

¿Cómo se conecta la olfacción? Mecanismos celulares y moleculares que dirigen el desarrollo de las conexiones sinápticas desde la nariz a la corteza (II)

Diego García-González, Fernando de Castro

Grupo de Neurobiología del Desarrollo (GNDe). Hospital Nacional de Parapléjicos. Toledo, España.

Correspondencia:

Dr. Fernando de Castro Soubriet. Grupo de Neurobiología del Desarrollo (GNDe). Unidad de Neurología Experimental. Hospital Nacional de Parapléjicos. Finca La Peraleda, s/n. E-45071 Toledo.

E-mail:

fdec@sescam.jccm.es

Financiación:

Trabajo financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-MICINN (SAF2005-28387E, SAF2007-65845), parcialmente con FEDER, la Consejería de Sanidad (ICS06024-00) de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y FISCAM (PI2007-66, GCS2006-C24 y G-2008-C8). D.G.G. está contratado por PI2007-66, y F.D.C., por SESCAM.

Aceptado tras revisión externa: 15.09.10.

Cómo citar este artículo:

García-González D, De Castro F. ¿Cómo se conecta la olfacción? Mecanismos celulares y moleculares que dirigen el desarrollo de las conexiones sinápticas desde la nariz a la corteza (II). Rev Neurol 2011; 52: 548-54.

© 2011 Revista de Neurología

Resumen. Como iniciamos en la primera parte de esta revisión, el desarrollo del sistema olfativo presenta una serie de peculiaridades fascinantes, lo que lo convierte en uno de los modelos más estudiados para entender los mecanismos del desarrollo del sistema nervioso. Si en la primera parte revisamos los diferentes mecanismos por contacto (lamininas, moléculas de adhesión celular, efrinas, etc.) y secretables (semaforinas, slits, factores de crecimiento, etc.) que intervienen en la formación de las conexiones sinápticas entre el epitelio olfativo, el bulbo olfativo y la corteza olfativa, en esta segunda parte revisaremos los mecanismos moleculares responsables de las conexiones intracorticales del sistema olfativo principal, así como la limitada información disponible acerca del sistema olfativo accesorio. También revisaremos los mecanismos implicados en la migración de los precursores de interneuronas desde la zona subventricular del cerebro anterior hasta el bulbo olfativo, otro de los eventos fundamentales en el desarrollo de este sistema.

Palabras clave. Anosmina-1. Corteza olfativa. Moléculas de adhesión celular. Netrin. Quimiotropismo. Semaforinas. Slit.

Un relativo agujero negro: las bases moleculares del desarrollo de conexiones intracorticales en el sistema olfativo

Como ya se indicó brevemente en la primera parte de esta revisión [1], las neuronas de la corteza olfativa establecen un elaborado patrón de conexiones sinápticas, tanto dentro de la propia corteza olfativa como con otras estructuras telencefálicas, incluido el bulbo olfativo (BO). Esta compleja conectividad dificulta llevar a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* que puedan ayudarnos a discriminar las bases moleculares del desarrollo de las proyecciones eferentes desde la corteza olfativa. En consecuencia, únicamente un número limitado de estudios se ha dedicado, bien parcial o completamente, a este respecto, aunque la mayoría se ha realizado *in vivo* (véase más adelante). La función de las rutas gliales preformadas en la guía de axones se creyó durante décadas que desarrollaba las grandes comisuras cerebrales, aunque los detalles acerca de los mecanismos implicados han sido definidos recientemente. La proyección más estudiada dentro de la corteza olfativa es la comisura anterior, una de las principales comisuras cerebrales. La comisura anterior se divide en dos partes: la parte anterior, que conecta estructuras ol-

fativas, y la comisura posterior anterior, mientras que la parte posterior principalmente conecta elementos del lóbulo temporal. Ambas partes de la comisura anterior sólo convergen al cruzar la línea media [2]. Los axones que conforman la comisura anterior cruzan la línea media en íntima asociación con la capa endimaria del tercer ventrículo, lo cual sugiere que diversas moléculas expresadas o secretadas por este nicho germinal podrían influir en la guía de estos axones. En relación con los mecanismos intracelulares, COUP-TFI presenta un interés particular, ya que, neutralizando la expresión de este factor de transcripción (un miembro huérfano de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas/tiroideas), se producen numerosos defectos en la guía axonal en el cerebro anterior. Efectivamente, se ha visto que existe un incremento significativo en el número de axones de la comisura anterior que cruza la línea media debido a una incorrecta señalización de las proyecciones septohipocampales, las cuales sufren, a su vez, un posterior desplazamiento hacia la comisura hipocampal, a pesar de que el componente olfativo de la comisura anterior no parezca verse afectado [3]. La proteína de interacción JNK (JSAP1) es una proteína de andamiaje para rutas de señalización de proteincinasas

(MAPK) mitogenactivadas, así como una proteína de unión para el transporte de moléculas a lo largo de axones. Se ha visto que los ratones *JSAP1*^{-/-} muestran alteraciones considerables en el desarrollo de la comisura anterior y otras comisuras telencefálicas, y el ratón transgénico *JIP1* reduce parcialmente estos defectos en la guía axonal [4]. La existencia de diferencias drásticas entre animales heterocigotos (*GAP-43*^{+/-}) y mutantes *knock-out* para *GAP-43* (*GAP-43*^{-/-}) sugiere que un umbral funcional de GAP-43 es necesario para la formación de las comisuras cerebrales (incluida la comisura anterior). Así, el fallo en la regulación de F-actina en los conos de crecimiento comisurales podría estar relacionado con un PKC inhibido en la fosforilación de GAP-43 [5].

Mecanismos mediados por contacto involucrados en el desarrollo de conexiones intracorticales

Diversos estudios relacionados con mecanismos mediados por contacto muestran que la pérdida de *EphA4* produce un significativo desplazamiento ventral y lateral de la parte anterior de la comisura anterior [2], agravando los defectos previamente descritos en este tracto cortical. Defectos que, en la parte posterior de esta comisura, también se dan en esta cepa mutante [2]. Además, la falta de *EphA4* provoca la mezcla de axones provenientes de la parte anterior y posterior de la comisura anterior, demostrando así que los axones olfativos de la parte anterior son más sensibles a la repulsión mediada por *EphB2* que otras propias de esta comisura [2]. No obstante, los axones que proyectan incorrectamente en el doble *knock-out* *EphB2/A4* no alcanzan más del 50% del total de axones de la parte anterior de la comisura anterior. Este hecho sugiere que el sistema efrinas/Eph no es el único responsable de la formación de esta estructura, y que, al menos, debe haber un papel combinado con la Sema3B secretada [2]. Previamente, se había visto que otros receptores de proteínas tirosincinasas (RTK, de los cuales la mayor familia es la relacionada con el receptor Eph) no son relevantes para la formación de la parte anterior de la comisura anterior, a pesar de su implicación en la formación de otras comisuras en el cerebro, como Nuk y Sek4.

La expresión de PSA-NCAM en distintos componentes de la corteza olfativa generó especulaciones acerca de su posible función en la formación de las conexiones intracorticales olfativas [6]. La ablación genética de otra molécula de adhesión, NrCAM, induce la desfasciculación y un desplazamiento ventral y lateral aberrante de los axones de la comisura anterior, pero la pérdida de esta molécula no

conduce a una reducción drástica de dicha comisura [7], hecho que podría sugerir un papel secundario de esta inmunoglobulina en la señalización de sema/neuropilina (véase más adelante). Otros efectos drásticos han sido observados en ratones mutantes en los que la expresión de la proteína Celsr3 se elimina selectivamente (un miembro de la familia de las cadherinas implicado en adhesión celular vía interacciones homofílicas). Así, los ratones *Celsr3*^{-/-}, *Celsr3/Foxg1* y *Celsr3/Emx1* carecen de comisura anterior [8], apareciendo sólo diminutos haces de axones que crecen desde los núcleos olfativos anteriores sin conseguir cruzar la línea media. Así, las células *guidepost* que expresan Celsr3 en los axones en crecimiento *Celsr3*⁺ atraviesan la línea media y forman la parte anterior de la comisura anterior [9].

En el ratón *knock-out* de Netrina-1, o en el respectivo de su receptor DCC, se produce una ausencia total o al menos una gran reducción de la comisura anterior [9]. Este efecto es todavía mayor cuando la expresión de la proteína multidominio GEF, Trío, intermediaria entre Netrina-1 y Rac-1, se encuentra totalmente anulada [10]. Por lo tanto, ya que los ratones *Trío*^{+/-} desarrollan una comisura anterior desfasciculada con un fenotipo intermedio en comparación con los mutantes *Trío*^{-/-}, Trío aparece implicada tanto en el crecimiento como en la navegación axonal inducida por Netrina-1 [10].

Los axones de la parte anterior de la comisura anterior también responden a las semaforinas de clase III secretadas y a sus receptores, las neuropilinas y las plexinas. Aunque esta comisura se desarrolla con normalidad en ratones *Sema3A*^{-/-} [11], su parte anterior se encuentra alterada en todos los ratones mutantes *Neuropilina-2*^{-/-}, *Plexina-A4*^{-/-}, *Sema3B*^{-/-} y *Sema3F*^{-/-} [6,7,9,10]. De un modo más específico, la parte anterior de la comisura anterior se halla desfasciculada y desplazada ventralmente en todos estos mutantes, viéndose reducido su número de axones en todos los casos mencionados, con la excepción de los ratones mutantes *Sema3B*^{-/-} y *Plexina-A4*^{-/-}, en los que se produce una ausencia total de axones decusados. Como ya ha sido propuesto para otras estructuras, en el sistema nervioso central de mamíferos existe una asociación de NrCAM con la Neuropilina-2 en los axones olfativos de la parte anterior de la comisura anterior, que es necesaria para las respuestas quimiotrópicas inducidas por Sema3B y Sema3F, aunque estas semaforinas nunca se unen directamente a NrCAM, sino a su receptor canónico, la Neuropilina-2. Además, el NrCAM soluble no antagoniza con la unión de semaforina a Neuropilina-2 o a su combinación con Plexina-A [7]. Igualmente, cabe decir que la atrac-

ción de los axones de la parte anterior de la comisura anterior por la Sema3B es especialmente relevante, ya que la mutación en un alelo produce un fenotipo tan acusado como en el mutante heterocigoto para este receptor, *Neuropilina^{+/-}* [7]. A partir de este escenario, en la parte anterior de la comisura anterior del desarrollo del sistema olfativo se puede concluir que:

- Las semaforinas secretadas de clase III estudiadas hasta la fecha (Sema3A, Sema3B y Sema3F) no son redundantes, sino que desempeñan diversos papeles que no se compensan y reflejan sus correspondientes propiedades funcionales distintas.
- Tanto la Neuropilina-2 como la Plexina-4, pero no la Neuropilina-1, son los receptores funcionales para las semaforinas secretadas en los axones de la parte anterior de la comisura anterior y pueden formar complejos receptores para la Sema3.
- Las coordenadas espaciales del tracto olfativo cortical son determinadas, probablemente, por la cantidad de interacciones ligando/receptor.

De un modo interesante, estos mecanismos reflejan un cierto grado de conservación entre diferentes sistemas de proyección del sistema nervioso central: las Sema3B y Sema3F controlan la guía de axones de la comisura a la línea media de la médula espinal, donde NrCAM también desempeña una función crítica en el cruce de decisiones [12,13].

En el caso de las funciones de las proteínas slits y sus receptores robo en la formación del tracto olfativo lateral (TOL) (véase más arriba), algunos axones desde el BO son mal dirigidos en el doble *knock-out Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}*, cruzando al hemisferio contralateral y, tal vez, engrosando la comisura anterior [14]. Estos efectos no se han observado en los animales *Slit1^{+/-};Slit2^{-/-}* o en los correspondientes mutantes sencillos [14,15]. La función exacta de las proteínas slits en la formación de las comisuras del cerebro anterior (incluida la comisura anterior) todavía no ha sido dilucidada y, basándose en resultados obtenidos en el pez cebra, las slits desempeñarían un papel que podría ser regulado por la señalización de Hh [16].

En el contexto en que se dan graves defectos en la mayoría de los tractos de fibras del cerebro, la mutación nula del gen *Frizzled-3* produce la ausencia completa de la comisura anterior [17]. Sin embargo, este fenotipo causa problemas tan drásticos que la función de la señalización Wnt/Frizzled en la formación de las conexiones olfativas intracorticales debe seguir siendo estudiada.

Estos descubrimientos se han visto reforzados recientemente por el interesante hallazgo de que las

mismas moléculas quimiotrópicas relevantes para el desarrollo de las comisuras del cerebro anterior en roedores también se han descrito en humanos [18].

Mecanismos celulares y moleculares que conectan el sistema olfativo accesorio

En la mayoría de vertebrados, el sistema olfativo accesorio es el segundo sistema quimiosensorial, anatómicamente distinto, implicado en la percepción olfativa. Además, en paralelo con el sistema olfativo principal, el sistema olfativo accesorio detecta feromonas [19,20]. Así, con el fin de completar esta revisión, resumiremos los pocos estudios dedicados al respecto en el sistema olfativo accesorio.

En relación con las moléculas de superficie implicadas en la formación de este sistema, se ha sugerido que distintos carbohidratos, como las lectinas, podrían estar involucradas en la dirección de las neuronas sensitivas olfativas (NSO) hacia el bulbo olfativo accesorio (BOA) [21]. La reelina se expresa en diversas estructuras del sistema olfativo, incluidas las células perineurales cercanas al nervio vomeronasal, el órgano vomeronasal y en el BOA. No obstante, los nervios vomeronasales son absolutamente normales en el mutante defectivo de reelina, lo cual sugiere que esta proteína no proporciona una señal de guía para los axones vomeronasales [21], como ocurre en el nervio olfativo (véase más arriba). Al igual que en el caso del sistema olfativo principal, se cree que la PSA-NCAM es responsable de la formación de la conectividad entre los diferentes componentes del sistema olfativo accesorio [6].

Un estudio detallado del papel de las moléculas secretadas en la formación de esta proyección indicó que la Sema3F cumple una función menor en la direccionalidad de los axones de las neuronas vomeronasales apicales hacia su sitio específico en el BOA [22], confirmando así datos previos a lo largo de estas líneas [22,23]. Finalmente, aunque se ha demostrado que Slit-1 repele los axones vomeronasales *in vitro*, las condiciones *in vivo* muestran que, a pesar de ser prescindible para la guía y fasciculación de los axones de las neuronas vomeronasales, esta proteína resulta crítica para la correcta direccionalidad de sus aferencias hacia el BOA posterior [23].

Conclusiones y resumen

En este trabajo, hemos presentado el escenario completo de los mecanismos moleculares implicados en la formación de diferentes conexiones dentro del

sistema olfativo durante el desarrollo, incluyendo el nervio olfativo, el TOL y las conexiones intracorticales, así como un breve resumen de los mecanismos estudiados en el nervio vomeronasal. Por tanto, podemos concluir que las expectativas creadas por los mecanismos que hemos considerado como 'especiales' (los receptores olfativos para el nervio olfativo y las células $lot1^+$ para el TOL) han menudado a medida que se han producido avances en el campo. En relación con las señales implicadas en el crecimiento y la guía de distintas poblaciones del sistema olfativo, el escenario refleja lo que ya se describió en otras zonas del sistema nervioso central, incluida la cooperación entre señales tanto atrayentes como repelentes, así como la existencia de una cierta jerarquía entre dichas señales. Tanto en el caso de la neurogénesis de células mitrales del BO como del inicio de la formación del TOL, en lo alto de esta escala jerárquica se encontraría la función crucial de *Tbr-1* [24]. En referencia a la cooperación descrita entre diferentes señales, en el sistema olfativo se ha demostrado la interacción de moléculas secretadas con componentes no difusibles de la matriz extracelular, dando lugar así a implicaciones funcionales importantes para el establecimiento de correctas conexiones sinápticas durante el desarrollo [25]. Pero el sistema olfativo muestra, al menos, dos singularidades relacionadas con la orquestación de las rutas de los axones:

- Las señales que no parecen tener utilidad para la guía de axones de células mitrales del BO o de proyecciones intracorticales parecen relevantes para el crecimiento de axones de NSO y/o viceversa (p. ej., *Sema 3A*, *Netrina-1*) (véase la tabla de [1]).
- La débil heterogeneidad del TOL cuando se compara con el nervio olfativo es, probablemente, la causa de que los mecanismos mediados por contacto contribuyan menos a la formación del TOL que a la del nervio olfativo [26,27].

Todos estos hechos reflejarían la particularidad de las primeras sinapsis del sistema. Estas neuronas excepcionales, las NSO, en contacto físico con el medio exterior (tanto agua como aire) mueren y son reemplazadas por contingentes de neuronas recién generadas que, en su momento justo, serán capaces de llevar a cabo un rápido crecimiento axonal para establecer conexiones sinápticas correctas con sus glomérulos correspondientes en el interior del BO.

Con una vida media de, aproximadamente, 90 días, las NSO generadas a partir de células madre del epitelio olfativo representan un ejemplo ideal de neurogénesis conservada de mamíferos adultos, pre-

sentando un comportamiento que no difiere cuantitativamente de lo que sucede durante el desarrollo embrionario y posnatal temprano [28]. En este fascinante escenario para los neurobiólogos del desarrollo modernos, se ha sugerido que las señales que guían los axones de NSO para formar sinapsis dentro del BO son, en grandes rasgos, preservadas a lo largo de la vida del animal [26], y las evidencias experimentales apuntan, cada vez con más fuerza, a que los axones de las NSO proyectan al BO sin la influencia directa de señales producidas por éste, cuyos efectos se concentran en un proceso final y local de refinamiento [28-30]. Esto es totalmente diferente de lo que ha sido observado, por ejemplo, en el sistema visual, en el que los axones de la retina requieren gradientes moleculares producidos por su diana con el fin de formar un mapa de proyecciones. Todas estas propiedades de las NSO explicarían tanto su rápida reposición como el desarrollo de su conectividad exacta en un sistema maduro, el cual permanece funcionando de un modo constante sin cambios significativos en la percepción olfativa. Sin embargo, aunque a menudo la olfacción se considera como un lujo para los humanos (especie en la que parece únicamente clave para adquirir sus preferencias alimenticias y para influir en otros aspectos de su complejo comportamiento), la detección de agentes químicos en el medio ambiente se convierte, de un modo general, en un proceso crítico para la supervivencia desde las bacterias a los mamíferos [31,32].

Cabe destacar que la neurogénesis mantenida en el epitelio olfativo adulto no es la única existente en el sistema olfativo, ya que los precursores de interneuronas se generan continuamente en la zona subventricular, el nicho neurogénico telencefálico, desde el desarrollo embrionario hasta el adulto, formando así la corriente migratoria rostral entre dicho nicho y el destino final de estas células, el BO, donde se integrarán [33-35]. Esto quiere decir tanto que las neuronas generadas siguen integrándose continuamente en el BO maduro como que cada nueva NSO debe conectarse con su glomérulo diana siguiendo el preciso patrón conocido, mientras que las interneuronas recién llegadas al BO han de desarrollar nuevas conexiones, y viceversa [36]. Es complicado encontrar otra estructura en el sistema nervioso central en la que se dé tal grado de plasticidad fisiológica. El único límite a este *perpetuum mobile* olfativo parece ser el hecho de que la secuencia de maduración fisiológica de las sinapsis de las NSO hacia los glomérulos del BO es casi idéntica durante el desarrollo posnatal y adulto [37]. Por el contrario, la maduración fisiológica de las inter-

neuronas del BO sí que difiere en el desarrollo postnatal respecto a la situación en el adulto [38].

En este sentido, se ha concluido que, mientras que las interneuronas recién llegadas pueden aportar distintos mensajes al integrarse y madurar en el BO, las NSO aseguran *inputs* fiables al BO, independientemente de los momentos en el que sean generadas y sus terminales hagan sinapsis con sus objetivos [37]. Por el contrario, es necesario un equilibrio entre la muerte de interneuronas en el BO y la llegada de interneuronas recién generadas para asegurar una función olfativa óptima [39]. Resulta intrigante que ambos tipos de neurogénesis mantenida en el adulto respondan a distintos controles: mientras que la exposición a olores y experiencias sensoriales regula la neurogénesis en la ZSV/CMR y la supervivencia y maduración de esas interneuronas recién generadas [39-41], parece que la neurogénesis en el epitelio olfativo es controlada localmente por el equilibrio de un miembro de la familia transformadora de factor β de crecimiento, y la diferenciación del factor 11 y su antagonista, la folistatina.

Todas estas particularidades de las NSO reflejarían la relevancia evolutiva del sentido del olfato en el desarrollo del sistema nervioso central. El olfato es el sentido más primitivo y la mayoría, si no en su totalidad, del cerebro se dedica a ello en los estadios filogenéticos tempranos de vertebrados, prevalencia que decrece con la aparición del neocórtex y otras funciones sensoriales en la filogenia. Su condición de neuronas 'primitivas' hace que las NSO, con sus excepcionales capacidades biológicas, sean capaces de:

- Morir y ser repuestas activamente durante toda la vida.
- Que sus axones proyecten directamente a una primera estación telencefálica, el BO, en lugar de usar el tálamo como lugar del primer relevo.
- Que sus axones no mielinizados sean protruidos por un tipo muy especial de glía, generada, como estas neuronas, en la placoda olfativa (la glía envolvente olfativa).

La importancia del mesénquima facial en el desarrollo de la placoda olfativa y sus estructuras derivadas no debe olvidarse [42]. Las características particulares de las NSO, junto con la idea de que el BO representa un dominio independiente del desarrollo [28], apoyan la existencia de un protomapa para el desarrollo inicial del sistema olfativo, desde el cual tres componentes principales olfativos han de ser identificados: el epitelio, el bulbo y la corteza. Las diferencias en las orquestas moleculares subyacentes a la formación de los tractos que interconec-

tan las estructuras olfativas (véase arriba) podrían interpretarse como un apoyo a la teoría del protomapa (véase la introducción). Este protomapa es importante durante el desarrollo, aunque estudios recientes se han cuestionado si también es aplicable para el sistema olfativo maduro, donde ahora se cree que la llegada de nervios olfativos al BO es escasa (como las conexiones entre las neuronas de proyección desde el BO y sus dianas en la corteza olfativa), sin un mapa funcional [43,44].

Otro punto que merece una discusión detallada es la función de la actividad en la formación de conexiones sinápticas entre las diferentes estructuras del sistema olfativo. Hasta la fecha, la actividad de las neuronas se ha demostrado que desempeña un papel importante en la morfogénesis del nervio olfativo; concretamente, en el refinamiento final de sus conexiones dentro del BO [45-49], aunque también es relevante para desarrollo del TOL y de las conexiones intracorticales, así como para el sistema olfativo accesorio. La dependencia de la actividad de las proyecciones desde el epitelio olfativo al BO podría aportar una correlación funcional para el papel demostrado de la actividad olfativa en la supervivencia de los precursores de interneuronas que migran al BO [40]. Los efectos de la actividad sensorial en la plasticidad del sistema olfativo ya han sido discutidos antes en esta revisión.

A pesar de su origen y claras influencias en la formación del sistema olfativo principal (por ejemplo, la influencia de los axones del BOA en la organización del TOL), así como las recientes investigaciones acerca de los tipos de receptores vomeronasales y la organización de la corteza vomeronasal [50], la conclusión principal que podemos extraer de los estudios publicados hasta la fecha es que los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la conectividad del sistema olfativo accesorio se encuentran lejos de ser dilucidados.

Finalmente, quisiéramos subrayar la creciente importancia de las moléculas revisadas en el trabajo presente para la patología neurológica [51]. Su impacto general en patologías que afectan al sistema olfativo ha de ser dilucidado en detalle, con la excepción de la Anosmina-1 y los FGF, que claramente parecen desempeñar un papel clave en el síndrome de Kallmann [52]. Un ejemplo relacionado con ello sería un primer desbroce funcional a nivel celular que hemos realizado recientemente acerca de FGF2 y Anosmina-1, que desempeñan una acción conjunta en la formación inicial de esta vía de migración de los precursores neuronales durante el desarrollo perinatal (E14-E17-P5-P15) en la rata: mientras que el primero lleva a cabo un papel mo-

togénico, la segunda orienta su desplazamiento en el inicio de la corriente migratoria rostral [53].

Bibliografía

- García-González D, De Castro F. ¿Cómo se conecta la olfacción? Mecanismos celulares y moleculares que dirigen el desarrollo de las conexiones sinápticas desde la nariz a la corteza (I). *Rev Neurol* 2011; 52: 477-88.
- Ho SK, Kovacevic N, Henkelman RM, Boyd A, Pawson T, Henderson JT. EphB2 and EphA4 receptors regulate formation of the principal inter-hemispheric tracts of the mammalian forebrain. *Neuroscience* 2009; 160: 784-95.
- Armentano M, Filosa A, Andolfi G, Studer M. COUP-TFI is required for the formation of commissural projections in the forebrain by regulating axonal growth. *Development* 2006; 133: 4151-62.
- Ha HY, Cho IH, Lee KW, Lee KW, Song JY, Kim KS, et al. The axon guidance defect of the telencephalic commissures of the JSAP1-deficient brain was partially rescued by the transgenic expression of JIP1. *Dev Biol* 2005; 277: 184-99.
- Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF. Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci* 2002; 22: 239-47.
- Bonfanti L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* 2006; 80: 129-64.
- Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, et al. Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 2005; 48: 63-75.
- Tissir F, Bar I, Jossin Y, De Backer O, Goffinet AM. Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development. *Nat Neurosci* 2005; 8: 451-7.
- Zhou L, Bar I, Achouri Y, Campbell K, De Backer O, Hebert JM, et al. Early forebrain wiring: genetic dissection using conditional Celsr3 mutant mice. *Science* 2008; 320: 946-9.
- Briancon-Marjollet A, Ghogha A, Nawabi H, Triki I, Auzioli C, Fromont S, et al. Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 2314-23.
- Suto F, Ito K, Uemura M, Shimizu M, Shinkawa Y, Sanbo M, et al. Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J Neurosci* 2005; 25: 3628-37.
- Stoeckli ET, Landmesser LT. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 1995; 14: 1165-79.
- Zou Y, Stoeckli E, Chen H, Tessier-Lavigne M. Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 2000; 102: 363-75.
- Fouquet C, Di Meglio T, Ma L, Kawasaki T, Long H, Hirata T, et al. Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 2007; 27: 3037-45.
- Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991; 65: 175-87.
- Barresi MJ, Hutson LD, Chien CB, Karlstrom RO. Hedgehog regulated Slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain. *Development* 2005; 132: 3643-56.
- Wang Y, Zhang J, Mori S, Nathans J. Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 knock-out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J Neurosci* 2006; 26: 355-64.
- Ren T, Anderson A, Shen WB, Huang H, Plachez C, Zhang J, et al. Imaging, anatomical, and molecular analysis of callosal formation in the developing human fetal brain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288: 191-204.
- Buck LB. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 2000; 100: 611-8.
- Mombaerts P. How smell develops. *Nat Neurosci* 2001; 4 (Suppl): 1192-8.
- Lipscomb BW, Treloar HB, Klenoff J, Greer CA. Cell surface carbohydrates and glomerular targeting of olfactory sensory neuron axons in the mouse. *J Comp Neurol* 2003; 467: 22-31.
- Cloutier JF, Sahay A, Chang EC, Tessier-Lavigne M, Dulac C, Kolodkin AL, et al. Differential requirements for semaphorin 3F and Slit-1 in axonal targeting, fasciculation, and segregation of olfactory sensory neuron projections. *J Neurosci* 2004; 24: 9087-96.
- Walz A, Omura M, Mombaerts P. Development and topography of the lateral olfactory tract in the mouse: imaging by genetically encoded and injected fluorescent markers. *J Neurobiol* 2006; 66: 835-46.
- Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, Chen S, et al. An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* 1998; 21: 1273-82.
- Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard AK, Perfettini I, Chedotal A, Petit C. Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 2002; 109: 217-28.
- Potter SM, Zheng C, Koos DS, Feinstein P, Fraser SE, Mombaerts P. Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J Neurosci* 2001; 21: 9713-23.
- Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA. Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci* 2002; 22: 2469-77.
- López-Mascaraque L, De Castro F. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1279-86.
- López-Mascaraque L, De Castro F. Protocórtex frente a protomapa: una perspectiva desde el bulbo olfativo. *Rev Neurol* 2004; 39: 146-55.
- Schwartz GA, Henion TR. Olfactory axon guidance: the modified rules. *J Neurosci Res* 2008; 86: 11-7.
- Elsaesser R, Paysan J. The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neurosci* 2007; 8 (Suppl 3): S1.
- Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 2001; 413: 211-8.
- Lois C, Álvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994; 264: 1145-8.
- Luskin MB, Parnavelas JG, Barfield JA. Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci* 1993; 13: 1730-50.
- Marin O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 441-83.
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2003; 23: 10411-8.
- Grubb MS, Nissant A, Murray K, Lledo PM. Functional maturation of the first synapse in olfaction: development and adult neurogenesis. *J Neurosci* 2008; 28: 2919-32.
- Lledo PM, Merkle FT, Álvarez-Buylla A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 2008; 31: 392-400.
- Mouret A, Gheusi G, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivio-Marín JC, Lledo PM. Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* 2008; 28: 11511-6.
- Alonso M, Ortega-Pérez I, Grubb MS, Bourgeois JP, Charneau P, Lledo PM. Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *J Neurosci* 2008; 28: 11089-102.
- Yamaguchi M, Mori K. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9697-702.

42. Szabo-Rogers HL, Geetha-Loganathan P, Whiting CJ, Nimmagadda S, Fu K, Richman JM. Novel skeletogenic patterning roles for the olfactory pit. *Development* 2009; 136: 219-29.
43. Fantana AL, Soucy ER, Meister M. Rat olfactory bulb mitral cells receive sparse glomerular inputs. *Neuron* 2008; 59: 802-14.
44. Geffen MN, Broome BM, Laurent G, Meister M. Neural encoding of rapidly fluctuating odors. *Neuron* 2009; 61: 570-86.
45. Chesler AT, Zou DJ, Le Pichon CE, Peterlin ZA, Matthews GA, Pei X, et al. A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 1039-44.
46. Col JA, Matsuo T, Storm DR, Rodríguez I. Adenylyl cyclase-dependent axonal targeting in the olfactory system. *Development* 2007; 134: 2481-9.
47. Mombaerts P. Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 713-37.
48. Trinh K, Storm DR. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat Neurosci* 2003; 6: 519-25.
49. Yu CR, Power J, Barnea G, O'Donnell S, Brown HE, Osborne J, et al. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* 2004; 42: 553-66.
50. Martínez-Marcos A. On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Prog Neurobiol* 2009; 87: 21-30.
51. De Castro F. Moléculas quimiotrópicas como mecanismo de orientación del crecimiento axonal y de la migración neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso de los mamíferos. *Rev Neurol* 2001; 33: 54-68.
52. Dode C, Hardelin JP. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 139-46.
53. García-González D, Coelho M, Esteban PF, Soussi-Yanicostas N, de Castro F. Dynamic roles of FGF-2 and Anosmin-1 in the migration of neuronal precursors from the subventricular zone during pre- and postnatal development. *Exp Neurol* 2010; 222: 285-95.

How is the sense of smell connected? Cellular and molecular mechanisms guiding the development of the synaptic connections from the nose to the cortex (II)

Summary. As discussed in the first part of this review, the development of the olfactory system offers a series of fascinating peculiarities that make it one of the models that has been most widely studied in order to reach an understanding of the mechanisms involved in the development of the nervous system. In the first part we reviewed the different mechanisms based on contact (laminins, cell adhesion molecules, ephrins, etc.) and on secretion (semaphorins, slits, growth factors, etc.) that are involved in the formation of the synaptic connections among the olfactory epithelium, the olfactory bulb and the olfactory cortex. In this second part we will review the molecular mechanisms responsible for the intracortical connections in the main olfactory system, as well as the limited information available concerning the accessory olfactory system. We shall also review the mechanisms involved in the migration of the interneuron precursors from the subventricular area of the forebrain to the olfactory bulb, which is another crucial event in the development of this system.

Key words. Anosmin-1. Cell adhesion molecules. Chemotropism. Netrins. Olfactory cortex. Semaphorins. Slit.