–2099 (1996).

190. Schools, G. P., Zhou, M. & Kimelberg, H. K. Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: Evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *J. Neurophysiol.* **96**, 1383–1392 (2006).
191. Dermietzel, R. *et al.* Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 10148–10152 (1989).
192. Scherer, S. S. *et al.* Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J. Neurosci.* **15**, 8281–8294 (1995).
193. Altevogt, B. M., Kleopa, K. A., Postma, F. R., Scherer, S. S. & Paul, D. L. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* **22**, 6458–6470 (2002).
194. Altevogt, B. M. & Paul, D. L. Four Classes of Intercellular Channels between Glial Cells in the CNS. *J. Neurosci.* **24**, 4313–4323 (2004).
195. Parenti, R. *et al.* Dynamic expression of Cx47 in mouse brain development and in the cuprizone model of myelin plasticity. *Glia* **58**, 1594–1609 (2010).
196. Odermatt, B. *et al.* Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J. Neurosci.* **23**, 4549–4559 (2003).
197. Menichella, D. M., Goodenough, D. A., Sirkowski, E., Scherer, S. S. & Paul, D. L. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J. Neurosci.* **23**, 5963–5973 (2003).
198. Goodenough, D. A., P. D. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspec Biol* 1–3 (2009) doi:10.1101/cshperspect.a002576.
199. Rich, C. A. *et al.* Olfactory ensheathing cells abutting the embryonic olfactory bulb express Frzb, whose deletion disrupts olfactory axon targeting. *Glia* 2617–2631 (2018) doi:10.1002/glia.23515.
200. Claus, L. *et al.* Barreloid borders and neuronal activity shape panglial gap junction-coupled networks in the mouse thalamus. *Cereb. Cortex* **28**, 213–222 (2018).
201. Fasciani, I. *et al.* Directional coupling of oligodendrocyte connexin-47 and astrocyte connexin-43 gap junctions. *Glia* **66**, 2340–2352 (2018).
202. Griemsmann, S. *et al.* Characterization of panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells. *Cereb. Cortex* **25**, 3420–3433 (2015).
203. Meyer, N. *et al.* Oligodendrocytes in the Mouse Corpus Callosum Maintain Axonal Function by Delivery of Glucose. *Cell Rep.* **22**, 2383–2394 (2018).
204. Wasseff, S. K. & Scherer, S. S. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol. Dis.* **42**, 506–513 (2011).
205. Rash, J. E. *et al.* Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun. Adhes.* **8**, 315–320 (2001).
206. Maglione, M. *et al.* Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by Connexin47 and Connexin32. *Glia* **58**, 1104–1117 (2010).
207. Nagy, J. I., Ionescu, A. V., Lynn, B. D. & Rash, J. E. Coupling of Astrocyte Connexins Cx26, Cx30, Cx43 to Oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from Normal and Connexin32 Knockout Mice. *Glia* **44**, 205–218 (2003).
208. Tress, O. *et al.* Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS. *J. Neurosci.* **32**, 7499–7518 (2012).
209. Niu, J. *et al.* Connexin-based channels contribute to metabolic pathways in the oligodendroglial lineage. *J. Cell Sci.* **129**, 1902–1914 (2016).
210. May, D., Tress, O., Seifert, G. & Willecke, K. Connexin47 protein phosphorylation and stability in oligodendrocytes depend on expression of connexin43 protein in astrocytes.

- J. Neurosci.* **33**, 7985–7996 (2013).
211. Konishi, T. Dye coupling between mouse Schwann cells. *Brain Res.* **508**, 85–92 (1990).
 212. Chandross, K. J. *et al.* TNF α inhibits Schwann cell proliferation, connexin46 expression, and gap junctional communication. *Mol. Cell. Neurosci.* **7**, 479–500 (1996).
 213. Li, J. *et al.* Analysis of connexin expression during mouse Schwann cell development identifies Connexin29 as a novel marker for the transition of neural crest to precursor cells. *Glia* **55**, 93–103 (2007).
 214. Abudara, V., Retamal, M. A., Del Rio, R. & Orellana, J. A. Synaptic functions of hemichannels and pannexons: A double-edged sword. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–24 (2018).
 215. Rouach, N. *et al.* Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol. Cell* **94**, 457–475 (2002).
 216. Parenti R, Campisi A, Vanella A, C. F. Immunocytochemical and RT-PCR analysis of connexin36 in cultures of mammalian glial cells. *Arch Ital Biol* (2002).
 217. Maezawa, I. & Jin, L. W. Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J. Neurosci.* **30**, 5346–5356 (2010).
 218. Eugenín, E. A. *et al.* Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4190–4195 (2001).
 219. Moon, Y., Choi, S. Y., Kim, K., Kim, H. & Sun, W. Expression of connexin29 and 32 in the penumbra region after traumatic brain injury of mice. *Neuroreport* **21**, 1135–1139 (2010).
 220. Martínez, A. D., Eugenín, E. A., Brañes, M. C., Bennett, M. V. L. & Sáez, J. C. Identification of second messengers that induce expression of functional gap junctions in microglia cultured from newborn rats. *Brain Res.* **943**, 191–201 (2002).
 221. Stavermann, M. *et al.* Calcium-induced calcium release and gap junctions mediate large-scale calcium waves in olfactory ensheathing cells in situ. *Cell Calcium* **58**, 215–225 (2015).
 222. Rieger, A., Deitmer, J. W. & Lohr, C. Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* **55**, 352–359 (2007).
 223. Charles, A. Reaching out beyond the synapse: glial intercellular waves coordinate metabolism. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* vol. 2005 (2005).
 224. Haydon, P. G. Glia: Listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 185–193 (2001).
 225. Dermietzel, R., Hertzberg, E. L., Kessler, J. A. & Spray, D. C. Gap junctions between cultured astrocytes: Immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J. Neurosci.* **11**, 1421–1432 (1991).
 226. Rash, J. E., Yasumura, T., Dudek, F. E. & Nagy, J. I. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J. Neurosci.* **21**, 1983–2000 (2001).
 227. Giaume, C., Marin, P., Cordier, J., Glowinski, J. & Premont, J. Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5577–5581 (1991).
 228. Wallraff, A. *et al.* The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* **26**, 5438–5447 (2006).
 229. Micevych, P. E. & Abelson, L. Distribution of mRNAs coding for liver and heart gap junction proteins in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **305**, 96–118 (1991).
 230. Nadarajah, B., Thomaidou, D., Evans, W. H. & Parnavelas, J. G. Gap junctions in the

- adult cerebral cortex: Regional differences in their distribution and cellular expression of connexins. *J. Comp. Neurol.* **376**, 326–342 (1996).
231. Kunzelmann, P. *et al.* Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia* **25**, 111–119 (1999).
232. Gosejacob, D. *et al.* Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling. *Glia* **59**, 511–519 (2011).
233. Nagy, J. I., Patel, D., Ochalski, P. A. Y. & Stelmack, G. L. Connexin30 in rodent, cat and human brain: Selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junction and late developmental appearance. *Neuroscience* **88**, 447–468 (1999).
234. Dermietzel, R. *et al.* Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Research Reviews* vol. 32 45–56 (2000).
235. Alvarez-Maubecin, V., García-Hernández, F., Williams, J. T. & Van Bockstaele, E. J. Functional coupling between neurons and glia. *J. Neurosci.* **20**, 4091–4098 (2000).
236. Šhol, G., Eiberger, J., Jung, Y. T., Kozak, C. A. & Willecke, K. The mouse gap junction gene Connexin29 is highly expressed in sciatic nerve and regulated during brain development. *Biol. Chem.* **382**, 973–978 (2001).
237. Sargiannidou, I. *et al.* Human oligodendrocytes express Cx31.3: Function and interactions with Cx32 mutants. *Neurobiol. Dis.* **30**, 221–233 (2008).
238. Dermietzel, R. *et al.* Oligodendrocytes express gap junction proteins connexin32 and connexin45. *Glia* **20**, 101–114 (1997).
239. Li, J., Hertzberg, E. L. & Nagy, J. I. Connexin32 in oligodendrocytes and association with myelinated fibers in mouse and rat brain. *J. Comp. Neurol.* **379**, 571–591 (1997).
240. Li, X. *et al.* Connexin47, connexin29 and connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience* **126**, 611–630 (2004).
241. Odermatt, B. *et al.* Connexin 47 (Cx47)-Deficient Mice with Enhanced Green Fluorescent Protein Reporter Gene Reveal Predominant Oligodendrocytic Expression of Cx47 and Display Vacuolized Myelin in the CNS. *J. Neurosci.* **23**, 4549 (2003).
242. Takeuchi, H. *et al.* Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J. Biol. Chem.* **281**, 21362–21368 (2006).
243. Dobrenis, K. *et al.* Human and mouse microglia express connexin36, and functional gap junctions are formed between rodent microglia and neurons. *J. Neurosci. Res.* **82**, 306–315 (2005).
244. Martinez, A. D., Hayrapetyan, V., Moreno, A. P. & Beyer, E. C. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ. Res.* **90**, 1100–1107 (2002).
245. Barnett, S. C., Thompson, R. J., Lakatos, A. & Pitts, J. Gap junctional communication and connexin expression in cultured olfactory ensheathing cells. *J. Neurosci. Res.* **65**, 520–528 (2001).
246. Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I. & Giaume, C. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* **28**, 5207–5217 (2008).
247. Houades, V. *et al.* Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. in *Neuron Glia Biology* vol. 2 3–14 (Neuron Glia Biol, 2006).
248. Tsai, H. H. *et al.* Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science (80-.)*. **337**, 358–362 (2012).
249. Roux L, G. C. Two astroglial networks are differentially regulated by neuronal activity in the olfactory glomerular layer. *Glia Suppl*, (2009).

250. Allaman, I., Bélanger, M. & Magistretti, P. J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends in Neurosciences* vol. 34 76–87 (2011).
251. Oliet, S. H., Piet, R. & Poulain, D. A. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* **292**, 923–6 (2001).
252. Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E. A. & Buzsáki, G. Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J. Neurosci.* **30**, 15298–303 (2010).
253. Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. & Giaume, C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science (80-.)*. **322**, 1551–1555 (2008).
254. Gandhi, G. K., Cruz, N. F., Ball, K. K., Theus, S. A. & Dienel, G. A. Selective astrocytic gap junctional trafficking of molecules involved in the glycolytic pathway: Impact on cellular brain imaging. *J. Neurochem.* **110**, 857–869 (2009).
255. Medina, J. M., Giaume, C. & Taberner, A. Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **468**, 361–371 (2000).
256. Rouach, N. Hippocampal Synaptic Transmission. *Science (80-.)*. **1551**, 1551–1555 (2009).
257. Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q. S. & Nedergaard, M. Signaling at the gliovascular interface. *J. Neurosci.* **23**, 9254–9262 (2003).
258. Zonta, M. *et al.* Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* **6**, 43–50 (2003).
259. Carmignoto, G. & Gómez-Gonzalo, M. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Research Reviews* vol. 63 138–148 (2010).
260. Beiersdorfer, A., Scheller, A., Kirchhoff, F. & Lohr, C. Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca²⁺ transients and neurovascular coupling. *Glia* **67**, 1385–1400 (2019).
261. Thyssen, A. *et al.* Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15258–15263 (2010).
262. De Pina-Benabou, M. H., Srinivas, M., Spray, D. C. & Scemes, E. Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *J. Neurosci.* **21**, 6635–6643 (2001).
263. Kristian Enkvist, M. O. & McCarthy, K. D. Astroglial Gap Junction Communication Is Increased by Treatment with Either Glutamate or High K⁺ Concentration. *J. Neurochem.* **62**, 489–495 (1994).
264. Di Castro, M. A. *et al.* Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* **14**, 1276–1284 (2011).
265. Panatier, A. *et al.* Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* **146**, 785–798 (2011).
266. Perea, G. & Araque, A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* **25**, 2192–2203 (2005).
267. Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaillle, J. C. & Robitaille, R. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci.* **26**, 5370–5382 (2006).
268. Pascual, O. *et al.* Neurobiology: Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science (80-.)*. **310**, 113–116 (2005).
269. Poskanzer, K. E. & Yuste, R. Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18453–18458 (2011).
270. Lutz, S. E. *et al.* Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating

- phenotype and hippocampal CA1 vacuolation. *J. Neurosci.* **29**, 7743–7752 (2009).
271. Dere, E. *et al.* Connexin30-deficient mice show increased emotionality and decreased rearing activity in the open-field along with neurochemical changes. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 629–638 (2003).
272. Frisch, C. *et al.* Mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43 exhibit increased exploratory behaviour, impaired motor capacities, and changes in brain acetylcholine levels. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 2313–8 (2003).
273. Theis, M. *et al.* Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J. Neurosci.* **23**, 766–776 (2003).
274. Wiencken-Barger, A. E., Djukic, B., Casper, K. B. & McCarthy, K. D. A role for connexin43 during neurodevelopment. *Glia* **55**, 675–686 (2007).
275. Clasadonte, J., Scemes, E., Wang, Z., Boison, D. & Haydon, P. G. Connexin 43-Mediated Astroglial Metabolic Networks Contribute to the Regulation of the Sleep-Wake Cycle. *Neuron* **95**, 1365-1380.e5 (2017).
276. Dai, P., Nakagami, T., Tanaka, H., Hitomi, T. & Takamatsu, T. Cx43 mediates TGF-beta signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2264–73 (2007).
277. Butkevich, E. *et al.* Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**, 650–658 (2004).
278. Nicchia, G. P. *et al.* New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB J.* **19**, 1674–1676 (2005).
279. Aarli, J. A. *et al.* Biophysical properties and ionic signature of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone in situ. *J Neurosci* **26**, 2291–2302 (2004).
280. Muller, T., Moller, T., Neuhaus, J. & Kettenmann, H. Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Glia* **28**, 79–84 (1996).
281. Ghézali, G. *et al.* Neuronal Activity Drives Astroglial Connexin 30 in Perisynaptic Processes and Shapes Its Functions. *Cereb. Cortex* **30**, 753–766 (2020).
282. Rieger, A., Deitmer, J. W. & Lohr, C. Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* **55**, 352–359 (2007).
283. Thyssen, A. *et al.* Spatial and developmental heterogeneity of calcium signaling in olfactory ensheathing cells. *Glia* **61**, 327–337 (2013).
284. Zuo, Y. *et al.* Fluorescent proteins expressed in mouse transgenic lines mark subsets of glia, neurons, macrophages, and dendritic cells for vital examination. *J Neurosci* **24**, 10999–11009 (2004).
285. Au, W. W., Treloar, H. B. & Greer, C. A. Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* **446**, 68–80 (2002).
286. Zuo, Y. Fluorescent Proteins Expressed in Mouse Transgenic Lines Mark Subsets of Glia, Neurons, Macrophages, and Dendritic Cells for Vital Examination. *J. Neurosci.* **24**, 10999–11009 (2004).
287. Jie Zhang, *et al.* Expression of S100B during the innate immune of corneal epithelium against fungi invasion. *Int. J. Ophthalmol.* (2016) doi:10.18240/ijo.2016.02.02.
288. Doerflinger, N. H., Macklin, W. B. & Popko, B. Inducible site-specific recombination in myelinating cells. *Genesis* **35**, 63–72 (2003).
289. Liao, Y., Day, K. H., Damon, D. N. & Duling, B. R. Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9989–9994 (2001).
290. 007914 - B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<tm14(CAG-tdTomato)Hze>/J.
<https://www.jax.org/strain/007914>.

291. Pitulescu, M. E., Schmidt, I., Benedito, R. & Adams, R. H. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat. Protoc.* **5**, 1518–1534 (2010).
292. Blanco-Hernández, E., Valle-Leija, P., Zomosa-Signoret, V., Drucker-Colín, R. & Vidaltamayo, R. Odor Memory Stability after Reinnervation of the Olfactory Bulb. *PLoS One* **7**, (2012).
293. Genter MB, Owens DM, Carlone HB, C. K. Characterization of olfactory deficits in the rat following administration of 2,6-dichlorobenzonitrile (dichlobenil), 3,3'-iminodipropionitrile, or methimazole. *Fundam Appl Toxicol.* (1996).
294. Xu, W. & Slotnick, B. Olfaction and peripheral olfactory connections in methimazole-treated rats. *Behav. Brain Res.* **102**, 41–50 (1999).
295. Cheung, M. C., Jang, W., Schwob, J. E. & Wachowiak, M. Functional recovery of odor representations in regenerated sensory inputs to the olfactory bulb. *Front. Neural Circuits* (2014) doi:10.3389/fncir.2013.00207.
296. Genter, M. B., Owens, D. M., Carlone, H. B. & Crofton, K. M. Characterization of olfactory deficits in the rat following administration of 2,6-dichlorobenzonitrile (dichlobenil), 3,3'-iminodipropionitrile, or methimazole. *Fundam. Appl. Toxicol.* **29**, 71–77 (1996).
297. Bergström, U., Giovanetti, A., Piras, E. & Brittebo, E. B. Methimazole-Induced Damage in the Olfactory Mucosa: Effects on Ultrastructure and Glutathione Levels. *Toxicol. Pathol.* **31**, 379–387 (2003).
298. Xie, F. *et al.* The tissue-specific toxicity of methimazole in the mouse olfactory mucosa is partly mediated through target-tissue metabolic activation by CYP2A5. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 947–951 (2011).
299. Sakamoto, T., Kondo, K., Kashio, A., Suzukawa, K. & Yamasoba, T. Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs via apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *J. Neurosci. Res.* **85**, 548–557 (2007).
300. Nazareth, L. *et al.* Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system. *J. Comp. Neurol.* **523**, (2015).
301. Au WW, Treloar HB, G. C. Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol.* (2002).
302. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–5 (2012).
303. Zack, G. W., Rogers, W. E. & Latt, S. A. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 741–753 (1977).
304. Lemasson, M., Delbé, C., Gheusi, G., Vincent, J. D. & Lledo, P. M. Use of ultrasonic vocalizations to assess olfactory detection in mouse pups treated with 3-methylindole. *Behav. Processes* **68**, 13–23 (2005).
305. Galliano, E., Hahn, C., Browne, L., Villamayor, P. R. & Grubb, M. S. Brief sensory deprivation triggers cell type-specific structural and functional plasticity in olfactory bulb neurons. *bioRxiv* **41**, 2135–2151 (2020).
306. Pinheiro Jose, Bates Douglas, DebRoy Saikat, S. D. and R. C. T. {nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. (2021).
307. Wang, Y. Z. *et al.* Activation of the Wnt/ β -catenin signaling reporter in developing mouse olfactory nerve layer marks a specialized subgroup of olfactory ensheathing cells. *Dev. Dyn.* **237**, 3157–3168 (2008).
308. Nakamura, K., Hioki, H., Fujiyama, F. & Kaneko, T. Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGluT)1 and VGluT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.* **492**, 263–288 (2005).

309. Åberg, N. D., Rönnbäck, L. & Eriksson, P. S. Connexin43 mRNA and protein expression during postnatal development of defined brain regions. *Dev. Brain Res.* **115**, 97–101 (1999).
310. Liu, Z. *et al.* Astrocytes induce proliferation of oligodendrocyte progenitor cells via connexin 47-mediated activation of the ERK/Id4 pathway. *Cell Cycle* **16**, 714–722 (2017).
311. Al Aïn, S., Mingioni, M., Patris, B. & Schaal, B. The response of newly born mice to odors of murine colostrum and milk: Unconditionally attractive, conditionally discriminated. *Dev. Psychobiol.* **56**, 1365–1376 (2014).
312. Gelhaye, M. *et al.* Mother-pup interactions during a short olfactory deprivation period in young rats. *Dev. Psychobiol.* **53**, 303–316 (2011).
313. Logan, D. W. *et al.* Learned recognition of maternal signature odors mediates the first suckling episode in mice. *Curr. Biol.* **22**, 1998–2007 (2012).
314. Bollen, B. *et al.* Olfactory classical conditioning in neonatal mouse pups using thermal stimuli. *Behav. Brain Res.* **229**, 250–256 (2012).
315. Noirot, E. Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Dev. Psychobiol.* **5**, 371–387 (1972).
316. Hofer, M. A. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* **21**, 203–217 (1996).
317. Smotherman, W. P., Bell, R. W., Starzec, J., Elias, J. & Zachman, T. A. Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. *Behav. Biol.* **12**, 55–66 (1974).
318. Shair, H. N. Parental potentiation of vocalization as a marker for filial bonds in infant animals. *Dev. Psychobiol.* **56**, 1689–1697 (2014).
319. Hallman, B. L. & Hurst, J. W. Loss of taste as toxic effect of methimazole (tapazole) therapy: Report of three cases. *J. Am. Med. Assoc.* **152**, 322 (1953).
320. Suzukawa, K. *et al.* Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage. *J. Comp. Neurol.* **519**, 2154–2174 (2011).
321. Bergman, U., Ostergren, A., Gustafson, A. L. & Brittebo, B. Differential effects of olfactory toxicants on olfactory regeneration. *Arch Toxicol* **76**, 104–112 (2002).
322. Kikuta, S. *et al.* Sensory Deprivation Disrupts Homeostatic Regeneration of Newly Generated Olfactory Sensory Neurons after Injury in Adult Mice. *J. Neurosci.* **35**, 2657–2673 (2015).
323. Strotmann, J. & Breer, H. Formation of glomerular maps in the olfactory system. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 402–410 (2006).
324. Miragall, F., Kadmon, G., Husmann, M. & Schachner, M. Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: Presence of the embryonic form of N-CAM. *Dev. Biol.* **129**, 516–531 (1988).
325. Manthey, D. *et al.* Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels. *J. Membr. Biol.* **181**, 137–148 (2001).
326. González, D., Gómez-Hernández, J. M. & Barrio, L. C. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: An integrative appraisal. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* vol. 94 66–106 (2007).
327. Van Veen, T. A. B., Van Rijen, H. V. M. & Jongsma, H. J. Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* **46**, 496–510 (2000).
328. Liu, J. *et al.* Phosphorylation of connexin 50 by protein kinase A enhances gap junction and hemichannel function. *J. Biol. Chem.* **286**, 16914–16928 (2011).
329. Alstrøm, J. S., Hansen, D. B., Nielsen, M. S. & MacAulay, N. Isoform-specific

- phosphorylation-dependent regulation of connexin hemichannels. *J. Neurophysiol.* **114**, 3014–3022 (2015).
330. Hossain, M. Z., Sawchuk, M. A., Murphy, L. J., Hertzberg, E. L. & Nagy, J. I. Kainic acid induced alterations in antibody recognition of connexin43 and loss of astrocytic gap junctions in rat brain. *Glia* **10**, 250–265 (1994).
331. Ochalski, P. A. Y., Sawchuk, M. A., Hertzberg, E. L. & Nagy, J. I. Astrocytic gap junction removal, connexin43 redistribution, and epitope masking at excitatory amino acid lesion sites in rat brain. *Glia* **14**, 279–294 (1995).
332. ThermoFisher Scientific. Rabbit anti-Cx43 Zymed 71-0700. <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Connexin-43-Antibody-Polyclonal/71-0700>.
333. CiteAb. Mouse anti-Cx43 IgG1 Millipore MAB3068. <https://www.citeab.com/antibodies/227101-mab3068-anti-connexin-43-antibody-ct>.
334. Bedner, P. *et al.* Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **281**, 6673–6681 (2006).
335. Zhao, Y. *et al.* Oligodendroglial connexin 47 regulates neuroinflammation upon autoimmune demyelination in a novel mouse model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 2160–2169 (2020).
336. Hegedus, B. *et al.* Neurofibromatosis-1 Regulates Neuronal and Glial Cell Differentiation from Neuroglial Progenitors In Vivo by Both cAMP- and Ras-Dependent Mechanisms. *Cell Stem Cell* **1**, 443–457 (2007).
337. Tanaka, M. *et al.* Lack of connexin43-mediated Bergmann glial gap junctional coupling does not affect cerebellar long-term depression, motor coordination, or eyeblink conditioning. *Front. Behav. Neurosci.* **2**, (2008).
338. Prakapenka, A. V. *et al.* Intranasal 17 β -Estradiol Modulates Spatial Learning and Memory in a Rat Model of Surgical Menopause. *Pharmaceutics* **12**, 1–22 (2020).
339. Desplantez, T., Verma, V., Leybaert, L., Evans, W. H. & Weingart, R. Gap26, a connexin mimetic peptide, inhibits currents carried by connexin43 hemichannels and gap junction channels. *Pharmacol. Res.* **65**, 546–552 (2012).
340. Turk, M. A. M., Henk, W. G. & Flory, W. 3-Methylindole-Induced Nasal Mucosal Damage in Mice. *Vet. Pathol.* **24**, 400–403 (1987).
341. Peele, D. B. *et al.* Functional deficits produced by 3-methylindole-induced olfactory mucosal damage revealed by a simple olfactory learning task. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**, 191–202 (1991).
342. Kass, M. D., Pottackal, J., Turkel, D. J. & McGann, J. P. Changes in the neural representation of odorants after olfactory deprivation in the adult mouse olfactory bulb. *Chem. Senses* **38**, 77–89 (2013).
343. Bastien-Dionne, P. O., David, L. S., Parent, A. & Saghatelian, A. Role of sensory activity on chemospecific populations of interneurons in the adult olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* **518**, 1847–1861 (2010).
344. Coppola, D. M. Studies of olfactory system neural plasticity: The contribution of the unilateral naris occlusion technique. *Neural Plast.* **2012**, (2012).
345. Tyler, W. J., Petzold, G. C., Pal, S. K. & Murthy, V. N. Experience-dependent modification of primary sensory synapses in the mammalian olfactory bulb. *J. Neurosci.* **27**, 9427–9438 (2007).
346. Guthrie, K. M., Wilson, D. A. & Leon, M. Early unilateral deprivation modifies olfactory bulb function. *J. Neurosci.* **10**, 3402–3412 (1990).
347. Guthrie, K. M., Pullara, J. M., Marshall, J. F. & Leon, M. Olfactory deprivation increases dopamine D2 receptor density in the rat olfactory bulb. *Synapse* **8**, 61–70 (1991).

VII. ABREVIATURAS

ACSF: líquido ceforraquídeo artificial	mg/kg: concentración en miligramos por kilogramo
AOB: bulbo olfatorio accesorio	mg/ml: concentración en miligramos por mililitro
BLBP: <i>Brain lipid binding protein</i>	mm: milímetros
Cx: conexina	mM: concentración milimolar
Cx43 cKO: ratón <i>knock-out</i> condicional de la conexina 43	MMZ: metimazol
Cx43 Ctrl: ratón de fenotipo <i>wild-type</i> para delección condicional de la conexina 43	MOB: bulbo olfatorio principal
Cx43 ^{lox} : alelo mutante de Cx43 que contiene el exón 2 flanqueado por secuencias <i>loxP</i>	MOE: epitelio olfatorio principal
Da: Daltons, unidad de tamaño molecular	mOsm: miliosmolar
DE: desvío estándar	ms: milisegundo
DIC: contraste por interferencia diferencial	mV: milivolt
dNTPs: desoxirribonucleótidos	MΩ: megaohm
EE: Error estándar	nm: nanometro
ERT: receptor de estrógeno humano mutado	nS: nanosiemens
E15: edad embrionaria 15	P: línea parental de ratones
F1: generación filial F1	P0: edad posnatal 0
F2: generación filial F2	Pb: pares de bases
G: conductancia total	PBS: buffer fosfato salino
GFAP: <i>Glial fibrillary acidic protein</i>	PBST: PBS con triton-X100
GFP: <i>green fluorescent protein</i> , proteína fluorescente verde	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
GPRCs: receptores acoplados a proteínas G	PFA: paraformaldehído
I: corriente eléctrica	PLP: proteína proteolípídica
I/V: curva corriente versus voltaje	PM: peso molecular
I ₀ : corriente de membrana nula	p75NTR: receptor de baja afinidad por neurotrofinas p75
kHz: kilohertz	Ra: resistencia de acceso
LY: <i>Lucifer Yellow</i>	Ri: <i>input resistance</i>
M: concentración molar	Ta: temperatura de hibridación - <i>annealing</i>
MFA: ácido meclofenámico	tdTom: expresión de fluorescencia guiada por la proteína tdTomato
	TH: tirosina hidroxilasa
	Tx: Tamoxifeno
	U.A: unidades arbitrarias

UI/ml: concentración en unidades internacionales por mililitro

V: voltaje

VGlut2: Transportador vesicular de glutamato 2

VIM: vimentina

VNO: órgano vomeronasal

Vr: potencial de reposo de la célula

WT: *wild-type*, alelo o cepa de ratones salvaje

µg/ml: concentración en microgramo por mililitro

µl: microlitro

µm: micrometro

µM: concentración en micromolar

%m/v: concentración en porcentaje gramos de soluto por cada 100 mililitros de solución

%v/v: concentración en porcentaje mililitros de soluto por cada 100 mililitros de solución

VIII. ANEXO

Macro creado para el análisis de los registros de vocalizaciones ultrasónicas de ratones de edad neonatal para su uso en el programa de análisis de imágenes ImageJ.

Por Carlos Pretell-Annan.

MacroVU_neonatos.ijm

//Este macro sirve para el análisis del perfil de intensidad en los registros de vocalizaciones ultrasónicas (VUS).

//Crea ROIs rectangulares sobre el registro -abarcando toda su duración- a diferentes frecuencias. Luego promedia los valores de intensidad para todos los valores de "y" (frecuencia) contenidos dentro del ROI para cada valor de "x" (tiempo).

//Los resultados son guardados en la misma carpeta de origen de la imagen analizada, dentro de una subcarpeta creada por el mismo macro y denominada "VUS_Perfiles_intensidad".

//Cada archivo se guarda en formato ".txt" con el mismo nombre de la imagen seguido por "_perfiles".

//Aclaración sobre los ROIs:

// Los ROIs creados por el macro son los siguientes:

// 100 kHz (95-105 kHz)

// 90 kHz (85-95 kHz)

// 80 kHz (75-85 kHz)

// 70 kHz (65-75 kHz)

// 60 kHz (55-65 kHz)

// 50 kHz (45-55 kHz)

macro "macroVUS" {

open();

inputFolder=getDirectory("Image");

images=getFileList(inputFolder);

NewDir=inputFolder+"VUS_Perfiles_intensidad";

File.makeDirectory(NewDir);

// setBatchMode(true);

for (i=0; i<images.length; i++){

inputPath=inputFolder+images[i];

open(inputPath);

title=getTitle;

```
makeRectangle(178, 274, 2809, 100);//ROI 100 kHz (95-105 kHz)
roiManager("Add");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "100 kHz");
makeRectangle(178, 374, 2809, 100);//ROI 90 kHz (85-95 kHz)
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "90 kHz");
makeRectangle(178, 474, 2809, 100);//ROI 80 kHz (75-85 kHz)
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "80 kHz");
makeRectangle(178, 574, 2809, 100);//ROI 70 kHz (65-75 kHz)
roiManager("Add");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Rename", "70 kHz");
makeRectangle(178, 674, 2809, 100);//ROI 60 kHz (55-65 kHz)
roiManager("Add");
roiManager("Select", 4);
roiManager("Rename", "60 kHz");
makeRectangle(178, 774, 2809, 100);//ROI 50 kHz (45-55 kHz)
roiManager("Add");
roiManager("Select", 5);
roiManager("Rename", "50 kHz");

//roiManager("Select", newArray(0,1,2,3,4,5,6));
counts=roiManager("count");
for (r=0; r<counts; r++){
    roiManager("select",r);
    ROI=getInfo("roi.name");
    selectWindow(title);
    run("Plot Profile");
    Plot.getValues(x, y);
    //run("Clear Results");
    close();
    for (j=0; j<x.length; j++){
        setResult(ROI, j, y[j]);
        //updateResults();
    }
}
```

```
    }

    updateResults();
    //waitForUser;
}

roiManager("delete");
selectWindow("Results");
saveAs("text", NewDir+"/"+title+"_perfiles");
close();
list=getList("window.titles");
for (p=0; p<list.length; p++){
windname=list[p];
selectWindow(windname);
run("Close");
//waitForUser;
}
}
```