



Maduración neuronal durante el desarrollo embionario tardío y postnatal temprano del bulbo olfatorio de ratón

Delsy Dávila-Vera ¹.

Zulma Peña-Contreras ².

Alirio Balza-Quintero ³.

Emilitza Labarca-Villasmil ⁴.

Rosa Virginia Mendoza-Briceño ⁵.

¹Biólogo, Investigadora, Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios-Prü”. Universidad de Los Andes delyda@ula.ve

²Biólogo, Investigadora, Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios-Prü”. Universidad de Los Andes zulmap@ula.ve

³Ingeniero, Investigador, Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios-Prü”. Universidad de Los Andes alibal@ula.ve

⁴Ingeniero, Investigadora, Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios-Prü”. Universidad de Los Andes

⁵Médico, Investigadora, Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios-Prü”. Universidad de Los Andes

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 19 de Junio del 2013 a la Revista Vitae Academia

RESUMEN

El bulbo olfatorio desempeña importantes funciones como centro de enlace entre el medio ambiente y los centros cerebrales superiores, siendo conocida su participación en alteraciones neurológicas, genéticas y hepáticas. De allí el objetivo de estudiar la neurodiferenciación del bulbo olfatorio durante el desarrollo prenatal (E) tardío y el postnatal (P) temprano en ratones NMRI utilizando microscopía de luz y electrónica, para lograr una mejor comprensión de su funcionalidad. Las células neuronales al día E13 son inmaduras, progresivamente se van diferenciando y ubicando según los diversos tipos celulares, definiéndose la organización laminar al momento del nacimiento. En la etapa postnatal temprana se consolida la histotipia del bulbo olfatorio, alcanzando al día P7 la madurez histológica y sináptica. Las sinapsis axodendríticas se observan desde la fase prenatal mientras que las dendro-dendríticas son una expresión morfo-funcional postnatal. Estos resultados permiten futuras propuestas experimentales sobre enfermedades que involucran al bulbo olfatorio.

PALABRAS CLAVE: Bulbo olfatorio, diferenciación neuronal, formación sináptica, ultraestructura.

NEURONAL MATURATION DURING LATE EMBRYONIC AND EARLY POSTNATAL DEVELOPMENT OF MOUSE OLFACTORY BULB

SUMMARY

The olfactory bulb plays an important role as a link between the environment and higher brain centers. This structure is known for its role in neurological, genetic and liver disorders. Hence the aim of studying the neuronal differentiation during late embryonic (E) and early postnatal (P) development of NMRI mice olfactory bulb, using light and electron microscopy, to achieve a better understanding of its functionality. Neuronal cells at day E13 were immature, progressively they differentiate and migrate according to the different cell types, so that a defined laminar organization could be appreciated at birth. In early postnatal stage histotypic organization was consolidated, reaching at day P7 histological and synaptic maturity. The axo-dendritic synapses were observed from the embryonic stage, whereas dendro-dendritic were only seen in the postnatal stage.

KEY WORDS: Olfactory bulb, neuronal differentiation, synaptic formation, ultrastructure.

MADURACIÓN NEURONAL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TARDÍO Y POSTNATAL TEMPRANO DEL BULBO OLFACTORIO DE RATÓN

INTRODUCCIÓN

Dada la participación del bulbo olfatorio en diversas afecciones neurológicas⁽¹⁻¹¹⁾ y siendo ampliamente conocida la composición histológica del bulbo olfatorio adulto, como lo demuestran los resultados de diversos investigadores, utilizando diferentes vías metodológicas

como son tinciones clásicas de Nissl y de Golgi⁽¹²⁻¹⁹⁾, estudios experimentales con técnicas de degeneración⁽²⁰⁾, estudios fisiológicos⁽²¹⁾ y análisis ultraestructurales⁽²²⁻²⁷⁾, es nuestro interés profundizar en el conocimiento de la diferenciación neuronal del mismo, para establecer tanto el momento maduracional en el cual cada tipo celular alcanza su citotípia, como el inicio de las conectividades neuronales hasta su consolidación definitiva. Esta información es fundamental para el desarrollo de biomodelos experimentales donde se puedan reproducir situaciones patológicas y discriminar la participación de alguno o de varios tipos celulares y determinar la integridad y/o las alteraciones de la sinaptología bulbar.

El sistema olfativo durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano muestra una gran plasticidad citológica, siendo un modelo ampliamente utilizado por distintos investigadores^(17-18,28-30) para tratar de entender los mecanismos relacionados con el crecimiento y funcionalismo neuronal durante los procesos de formación y consolidación del sistema nervioso, al ser un sistema donde se establecen diversidad de interacciones sinápticas⁽³¹⁻³²⁾, cuyo comportamiento fisiológico desde el punto de vista de la neurotransmisión ha sido previamente estudiado por nosotros tanto en el desarrollo *in situ* como *in vitro*⁽³³⁾. Como elemento de enlace periferia-centros nerviosos centrales, en el bulbo olfatorio desempeñan una importante función los glomérulos olfatorios, estructuras ampliamente estudiadas por otros autores (18,28,30,34), que están formadas por los axones de las neuronas sensoriales olfatorias, las dendritas de las principales células de proyección del bulbo como son las células mitrales y las células en penacho; participando además, las células granulosas⁽³⁵⁻³⁸⁾ y las células periglomerulares al establecer contactos sinápticos con las células mitrales. Para que se cumpla el proceso de integración de la información que ingresa y egresa a nivel del bulbo olfatorio, intervienen dos tipos celulares principales: las células mitrales y las células en penacho⁽³⁹⁻⁴⁰⁾, las cuales reciben la información de las neuronas sensoriales olfatorias a través de las estrías olfatorias intermedia y lateral, procesan dicha información y la transmiten a la corteza olfatoria⁽⁴¹⁾. Esta multiplicidad de conexiones conlleva al procesamiento de una alta cantidad de información neuronal que emerge del bulbo olfatorio a través del haz olfatorio⁽⁴¹⁻⁴²⁾.

El objetivo del presente trabajo es estudiar los cambios citoarquitectónicos que ocurren durante el desarrollo prenatal tardío y el postnatal temprano del bulbo olfatorio del ratón NMRI, con el fin de lograr, por medio del análisis de la morfogénesis y la formación de las sinapsis, una mejor comprensión de su funcionalidad, lo cual permitirá inferir en mecanismos biológicos básicos que puedan intervenir en el establecimiento de enfermedades en las cuales esté involucrado el bulbo olfatorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en bulbos olfatorios de ratones de la cepa Naval Medical Research Institute (NMRI), suministrados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes. El manejo de los animales⁽⁴³⁻⁴⁴⁾, fue hecho de acuerdo a lo establecido por el Comité de

Bioética de la Universidad de Los Andes para el uso de animales experimentales según exigencias establecidas en las Normas para la utilización de animales en investigación contenidas en el Código de Bioética y Seguridad del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONACIT-Caracas, Venezuela).

Para lo correspondiente al análisis prenatal se utilizaron dos ratones hembras gestadas para cada edad objeto del estudio; es decir, con 13, 15, 17, 19 y 21 días de gestación (E13, E15, E17, E19 y E21) y para el estudio postnatal temprano fueron utilizados cinco ratones por cada edad: recién nacido (P0) y 1, 3, 5, 7 y 9 días de edad postnatal (P1, P3, P5, P7 y P9), los cuales fueron anestesiados con Ketamina^R a una dosis de 240 mg/Kg-peso. A las hembras de ratones con los tiempos de gestación programados, se les practicó una incisión abdominal para exponer el útero y extraer los embriones, los cuales fueron colocados inmediatamente en solución fijadora. Posteriormente, se procedió a extraer los bulbos olfatorios tanto de los embriones como de los ratones de edad postnatal, haciendo una incisión antero-posterior y otra latero-lateral en el tercio anterior del cráneo, lo cual permite la exposición de la región bulbar.

Los bulbos olfatorios, inmediatamente después de ser extraídos, fueron seccionados en fragmentos de aproximadamente 3 mm³ y sumergidos en mezcla fijadora 3:3 (45) (glutaraldehído al 3% más formaldehído al 3%, en tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3), a 4°C, condiciones en las cuales se preservaron durante 12h; luego fueron postfijados durante 18h en tetraóxido de osmio al 1%.

Después se realizó el proceso de deshidratación e infiltración epoxídica. Utilizando un Ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B se hicieron secciones gruesas de 1 a 2 µm de espesor y secciones ultrafinas de 90 nm de espesor, las cuales fueron analizadas con microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión, después de haber sido contrastadas con p-fenil-endiamina y con acetato de uranilo y citrato de plomo, respectivamente⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Las observaciones se hicieron a través de un microscopio fotónico Polyvar Reichert Jung con cámara fotográfica digital Infinity y de un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000.

Se hizo la cuantificación de los contactos interneuronales en las diferentes edades prenatales y postnatales estudiadas, desde la aparición de los primeros esbozos sinápticos hasta las sinapsis verdaderamente constituidas, tanto axo-dendríticas como dendro-dendríticas. Para valorar las diferencias estadísticamente significativas se utilizó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA)⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾ y se realizó un test *a posteriori* para comprobar dichas diferencias, utilizando la prueba de Tukey con la aplicación del programa estadístico SPSS versión 15. Los resultados obtenidos fueron expresados en promedio de media ± Desviación Estándar (Promedio±DE), tomando el 95% como índice de confiabilidad estadística ($p<0,05$). Los resultados permitieron comparar el incremento en el número de sinapsis axo-dendrítica y dendro-dendríticas y la relación de estas con el desarrollo y maduración del bulbo olfatorio.

RESULTADOS

Al día E13 de desarrollo embrionario el bulbo olfatorio toda la población celular con aspecto de inmadurez, está constituida predominantemente por un solo tipo celular. Son neuronas que tienden a ser redondeadas o ligeramente ovaladas, con cuerpos pequeños aun cuando puede observarse una discreta variabilidad de tamaño entre ellas. Son células con uniformidad citológica, de núcleo grande y citoplasma muy electrón transparente, con escasas organelas. Este conglomerado de células neuronales inmaduras está distribuido sin ningún patrón organizativo en todo el espesor del tejido (Figura. 1).

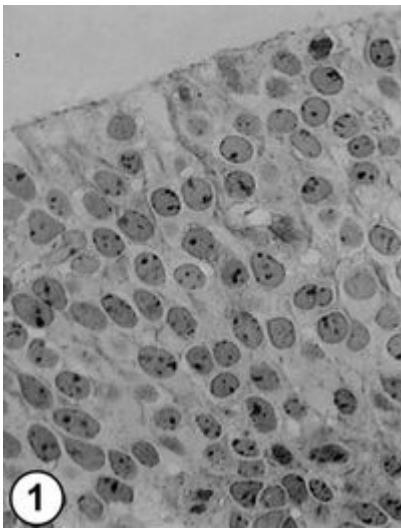


Figura 1. Bulbo olfatorio de ratón E13 destaca la uniformidad e inmadurez citológica en todo el espesor del tejido. Se observan células de núcleo voluminoso y escasas organelas en el citoplasma. Aumento: 63 X

El bulbo olfatorio entre los días E15 y E17 empieza a mostrar su histoarquitectura característica. Presenta un límite externo regular y bien delineado, la población celular muestra el inicio de la diferenciación morfológica, mostrando cierto grado de laminación, distinguiéndose al día E15 tres segmentos celulares: el más externo con células pequeñas, de morfología variada, aunque tienden a la elongación somática, en el segundo segmento se ven células de mayor volumen somático, con núcleo grande y abundante citoplasma; mientras que en la parte más interna las células son redondeadas con núcleos grandes y escaso citoplasma distribuidas entre una neuropila que empieza a formarse (Figura. 2).

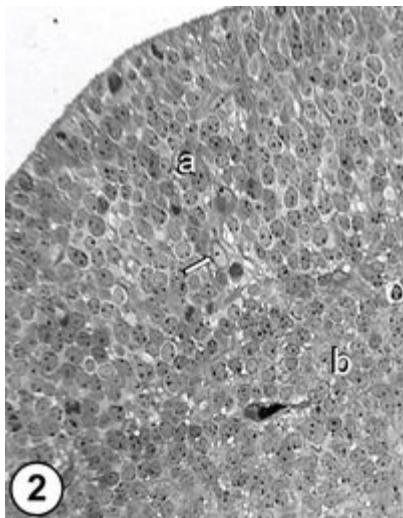


Figura 2. Sección de bulbo olfatorio de ratón E15 se observa el inicio de la laminación tisular. La parte periférica (a) está formada por células de morfología variada, algunas con amplio citoplasma. En la zona interna (b) las células tienden a ser redondeadas con núcleos grandes y escaso citoplasma. En la parte intermedia se observan células que destacan por su mayor volumen somático y nuclear (flecha). Aumento: 25 X.

Al día E17 entre los cuerpos celulares se distinguen prolongaciones neuronales inmaduras, en las cuales es posible observar múltiples formaciones vesiculares de diferentes tamaños y entre estas algunas semejantes a vesículas sinápticas, además, a esta edad es posible ver la presencia, en un número muy reducido, de pequeños depósitos de material electrónico denso adosados a la cara interna de membrana de las prolongaciones celulares (Figura. 3), que pueden ser interpretados como los primeros contactos intermembranosos y por tanto, el inicio del proceso sináptico en la especie estudiada.

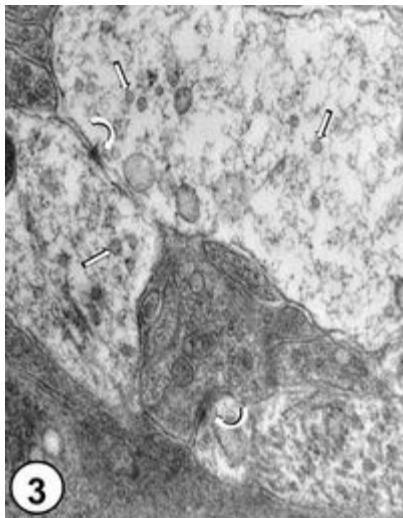


Figura 3. Prolongaciones neuronales observadas en la región plexiforme del bulbo olfatorio de ratón E17, en cuyo interior destaca la presencia de formaciones vesiculares (flechas rectas) y en algunos sitios de contacto entre las prolongaciones se observa depósito de material electrónico denso (flechas curvas). Aumento: 18.000 X.

Luego a la edad E19 se va perdiendo la regularidad y uniformidad del borde periférico del

bulbo debido a la presencia de las primeras fibras del nervio olfatorio que ingresan al mismo en forma de delgadas prolongaciones electrón densas que ocupan la zona próxima al borde, distribuyéndose tanto de forma paralela al mismo, como ramificándose perpendicularmente hacia el interior del tejido para dar inicio a los futuros glomérulos. La parte más periférica del bulbo olfatorio, a esta edad se observa diferenciada en dos segmentos, uno externo donde la celularidad para iniciar su transformación en una verdadera capa plexiforme y uno interno, con un alto índice de cuerpos celulares, donde destacan las células en penacho que son de mayor volumen que el resto de la población neuronal. Por debajo de esta capa se observa la presencia de grandes células elongadas, de citoplasma claro y núcleo grande, dispuestas en varias capas, que corresponden a las células mitrales y hacia la parte más interna se observa la capa bien constituida de células granulosas (Figura. 4).

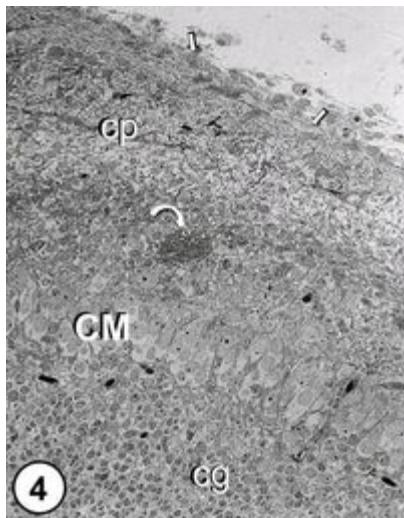


Figura 4. Se observa la irregularidad de la periferia del bulbo olfatorio de ratón a la edad E19, debido al ingreso de las fibras del nervio olfatorio (flechas cortas) a la capa plexiforme (cp), donde puede observarse una incipiente formación glomerular (flecha curva). Debajo de esta capa plexiforme se visualizan grandes células elongadas, de citoplasma claro y núcleo voluminoso, dispuestas en varias capas, que corresponden a las células mitrales (CM). cg, capa de células granulosas. Aumento: 20 X.

Al día E21 la región más periférica del bulbo olfatorio muestra una proporcionalidad semejante de cuerpos celulares del tipo de interneuronas y de prolongaciones neuronales; sin embargo, al alejarse del borde el tejido se hace más laxo y se observa un aumento en la cantidad de formaciones glomerulares, a pesar de que todavía no están bien conformadas y que son producto de la interrelación entre las prolongaciones neuronales del bulbo y entre estas y las fibras del nervio olfatorio (Figuras. 5 y 6).

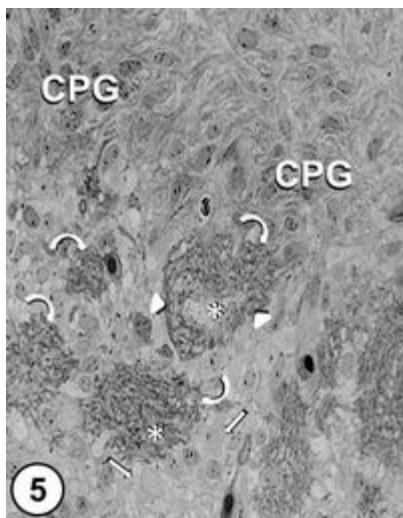


Figura 5. Detalles de la interacción entre las fibras del nervio olfatorio (cabezas de flecha) con los elementos neuronales (asteriscos) del bulbo olfatorio en ratón E21, para formar los glomérulos (flechas curvas). Células en penacho (flechas rectas); CPG, células periglomerulares. Aumento: 40X.

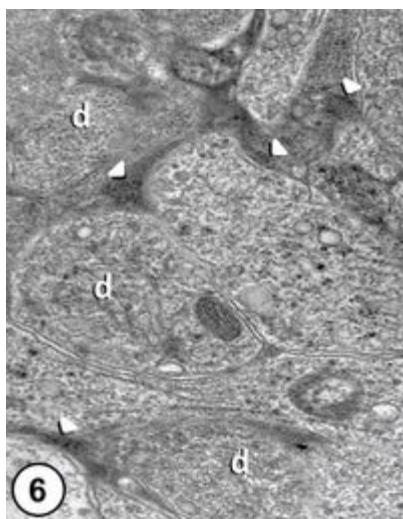


Figura 6. Segmento de un glomérulo en formación ubicado en la zona periférica del bulbo olfatorio de ratón E21, donde se observan entremezcladas tanto prolongaciones electrón densas pertenecientes a fibras del nervio olfatorio (cabezas de flecha), como procesos neuronales de mediana densidad electrónica que pueden corresponder a dendritas (d) de células mitrales y células en penacho. Aumento: 8.000X.

La zona profunda de la capa externa se observa mejor organizada, destacando la presencia de células en penacho, que son neuronas de mediano tamaño distribuidas irregularmente entre las prolongaciones gliales y neuronales. En la región intermedia se visualizan células voluminosas bien definidas, con núcleo grande con uno o dos nucléolos y abundante citoplasma electrón transparente; estas células están distribuidas en varios niveles constituyendo una capa multicelular en profundidad y corresponden a las primeras células mitrales identificables como tales. Inmediatamente por debajo de estas, se encuentra una gruesa capa de células granulosas, que en la parte más profunda forman una lámina uniforme

hacia el interior del bulbo olfatorio. Al día P0 la mayoría de las fibras en la región más interna de la capa plexiforme comienzan a orientarse perpendicularmente al borde bulbar, observándose entre los trayectos de las fibras, escasas células redondeadas y de pequeño diámetro. La capa de las células granulosas incrementa considerablemente su espesor en función del aumento de la población celular constituida por cuerpos neuronales con escaso citoplasma y núcleo voluminoso, con prolongaciones de trayectos cortos, orientados radialmente.

Al observar el bulbo olfatorio de ratones P1 llama la atención la presencia de largas, aunque escasas, prolongaciones neuronales de mediana densidad electrónica, que corresponden a dendritas de células mitrales, algunas de las cuales se extienden hasta los límites donde están ubicados los glomérulos. Se observa cómo han disminuido tanto la celularidad en la zona más externa del bulbo que prácticamente está ocupada solamente por trayectos neuronales, como la distancia entre los glomérulos y el conjunto de cuerpos de las células mitrales, segmento bulbar donde se visualizan cuerpos de células mitrales que aun no han alcanzado su topotípia y algunas células en penacho (Figura. 7).

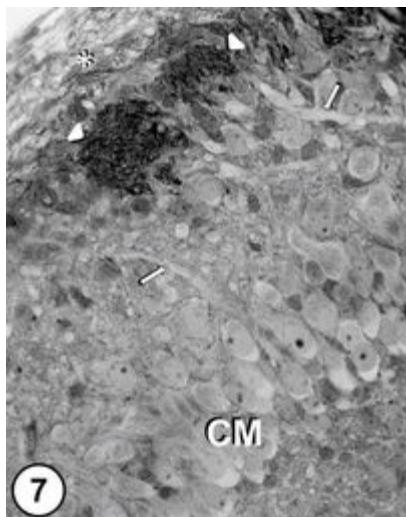


Figura 7. Día P1, se observan trayectos neuronales horizontales (asterisco) en la parte más periférica e inmediatamente hacia el interior se ven formaciones glomerulares (cabezas de flecha) hacia donde convergen prolongaciones dendríticas (flechas rectas) de las células mitrales (CM). Aumento : 40 X.

Mientras que al día P3 la mayoría de las células mitrales han descendido hasta ocupar su sitio definitivo y sus prolongaciones dendríticas se hacen más delgadas, alargadas y ramificadas, observándose células en penacho y células periglomerulares entremezcladas con esas prolongaciones (Figura. 8).

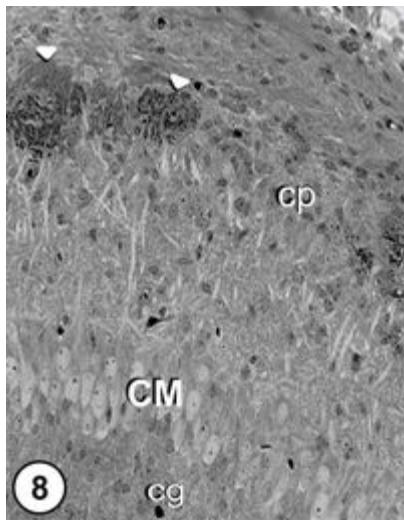


Figura 8. Segmento de bulbo olfatorio de ratón P3 donde se aprecia una amplia capa plexiforme (cp), formaciones glomerulares (cabezas de flecha), la capa de células mitrales (CM) y la capa de células granulosas (cg). Aumento: 25 X.

Es de destacar que a la edad P3, en la zona periférica se pueden observar trayectos descendientes del nervio olfatorio, que al ramificarse para formar los glomérulos se dirigen en sentido transversal y/u oblicuo; sin embargo, más profundamente ya se visualizan zonas de neuropila donde se puede observar que gran parte de las prolongaciones neuronales poseen en su interior vesículas del tipo sináptico (Figura.9), presentando algunas terminaciones neuronales, engrosamientos de membrana y en oportunidades se pueden distinguir contactos sinápticos dendro-dendríticos en formación (Figura. 10).

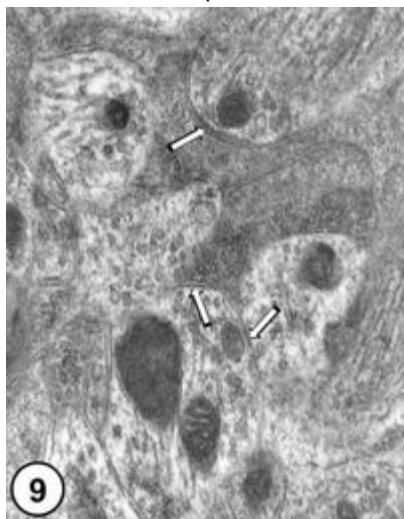


Figura 9. Detalle de la capa plexiforme de bulbo olfatorio de ratón P3. Se observan formaciones vesiculares en el interior de las prolongaciones neuronales y en algunos sitios se observa engrosamiento de las membranas (flechas). Aumento: 18.000 X.

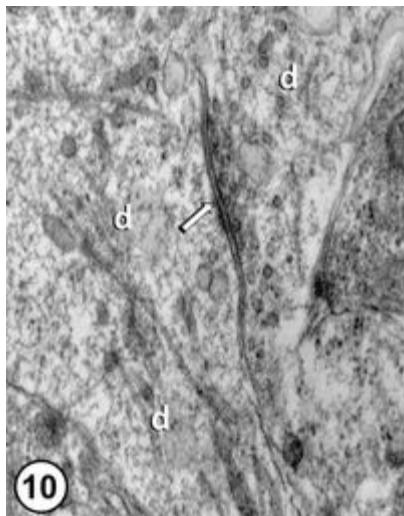


Figura 10. Conjunto de prolongaciones dendríticas (d) en bulbo olfatorio P3, observándose entre dos de ellas el inicio de la formación inicial de un contacto interneuronal (flecha). Aumento: 18.000 X.

Al día P5 el bulbo olfatorio de la especie estudiada ya tiene una organización tisular definida y las células presentan un alto porcentaje de sus características propias. Las células periglomerulares ubicadas en proximidad de los glomérulos, son células de baja densidad electrónica, con escaso citoplasma y núcleo grande. Las células en penacho de cuerpo grande, núcleo voluminoso y citoplasma de baja densidad electrónica, se localizan en la mitad inferior de la capa plexiforme. Al aumentar el bulbo olfatorio de volumen y tamaño, las células mitrales modifican su distribución multilaminar y al día P5 sus cuerpos forman una monocapa o una bicapa celular, sus prolongaciones dendríticas que iniciaron su verticalización a partir del día P0 y P1, se hacen más gruesas, alargadas y ramificadas y se distribuyen en todo el espesor de la capa plexiforme (Figura. 11), que al integrarse conjuntamente con las fibras olfatorias y las dendritas de las células en penacho, participan en la formación de los glomérulos (Figs. 11 y 12), en cuyo interior ya es notoria la presencia de contactos sinápticos axo-dendríticos y dendro-dendríticos (Figura.12). Distribuidas en todo el espesor de la capa plexiforme y entre los cuerpos de las células mitrales, es frecuente observar interneuronas.

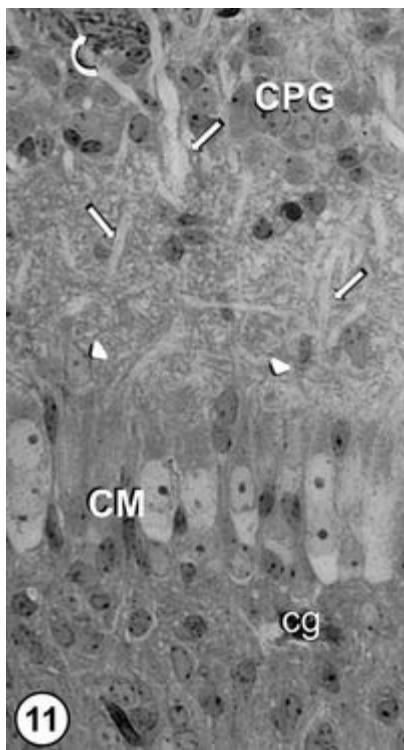


Figura 11. Al día P5 el bulbo olfatorio de ratón muestra características de madurez organizacional. Se observan trayectos claros de dendritas (flechas rectas) de las células mitrales (CM) y de las células en penacho (cabezas de flecha), células periglomerulares (CPG) y en la parte superior un segmento de un glomérulo (flecha curva). cg, capa de células granulosas. Aumento: 25 X.

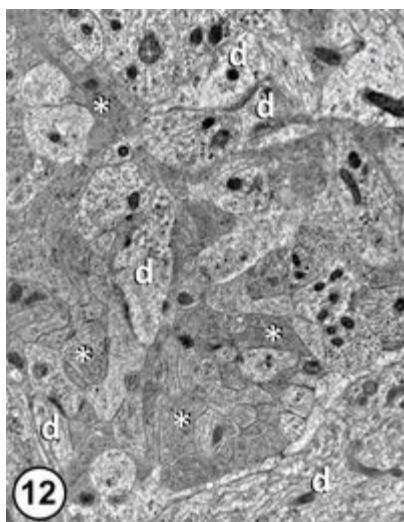


Figura 12. Sección de glomérulo de bulbo olfatorio de ratón P5 donde se distinguen prolongaciones dendríticas neuronales (d) y fibras terminales del nervio olfatorio (asteriscos). Se pueden visualizar contactos sinápticos axo-dendríticos y dendro-dendríticos. Aumento: 10.000 X.

Todas las características observadas en el día P5 se consolidan y se hacen definitivas al día P7 de desarrollo postnatal, edad en la cual toda la población celular del bulbo olfatorio ha alcanzado su citotipia e histotipia, observándose una bien definida organización de los

glomérulos, los cuales tienden a hacerse más periféricos y posteriormente aumentan de tamaño hasta adoptar en la mayoría de los casos su forma esferoidal (Figura. 13).

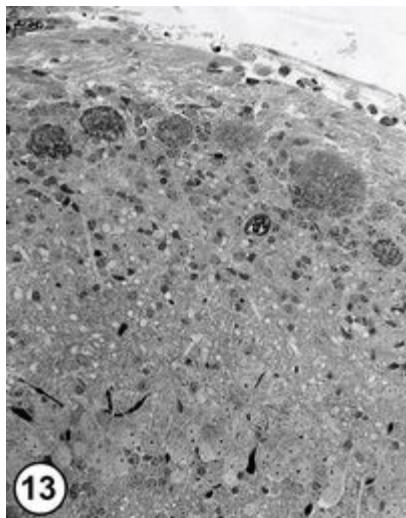


Figura 13. Se muestra la citotipia y la histotipia del bulbo olfatorio al día P7. Aumento : 20X.

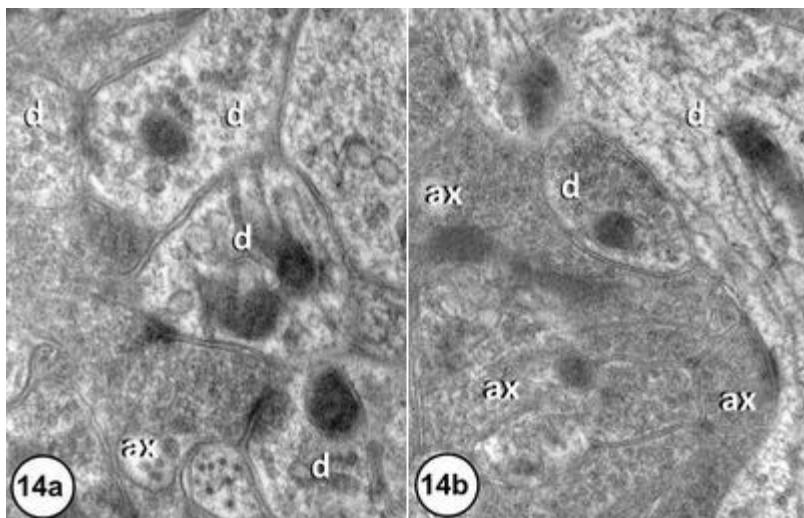


Figura 14. Contactos sinápticos dendro-dendríticos y axo-dendríticos observados al día P7 en el bulbo olfatorio de ratón. d, dendritas; ax, axones. Aumento: a, 25.000X; b, 20.000X.

En los días P7 (Figura. 14) y P9 los contactos sinápticos tienen todas sus características de madurez morfológica tanto los axo-dendríticos como los contactos dendro-dendríticos y su presencia es cuantitativamente más elevada en relación a las edades previas (Figura. 15, Tablas 1 - 4).

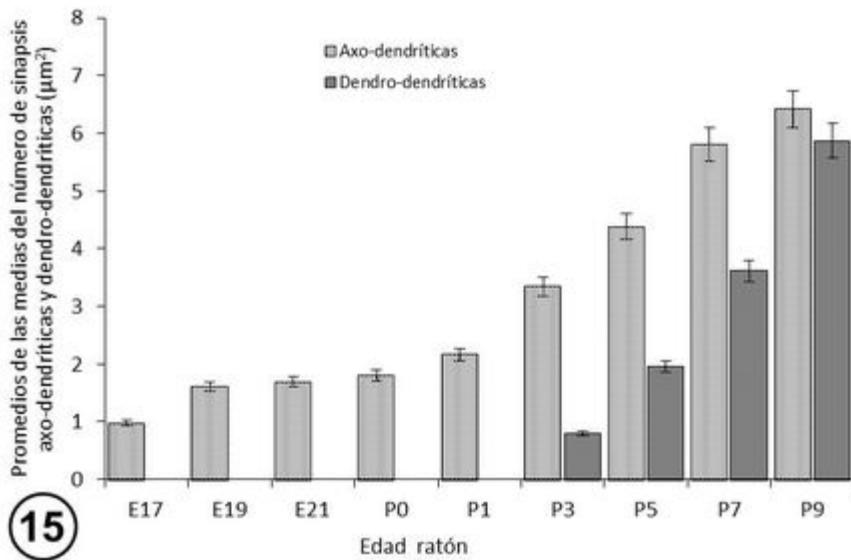


Figura 15. Cuantificación, por μm^2 de superficie, de sinapsis axo-dendríticas y dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón en edad prenatal tardía y postnatal temprana.

Tabla 1

| Edades | Cantidad de sinapsis/ μm^2 | P |
|--------|---------------------------------------|-------|
| | | |
| P3 | 0,80 \pm 0,47 | 0.000 |
| P5 | 1,95 \pm 0,56 | |
| P7 | 3,61 \pm 0,74 | |
| P9 | 5,87 \pm 0,85 | |

Tabla 1. Variabilidad en el número de sinapsis dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón en edades postnatales tempranas ($n = 50$).

Tabla 2

| Edades | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|--------|----|------------------------------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| P3 | 50 | 0,7978 | | | |
| P5 | 50 | | 1,9548 | | |
| P7 | 50 | | | 3,6114 | |
| P9 | 50 | | | | 5,8692 |

Tabla 2. Comparaciones múltiples de los promedios de las medias en el número de sinapsis dendro-dendríticas utilizando la Prueba de Tukey ($n = 50$).

Tabla 3

| Edades | Cantidad de sinapsis/ μm^2 | P |
|--------|---------------------------------------|-------|
| | Promedio \pm DE | |
| E17 | 0,97 \pm 0,29 | 0.000 |
| E19 | 1,61 \pm 0,21 | |
| E21 | 1,69 \pm 0,50 | |
| P0 | 1,80 \pm 0,47 | |
| P1 | 2,16 \pm 0,57 | |
| P3 | 3,34 \pm 0,42 | |
| P5 | 4,38 \pm 0,58 | |
| P7 | 5,81 \pm 0,78 | |
| P9 | 6,42 \pm 0,89 | |

Tabla 3. Variabilidad en el número de sinapsis axo-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón en edades prenatal tardía y postnatal temprana (n = 50).

Tabla 4

| Edades | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | | |
|--------|----|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| E17 | 50 | 0,9706 | | | | | | |
| E19 | 50 | | 1,6124 | | | | | |
| E21 | 50 | | 1,6964 | | | | | |
| P0 | 50 | | 1,8016 | | | | | |
| P1 | 50 | | | | | | | |
| P3 | 50 | | | 2,1598 | | | | |
| P5 | 50 | | | | 3,3404 | | | |
| P7 | 50 | | | | | 4,3810 | | |
| P9 | 50 | | | | | | 5,8078 | |
| | | | | | | | | 6,4194 |

Tabla 4. Comparaciones múltiples de los promedios de las medias en el número de sinapsis axo-dendríticas utilizando la Prueba de Tukey (n = 50).

El análisis estadístico realizado al número de sinapsis dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio durante el desarrollo postnatal (P3- P9), dio un nivel de significancia de $p=0,000$, lo cual significa que hay una diferencia estadísticamente muy significativa entre las edades estudiadas ya que $p<0,05$ (Tabla 1). Cuando analizamos el test *a posteriori* (Tabla 2) encontramos que los promedios en el número de sinapsis dendro-dendríticas, son diferentes con respecto a cada edad, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas en el número de contactos sinápticos en las edades estudiadas. En la figura 15 se muestra en forma gráfica el aumento en el número de sinapsis dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón entre P3 y P9. Se puede observar que hay un aumento constante en el número de sinapsis durante el período de desarrollo analizado.

Los resultados obtenidos después del análisis estadístico con ANOVA (Tabla 3) del número de sinapsis axo-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón desde E17 hasta P9, reflejaron un valor de $p=0,000$, lo cual indica que hay diferencias muy significativas en el número de sinapsis axo-dendríticas en las edades estudiadas. Al comparar con el test *a posteriori* (Tabla 4), se observa que los valores obtenidos en las edades E17 y desde P1 a P9 muestran una diferencia estadísticamente significativa, mientras que entre las edades entre E19 a P0 no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Durante la etapa prenatal E17 a E21 el crecimiento

en el número de sinapsis axo-dendríticas es muy lento y tiende a ser constante. Es a partir de P0 y P1 cuando se observa un leve aumento en el número de formaciones sinápticas. Como se observa en la figura 15 el aumento real del número de sinapsis axo-dendríticas comienza a partir de P1 y este incremento se hace constante y progresivo hasta P9, última edad analizada en este trabajo.

De los resultados obtenidos tanto del promedio de las medias en el número de sinapsis axo-dendríticas como de las dendro-dendríticas, se puede inferir que la formación principal de ambos tipos de sinapsis comienza durante el desarrollo postnatal, es decir, entre las edades P3 y P9.

DISCUSIÓN

El bulbo olfatorio realiza diversas y complejas funciones a pesar de ser una red neuronal relativamente simple^(28,51-58) que morfológicamente se consolida en la etapa postnatal temprana, cuando se establece la mayoría de las interrelaciones neuronales, alcanzando en el día P9 la madurez sináptica, evidenciada por la existencia de sinapsis axo-dendríticas y de sinapsis recíprocas dendro-dendríticas, estas últimas formadas a partir de un circuito neuronal simple que media la modulación inhibitoria de la actividad de las células mitrales (29,59-60) y que está constituido por las células mitrales y las granulosas anaxónicas, que hacen del bulbo olfatorio una región sinápticamente compleja.

El bulbo olfatorio durante la etapa embrionaria intermedia experimenta un proceso de proliferación y diferenciación celular, determinado fundamentalmente por las condiciones propias e inherentes al mismo tejido bulbar. En ratones NMRI no es sino hasta la fase embrionaria final y al momento del nacimiento, cuando el bulbo olfatorio comienza a recibir información, al establecerse los primeros contactos morfológicos de las fibras axónicas provenientes del nervio olfatorio y que ingresan al tejido bulbar, lo cual coincide con los hallazgos de Valverde⁽¹⁴⁾ y Lazarini⁽⁶¹⁾ quienes ubican la formación glomerular entre los días E20 y P0. Sin embargo, Blanchard⁽²⁸⁾ señala que entre los días E13 y E16 ya están constituidos los glomérulos olfatorios, lo cual indirectamente sugiere la existencia de sinapsis en esas edades.

Al día E13 sólo es posible diferenciar cuerpos de células inmaduras, que se originan en la placoda olfatoria, llegan como células migratorias a la zona subventricular y a partir de allí ingresan al bulbo olfatorio⁽¹⁴⁾. En el bulbo olfatorio E17 ya se identifican células mitrales, confirmando lo referido por otros autores en relación a su temprana formación en la etapa prenatal^(16-17, 57, 60).

Algunos autores refieren la formación de las primeras sinapsis en el bulbo olfatorio, específicamente las glomerulares, entre los días E13 y E16 (14, 28-30); sin embargo, en el caso de la especie analizada en el presente estudio, los glomérulos empiezan a formarse alrededor de los días E17 y E19, alcanzando su máxima expresión alrededor del día P7, cuando toda la

población celular del bulbo olfatorio ha alcanzado su citotípia e histotípia; edad que hemos denominado el Período Crítico, que para el bulbo olfatorio de ratón es el día P7 +/- 24h, lo cual corrobora que en el bulbo olfatorio los procesos de plasticidad neuronal se mantienen después del nacimiento, durante un prolongado período (62).

Según Blanchart y col.(28) en el ratón, las uniones electrón-densas se observan a partir de E13 y ellos pudieron visualizar vesículas tipo sinápticas en E14; sin embargo, nuestras observaciones indican que el inicio de la sinaptogénesis en el bulbo olfatorio del ratón NMRI puede establecerse en el día E17 cuando se observan engrosamientos en la parte interna de algunas membranas neuronales adosadas, la cantidad de dichos engrosamientos se incrementa, a predominio de las estructuras dendríticas, a medida que se avanza en edad, haciéndose más acentuados y con mayor densificación. Por su parte, Marchand y Bélanger (30) han reportado en rata que es en E16 cuando los axones empiezan a establecer contactos en el bulbo olfatorio.

Al analizar las sinapsis axo-dendríticas cuantitativamente y por edad, vemos que en E19 hay un aumento del 39,8%, de sinapsis en relación con E17, luego hasta P0 el incremento cuantitativo es lento con un porcentaje de formación sináptica que no supera el 6% (E19 a E21= 4,95% y E21 a P0= 5,84%). Es a partir de P1, donde hay una diferencia de 16,58% respecto al día anterior y comienza un incremento considerable del número de sinapsis que se mantiene en ascenso hasta P7, disminuyendo nuevamente la formación sináptica entre P7 y P9, edades entre las que se establece una diferencia de 9,53%.

A través del análisis estadístico se pudo corroborar que la formación de las sinapsis dendro-dendríticas es un evento exclusivamente postnatal que se inicia al día P3 como un proceso muy dinámico y con un alto índice de formación, como se demuestra al comparar los porcentajes de sinapsis dendro-dendríticas cuantificadas en las edades estudiadas. Así tenemos que entre P3 y P5 hay una diferencia de 58,97%, entre P5 y P7 de 45,98% y entre P7 y P9 la diferencia es de 38,5%. Este aumento continuo y acelerado coincide con la maduración y consolidación de los glomérulos olfatorios.

Aun cuando en E17 se identifican sinapsis axo-dendríticas, su verdadera diferenciación es en P0; mientras que las sinapsis dendro-dendríticas se diferencian a partir de P3. Ambas aumentan cuantitativamente hasta los días P7 y P9, edades en la que los contactos sinápticos en el bulbo olfatorio de ratón poseen sus características definitivas. Esto nos permite decir que el desarrollo y maduración de las sinapsis axo-dendríticas y dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón es un evento que ocurre fundamentalmente en el período postnatal temprano, lo cual coincide con lo indicado por Walton⁽⁶³⁾ y por Kopel y col.⁽⁶⁴⁾. Además, existen estudios que afirman que el bulbo olfatorio de un animal de 3 días de nacido ya es capaz de discernir los estímulos olfativos que recibe, lo cual contribuye de manera importante en la consolidación y maduración final de este órgano sensorial (17, 31-32, 34, 37-38, 63).

Es de destacar la importancia de que en este trabajo se haya podido determinar el momento cronológico en el cual todo el conjunto poblacional neuronal del bulbo olfatorio alcanza su completa integración para convertirse en un órgano que puede expresar todas sus capacidades funcionales. Ese momento, que en el ratón corresponde a la edad P7 ± 24h, lo

hemos definido Período Crítico debido a su significado fisiológico, ya que en el uso de biomodelos animales permite diseñar con mayor precisión ensayos experimentales en función al objetivo que se persigue; es decir, estudios sobre afecciones que involucren procesos de conectividad neuronal ofrecerán mejores resultados con ensayos realizados utilizando animales con edades previas al Período Crítico; mientras que para el estudio de aquellas patologías que se desarrollan cuando el sistema nervioso ya está morfológicamente maduro, el modelo a escoger es con edades posteriores al Período Crítico. Los aportes que este trabajo ofrece nos permitirán proyectar estudios experimentales sobre enfermedades en las que el sistema olfatorio esté implicado.

Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento al Personal Técnico del Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Prü”, en especial a J.G. Peña, J. Ramírez-Márquez, J.A. Rojas-Fernández, J. Sánchez-Gil, A. Viloria-Ortega y L. Zavala-Morillo, por su valiosa participación en la preparación de las muestras y en el procesamiento fotográfico de las mismas.

REFERENCIAS

1. Merriam GR, Beitins IZ, Bode HH. Father-to-son transmission of hypogonadism with anosmia. *Am J Dis Child.* 1977; 131: 1216-1219.
2. Gregson RA, Free ML, Abbot MW. Olfaction in Korsakoff's, alcoholics and normals. *Br J Clin Psychol.* 1981; 20: 3-10.
3. Talamo BR, Rudel R, Kosik KS, Lee VM, Neff S, Adelman L, Kauer JS. Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature.* 1989; 337: 736-739.
4. Lehrner JP, Kryspin-Exner I, Vetter N. Higher olfactory threshold and decreased odor identification ability in HIV-infected person. *Chem Senses.* 1995; 20: 325-328.
5. Zucco GM, Savoldelli A. Deficit olfattivi in soggetti Down: rapporti con il morbo di Alzheimer. *Scienze dell'Interazione.* 1996; 3: 103-109.
6. Hornung DE, Kurtz DB, Bradshaw CB, Seipel DM, Kent PF, Blair DC, Emko P. The olfactory loss that accompanies an HIV infection. *Physiol Behav.* 1998; 64: 549-556.
7. Zucco GM, Zeni MT, Perrone A, Piccolo I. Olfactory sensitivity in early stage Parkinson patients affected by more marked unilateral disorder. *Percept Mot Skills.* 2001; 92: 894-898.
8. Zucco GM, Ingegneri G. Olfactory deficits in HIV-infected patients with and without AIDS dementia complex. *Physiol Behav.* 2004; 80: 669-674.
9. Zucco GM, Amodio P, Gatta A. Olfactory deficits in patients affected by minimal hepatic encephalopathy: A Pilot Study. *Chem Sens.* 2006; 31: 273-278.
10. Jubiz W, Cruz EA. El síndrome de Kallmann: A propósito de un caso. *Colomb Med.* 2006;

37: 315-318.

11. Burke RE, Dauer WT, Vonsattel JP. A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2008; 64: 485-491.
12. Powell TP, Cowan WM, Raisman G. The central olfactory connexions. *J Anat.* 1965; 99: 791-813.
13. Humphrey T. The development of the olfactory and the accessory olfactory formations in human embryos and fetuses. *J Comp Neurol.* 1940; 73: 431-468.
14. Valverde F. Studies on the piriform lobe. Cambridge: Harvard University Press. Massachusetts, USA. 1965.
15. Nicoll RA. Identification of tufted cells in the olfactory bulb. *Nature.* 1970; 227: 623-625.
16. Pinching AJ, Powell TPS. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 1971a; 9: 305-345.
17. Mair RG, Gellman RL, Gesteland RC. Postnatal proliferation and maturation of olfactory bulb neurons in the rat. *Neuroscience.* 1982; 7: 3105-3116.
18. Valverde F, Santacana M, Heredia M. Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience.* 1992; 49: 255-275.
19. Cajal SR. Origen y terminación de las fibras nerviosas olfatorias. *Gazz sanit.* Barcelona, España. 1890; p. 1-21.
20. Sem-Jacobsen CW, Petersen MC, Lazarte JA, Dodge HW, Holman CB. Electroencephalographic rhythms from the depths of the frontal lobe in 60 psychotic patients. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1955; 7: 193-210.
21. Powell TPS, Cowan WM. Centrifugal fibres in the lateral olfactory tract. *Nature.* 1963; 199: 1296-1297.
22. Price JL. The termination of centrifugal fibres in the olfactory bulb. *Brain Res.* 1968; 7: 483-486.
23. Price JL, Powell TPS. The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 1970a; 7: 91-123.
24. Price JL, Powell TPS. The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 1970b; 7: 125-155.
25. Pinching AJ, Powell TPS. The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 1971b; 9: 347-377.
26. Shepherd GM. The synaptic organization of the brain. Oxford University Press. New York, USA. 1974.
27. Dávila-Vera D, Peña-Contreras Z, Balza-Quintero A, Zavala-Morillo L, Labarca-Villasmil E,

- Andrade-Ruiz H, Mendoza-Briceño RV. Formación de glomérulos olfatorios en ratón durante el desarrollo *in situ*. *Acta Microscopica*. 2012; 21: 73-83.
28. Blanchart A, Romaguera M, García-Verdugo JM, de Carlos JA, López-Mascaraque L. Synaptogenesis in the mouse olfactory bulb during glomerulus development. *Eur J Neurosci*. 2008; 27: 2838-2846.
29. Panzanelli P, Bardy C, Nissant A, Pallotto M, Sassoè-Pognetto M, Lledo PM, Fritschy JM. Early synapse formation in developing interneurons of the adult olfactory bulb. *J Neurosci*. 2009; 29: 15039-15052.
30. [Marchand R, Bélanger MC](#). Ontogenesis of the axonal circuitry associated with the olfactory system of the rat embryo. *Neurosci Lett*. 1991; 129: 285-290.
31. Gottfried JA, Small DM, Zald DH. The chemical senses. En: Zald DH, Rauch S. *The Orbitofrontal Cortex*. Editorial Oxford University Press 1^a edición. Oxford, Reino Unido. 2006; p. 125-171.
32. Zelano C, Sobel N. Humans as an animal model for systems-level organization of olfaction. *Neuron*. 2005; 48: 431-454.
33. Miranda-Contreras L, Ramírez-Martens LM, Benítez-Díaz PR, Peña-Contreras ZC, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int J Dev Neurosci*. 2000; 18: 83-91.
34. Kivity S, Ortega-Hernández OD, Shoenfeld Y. Olfaction a window to the mind. *Isr Med Assoc J*. 2009; 11: 238-243.
35. Tran H, Chen H, Walz A, Posthumus JC, Gong Q. Influence of olfactory epithelium on mitral/tufted cell dendritic outgrowth. *PLoS One*. 2008; 3: 1-8.
36. Doty L, Bromley SM. Olfaction and Gustation. En: Snow J, Ballenger J. *Ballenger's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*. Hamilton, Ontario, Canadá: Editorial BC Decker 16^a edición. 2003; p. 561-591.
37. Menini A, Lagostena L, Boccaccio A. Olfaction: from odorant molecules to the olfactory cortex. *News Physiol Sci*. 2004; 19: 101-104.
38. Shepherd RN. "Central processing of olfactory signals" D. Müller-Schwarze y M.M. Mozelí (eds.) *Chemical signals in vertebrates*. New York. Plenum Press. 1976.
39. Nemitz JW, Goldberg SJ. Neuronal responses of rat pyriform cortex to odor stimulation: an extracellular and intracellular study. *J Neurophysiol*. 1983; 49: 188-203.
40. Tran H, Chen H, Walz A, Posthumus JC, Gong Q. Influence of olfactory epithelium on mitral/tufted cell dendritic outgrowth. *PLoS One*. 2008; 3: 1-8.
41. Engen, T. *The Perception of Odors*. New York. Academic Press. 1982.
42. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen CHR. *The human central nervous system, a synopsis*

and atlas. 2q ed. Berlin. Springer- Verlag. Versión en castellano de C. Barastegui Almagro (1.982): *Sinopsis y Atlas del Sistema Nervioso Humano*. Madrid. Ed. AC. 1981.

43. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press. Washington, DC. 1996.

44. Código de Bioética y Bioseguridad. 2^a edición. Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Caracas. 2002.

45. Palacios-Prü EL, Mendoza-Briceño RV. An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res.* 1972; 36: 404-408.

46. Watson HL. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958; 4: 475-478.

47. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963; 17: 208-212.

48. Sato T. A modified method for lead staining of thin sections. *J Electron Microsc.* 1967; 16: 133.

49. Spiegel MR, Schiller J, Srinivasan RA. Análisis de la varianza. Probabilidad y estadística. 2^a edición. México DF. McGraw-Hill. 2007; p. 335-371.

50. Tejedor Tejedor FJ. Análisis de varianza. Schaum. Madrid: La Muralla S.A. 1999.

51. Doty R. Olfaction. *Annu Rev Psychol.* 2001; 52: 424-452.

52. Schoppa NE, Westbrook GL. Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron.* 2001; 31: 639-651.

53. Schoppa NE, Urban NN. Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 501-506.

54. Laurent G, Stopfer M, Friedrich RW, Rabinovich MI, Volkovskii A, Abarbanel HD. Odor encoding as an active, dynamical process: Experiments, computation and theory. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 263-297.

55. Laurent G. Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3: 884-895.

56. Kosaka T, Kosaka K. Intraglomerular dendritic link connected by gap junctions and chemical synapses in the mouse main olfactory bulb: electron microscopic serial section analyses. *Neuroscience.* 2005; 131: 611-625.

57. Djurisic M, Popovic M, Carnevale N, Zecevic D. Functional structure of the mitral cell dendritic tuft in the rat olfactory bulb. *J Neurosci.* 2008; 28: 4057- 4068.

58. Ma J, Lowe G. Correlated firing in tufted cells of mouse olfactory bulb. *Neuroscience.* 2010; 169: 1715-1738.

59. Maher BJ, McGinley MJ, Westbrook GL. Experience-dependent maturation of the glomerular microcircuit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 16865-16870.
60. Gire DH, Franks KM, Zak JD, Tanaka KF, Whitesell JD, Mulligan AA, Hen R, Schoppa NE. Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signaling path. *J Neurosci*. 2012; 32: 2964-2975.
61. Lazarini F, Gabellec MM, Torquet N, Lledo PM. Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 2012; 32: 3652-3664.
62. Cummings DM, Belluscio L. Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry. *J Neurosci*. 2010; 30: 9172-9180.
63. Walton RM. Postnatal neurogenesis: of mice, men, macaques. *Vet Pathol*. 2012; 49: 155-165.
64. Kopel H, Schechtman E, Groysman M, Mizrahi A. Enhanced synaptic integration of adult-born neurons in the olfactory bulb of lactating mothers. *J Neurosci*. 2012; 32: 7519-7527.