



QM505
D3



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES**

**PLASTICIDAD NEURONAL Y
SINAPTOGÉNESIS DURANTE EL
DESARROLLO EMBRIONARIO TARDÍO Y
POSTNATAL TEMPRANO DEL BULBO
OLFATORIO DE RATÓN NMRI**

www.bdigital.ula.ve

Lic. Delsy María Dávila Vera

**Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios Prú"
Vicerrectorado Académico**

Mérida, Venezuela
2014

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Trabajo presentado como parte de los requisitos exigidos por el
Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales
de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Los Andes,

para optar al Título de

www.bdigital.ula.ve

**MAGISTER EN CIENCIAS
MÉDICAS FUNDAMENTALES**

Bajo la tutoría de la
Profesora Rosa Virginia Mendoza Briceño

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**PLASTICIDAD NEURONAL Y SINAPTOGÉNESIS DURANTE EL
DESARROLLO EMBRIONARIO TARDÍO Y POSTNATAL TEMPRANO
DEL BULBO OLFATORIO DE RATÓN NMRI**

**Autora: Lic. Delsy María Dávila Vera
Tutora: Dra. Rosa Virginia Mendoza Briceño**

RESUMEN

Se analizó la neurodiferenciación del bulbo olfatorio durante el desarrollo prenatal (E) tardío y el postnatal (P) temprano en ratones NMRI utilizando microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión con el fin de lograr una mejor comprensión de su funcionalidad. Al día E13 se observaron cuerpos de células neuronales inmaduras, generadas a partir de los neuroblastos que migran desde la zona subventricular y que corresponden a interneuronas y a células granulosas que, de los diferentes tipos celulares del bulbo olfatorio, son las primeras células identificables. En E15 persiste la inmadurez celular y se observan segmentos de crecimiento neuronal y densidades intercelulares. En los embriones E17 y E19 se identifican células mitrales formando una capa multicelular, además del esbozo de la capa plexiforme y la presencia de fibras del nervio olfatorio. Al momento del nacimiento está bien definida la organización laminar, incluida la presencia de glomérulos incipientes rodeados de células periglomerulares inmaduras y se observan escasos contactos sinápticos inmaduros. En la etapa postnatal temprana se consolida la organización tisular, observándose al día P7 contactos axo-dendríticos y dendro-dendríticos bien definidos y al día P9 se alcanza la madurez sináptica, determinada por la presencia de sinapsis recíprocas dendro-dendríticas, formadas a partir de un circuito neuronal simple constituido por las células mitrales y las granulosas anaxónicas. Por otra parte, se hizo el análisis de diferenciación y maduración de los glomérulos olfatorios, estructuras que constituyen el primer sitio de relevo del sistema nervioso central para el procesamiento de la información olfativa, al establecerse allí las primeras sinapsis entre los axones de las neuronas sensoriales olfatorias del epitelio nasal y dendritas de células mitrales y en penacho, así como prolongaciones neuronales de las células periglomerulares. En el día E17 la capa plexiforme del bulbo olfatorio de ratón tiene una neuropila muy laxa con una alta proporción de elementos gliales y escasos trayectos axónicos provenientes del nervio olfatorio. Al día E19, las fibras aferentes a los glomérulos están mejor organizadas, logrando su máxima expresión morfológica un día después del nacimiento cuando alcanzan su sitio definitivo. A partir del día P3 se evidencia el inicio de la formación de la estructura definitiva de los glomérulos como expresión de la interacción de los diversos elementos neuronales que lo conforman, observándose una disminución de los elementos gliales; características que se consolidan al día P5 al aumentar la densidad de la neuropila y las estructuras neuronales interactúan más estrechamente para establecer las sinapsis definitivas. A partir del día P7 la estructura glomerular, morfológicamente está bien establecida y al día P9 muestra su capacidad funcional como lo demuestra la presencia de verdaderos contactos sinápticos.

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo científico, técnico y financiero del Centro de Microscopía Electrónica "*Dr. Ernesto Palacios Prú*" de la Universidad de Los Andes. De igual manera contribuyó para la realización del mismo, la ayuda recibida del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) y del Programa de Adiestramiento y Capacitación (PAC) de la Universidad de Los Andes; así como del Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Innovación, a través del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT).

DEDICATORIA

Quiero agradecer a todos aquellos que de una y otra forma colaboraron no sólo en la realización de este trabajo, sino también en mi formación personal y profesional, y quienes han estado presentes en las duras luchas que me han correspondido vivir.

A Dios todopoderoso por las esperanzas que siempre me ha permitido tener, porque a pesar de las constantes caídas me recordaba día a día que la fe nunca se pierde.

A mis Padres, por sembrar en mí la semilla del esfuerzo, la constancia, dedicación, honor, lealtad, verdad y ser los mejores Maestros de mi vida con su ejemplo y guía permanente.

A mis hijos por ser mis fieles compañeros y la alegría de mi vida. Que mis logros le sirvan de ejemplo porque a pesar de las adversidades siempre se llega a las metas propuestas.

A mis hermanos, por saberme querer y ayudar en todos los momentos más importantes, tanto felices como tristes. Gracias por su apoyo.

A mis jóvenes sobrinos, que cada uno de mis triunfos los estimulen a querer progresar. Que este nuevo avance que doy les sirva de ejemplo.

A mi Maestro, el Dr. Ernesto Palacios Prü, quien con su sabiduría, profesionalismo y calidad humana me ayudó a explotar mi potencialidad y confirmar que la investigación es el camino más hermoso que permite descubrir cosas inexplicables.

A mi tutora, la Dra. Rosa Virginia Mendoza, más que mi Maestra una persona incondicional, que aun sabiendo mis limitaciones creyó en mí y puso toda su confianza para que esta meta se lograra.

A mis amigos y compañeros inseparables Zulma, Emilitz y Alirio, quienes con sus consejos y ayuda en cada paso que realicé en mis investigaciones siempre conté con ellos. Mil gracias.

A mis compañeros de trabajo, amigos muy especiales con quienes he compartido el desarrollo de este estudio y que siempre han estado dispuestos a colaborar y proporcionarme la ayuda necesaria.

De manera especial mis agradecimientos al Lic. Henry Andrade-Ruiz por su invaluable ayuda y orientación en la realización del análisis estadístico.

INDICE GENERAL

RESUMEN	III
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	IV
DEDICATORIA	V
INDICE GENERAL	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE TABLAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	5
1. Anatomía del Sistema Olfativo en humano adulto	5
2. Organización del Epitelio Olfatorio en humano	7
3. Anatomía del Bulbo Olfatorio en humano adulto	9
4. Organización Histológica del Bulbo Olfatorio	10
5. Funcionalidad del Bulbo Olfatorio	11
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Animales	14
2. Impregnación Cromo-Argéntica	15
3. Análisis Ultraestructural	15
4. Análisis Estadístico	17
RESULTADOS	18
1. Diferenciación Celular	18
2. Formación de los Glomérulos Olfatorios	30
3. Sinaptogénesis en el Bulbo Olfatorio	37
4. Análisis Estadístico	39
a. Proceso de Formación de los Glomérulos Olfatorios	39
b. Proceso de Sinaptogénesis en el Bulbo Olfatorio	42
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Elementos anatómicos que intervienen en la constitución del sistema olfativo en el humano	7
Figura 2.	Epitelio olfatorio en humano adulto	8
Figura 3.	Estructura anatómica e histológica del bulbo olfatorio en humano adulto	10
Figura 4.	Principales conexiones aferentes y eferentes en el bulbo olfatorio en humano adulto	13
Figura 5.	Uniformidad e inmadurez citológica del bulbo olfatorio en ratón E13	19
Figura 6.	Inicio de la laminación tisular del bulbo olfatorio en ratón E15	20
Figura 7.	Inicio de la formación de contactos interneuronales en bulbo olfatorio de ratón E17	21
Figura 8.	Ingreso del nervio olfatorio al bulbo olfatorio en ratón E19	21
Figura 9.	Interacción del nervio olfatorio con neuronas del bulbo olfatorio en ratón E21	23
Figura 10.	Glomérulo en formación en bulbo olfatorio de ratón E21	23
Figura 11.	Crecimiento de prolongaciones neuronales en bulbo olfatorio de ratón P1	24
Figura 12.	Diferenciación laminar del bulbo olfatorio de ratón P3	25
Figura 13.	Contactos sinápticos inmaduros en bulbo olfatorio de ratón P3	26
Figura 14.	Contacto sináptico dendro-dendrítico en bulbo olfatorio de ratón P3	27

Figura 15.	Madurez organizacional del bulbo olfatorio de ratón P5	28
Figura 16.	Citotípia e histotípia del bulbo olfatorio de ratón P7	29
Figura 17.	Proceso de formación de glomérulos en bulbo olfatorio de ratón entre los días E17 y E21 de desarrollo embrionario	31
Figura 18.	Detalles de axones olfatorios de ratón al día P1 al organizarse para formar un glomérulo	32
Figura 19.	Interacción de fibras terminales del nervio olfatorio con prolongaciones gliales en bulbo olfatorio de ratón P3	33
Figura 20.	Interrelación de axones del nervio olfatorio con prolongaciones dendríticas en bulbo olfatorio de ratón P5	33
Figura 21.	Glomérulo olfatorio en ratón P5	34
Figura 22.	Detalles de contactos sinápticos en un glomérulo del bulbo olfatorio de ratón P7	35
Figura 23.	Contactos sinápticos en bulbo olfatorio de ratón P9	36
Figura 24.	Contactos sinápticos axo-dendríticos y dendro-dendríticos en bulbos olfatorios de ratón P7 y P9	38
Figura 25.	Variabilidad de los promedios de las medias de los diámetros de los glomérulos con respecto a la edad	41
Figura 26.	Comparación del aumento en el número de sinapsis dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón de edades postnatales	44
Figura 27.	Comparación porcentual del aumento en el número de sinapsis axo-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón de edades embrionarias y postnatales	46
Figura 28.	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	46

INDICE DE TABLAS

Tabla I	Comparación de los promedios \pm DE del diámetro de los glomérulos olfatorios desde E17 hasta P9, utilizando ANOVA	39
Tabla II	Comparaciones múltiples de los diámetros glomerulares utilizando la Prueba de Tukey	40
Tabla III	Variabilidad en el número de sinapsis dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón en edades postnatal temprana	42
Tabla IV	Comparaciones múltiples de los promedios de las medias en el número de sinapsis dendro-dendríticas utilizando la Prueba de Tukey	43
Tabla V	Variabilidad en el número de sinapsis axo-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón en edades prenatal tardía y postnatal temprana	44
Tabla VI	Comparaciones múltiples de los promedios de las medias en el número de sinapsis axo-dendríticas utilizando la Prueba de Tukey	45

INTRODUCCIÓN

El bulbo olfatorio es una región de gran complejidad estructural, determinada por la existencia abundante de fibras nerviosas olfatorias que provienen de la mucosa olfativa y convergen hacia las dendritas de las células mitrales y células en penacho formando los denominados glomérulos olfatorios, por medio de los cuales ingresa la información que es procesada por las diferentes células del bulbo olfatorio y emerge a través de axones que forman la cintilla olfatoria que se dirige a los centros cerebrales. Es decir que el bulbo olfatorio es un elemento de enlace o de conexión entre la periferia (mucosa olfatoria) y los centros cerebrales superiores. Además, está la presencia de conexiones provenientes del bulbo olfatorio contralateral y de interneuronas que complejizan aún más la organización de esta importante formación encefálica bilateral.

Dada la participación del bulbo olfatorio en diversas afecciones neurológicas ⁽¹⁻¹¹⁾, es nuestro interés profundizar en el conocimiento de la diferenciación neuronal del mismo, para determinar el momento maduracional en la cual cada tipo celular alcanza su máxima diferenciación; esto permitirá proyectar diseños experimentales específicos para cada tipología celular. La composición histológica del bulbo olfatorio es ampliamente conocida, 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, 25) y análisis ultraestructural ⁽²⁶⁻³³⁾.

El sistema olfativo durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano demuestra tener una acentuada plasticidad citológica y una diversidad de respuestas fisiológicas ⁽³⁴⁻³⁶⁾ que lo convierten en uno de los modelos más estudiados para entender los

mecanismos relacionados con el crecimiento y dinamismo neuronal durante los procesos de formación y consolidación del sistema nervioso, al ser una región donde se establecen múltiples interacciones sinápticas desde el epitelio olfatorio, pasando por el bulbo olfatorio hasta la corteza olfatoria ⁽³⁷⁻³⁸⁾. Los axones de las neuronas sensoriales emergen del epitelio olfatorio y atraviesan la base del cráneo a través de la lámina cribosa del hueso etmoides para entrar en el bulbo olfatorio y ubicarse en la capa más superficial del mismo, donde sus terminaciones axónicas contribuyen a la formación de los glomérulos olfatorios o bulbares ⁽³⁹⁾, que son estructuras de aproximadamente 50 a 100 μm de diámetro formadas, además de los axones de las neuronas sensoriales olfatorias, por las dendritas de las principales células de proyección del bulbo como son las células mitrales y las células en penacho, ramificaciones neuronales que interactúan con las terminaciones de las fibras olfatorias para establecer complejas estructuras sinápticas. Participan también en la formación de los glomérulos las células periglomerulares e indirectamente las células granulosas al establecer contactos sinápticos con las células mitrales.

En el humano se ha estimado que en cada glomérulo incide un promedio de 26.000 axones de células olfatorias y que en el humano en cada bulbo pueden existir hasta 2.000 glomérulos, procesándose allí una considerable cantidad de información neuronal que emerge del bulbo olfatorio a través del haz olfatorio ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾. Por otra parte, ha sido reportado que en cada glomérulo intervienen dendritas provenientes de 5 a 25 células mitrales que hacen sinapsis con un elevado número de axones de las neuronas sensoriales olfatorias, siendo uno de los casos de mayor convergencia de información del sistema nervioso, lo cual incrementa la sensibilidad de la señal olfatoria que es enviada, a través del tracto olfatorio, a la corteza piriforme, al hipocampo y a la amígdala, estructuras donde el proceso de señalización es descodificado para producir respuestas olfatorias.

Para que se cumpla el proceso de integración de la información que ingresa y egresa al bulbo olfatorio, intervienen dos tipos celulares principales: las células mitrales y las células

en penacho ^(42, 43), las cuales a través de las estrías olfatorias intermedia y lateral, reciben la información desde las células sensoriales de Schultz de la mucosa olfatoria, la procesan y la transmiten a la corteza olfatoria ⁽⁴⁰⁾. Los axones de las células mitrales y de las células en penacho hacen sinapsis con las células periglomerulares y las células granulosas, interneuronas cuya función es participar en la formación de circuitos reverberantes de retroalimentación negativa y positiva. Las células mitrales por su parte, potencian y modulan su propia actividad sináptica formando sinapsis recíprocas con las dendritas de células inhibitorias como lo son las células granulosas.

A pesar que se ha reportado la existencia de alteraciones del sistema olfatorio en algunas enfermedades fundamentalmente neurológicas y hepáticas, tales como Parkinson, Alzheimer, síndrome de Korsakoff, síndrome de Down, infecciones por VIH, encefalopatía hepática y síndrome de Kallmann ^(2-8, 10, 44-47), son pocos los estudios histológicos y ultraestructurales que existen al respecto y que aportarían información sobre los cambios citológicos que ocurren en estas situaciones patológicas. Esto nos ha motivado a profundizar, experimentalmente, en el estudio del bulbo olfatorio, haciendo énfasis en la etapa de formación o neurogénesis, para tratar de aproximarnos al conocimiento sobre los mecanismos de formación de las conexiones interneuronales y sus procesos de plasticidad en las diferentes etapas del desarrollo del bulbo olfatorio y poder así tener un patrón normal de comparación en caso de estudio de enfermedades con un componente neuropático como las anteriormente mencionadas ⁽⁴⁸⁻⁵³⁾.

Histológicamente se ha considerado que en el bulbo olfatorio después del nacimiento se distinguen seis capas: la del nervio olfatorio, la glomerular, la plexiforme externa, la de las células mitrales, la plexiforme interna y la capa de células granulosas ⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾. Los axones que llegan al bulbo olfatorio desde la periferia hacen contacto, a nivel de los glomérulos olfatorios, con las dendritas de las células mitrales y de las células en penacho. Además, el bulbo olfatorio recibe información desde otras zonas del sistema nervioso central, como son el locus ceruleus, los núcleos del rafe, el núcleo olfatorio anterior y del bulbo olfatorio contralateral. Por su parte, las células de la corteza olfatoria establecen conexiones con el

núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme y la corteza entorrinal lateral. Estas fibras de asociación se distribuyen por todas las áreas de la corteza olfatoria ⁽⁵⁵⁾.

Dentro del conjunto del sistema nervioso central (SNC), el sistema olfativo resulta fascinante por sus particularidades fisiológicas y ultraestructurales que se van modelando y definiendo durante el desarrollo embrionario y postnatal, siendo uno de los modelos más estudiados para entender los mecanismos relacionados con la guía y el crecimiento de las células neuronales, en razón a que desempeña diversas funciones en el establecimiento de las interacciones sinápticas entre el epitelio, el bulbo y la corteza olfatorios. El sistema olfativo permite a los organismos detectar y segregar compuestos químicos volátiles, principalmente orgánicos y de bajo peso molecular, comúnmente llamamos olores. Grandes progresos han sido logrados en los últimos años en el entendimiento de cada paso de la vía olfativa, los cuales van desde el contacto de una molécula odorante con su receptor en el epitelio olfatorio, la decodificación y el procesamiento de esta información en el SNC, hasta la manifestación de sensaciones y el almacenamiento de memoria olfativa.

El objetivo del presente trabajo es estudiar los cambios citológicos que ocurren en el bulbo olfatorio del ratón durante la etapa comprendida entre el desarrollo prenatal tardío y el postnatal temprano, con el fin de lograr una mejor comprensión de la funcionalidad del bulbo olfatorio del ratón. Estos resultados al ser extrapolados al humano, permiten relacionar los trastornos morfológicos con enfermedades, por ejemplo el caso de la displasia citoarquitectural cortical que se correlaciona con la enfermedad epiléptica. Además, analizamos de manera particular los glomérulos olfatorios que constituyen el primer sitio de relevo del sistema nervioso central para el procesamiento de la información olfativa, al establecerse allí las primeras sinapsis entre los axones de las neuronas sensoriales olfatorias del epitelio nasal y las dendritas de las células mitrales y de las células en penacho, además de las prolongaciones neuronales de las células periglomerulares que rodean los glomérulos ^(27-29, 57-59). Ha sido propuesto por algunos autores que estas neuronas periglomerulares modulan y transfieren la información a las

células mitrales, cumpliendo una importante función en la conformación de la información olfativa ⁽⁶⁰⁻⁶⁸⁾.

MARCO TEÓRICO

1. ANATOMÍA DEL SISTEMA OLFATIVO EN HUMANO ADULTO

Todos los organismos vivos, desde los unicelulares más sencillos hasta los pluricelulares más evolucionados, poseen la habilidad de adquirir información del medio externo detectando las señales químicas que éste le ofrece, fenómeno que ha alcanzado su máximo grado de desarrollo en los animales vertebrados ^(69, 70), en los que el sistema olfativo está implicado en funciones esenciales para la supervivencia del animal como son la reproducción, la regulación neuroendocrina, el marcaje del territorio, el reconocimiento de congéneres, la identificación de clanes ⁽⁷¹⁾, así como en la interacción predador-presa y en la búsqueda y selección del alimento ⁽⁷²⁾, ya que en los vertebrados el olfato es el único canal a través del cual el cerebro se conecta de forma directa con el medio ambiente. El circuito neural del olfato está vinculado con los centros neurológicos de la memoria y de las emociones. Esto explica la intensidad emocional que se experimenta al recordar cualquier vivencia asociada al olfato.

La zona receptora para la olfacción se ubica en la parte superior de ambas fosas nasales en el lado opuesto al tabique nasal, en la parte más alta del cornete superior; en el interior de la cavidad craneana se sitúan el bulbo olfatorio, el tracto olfatorio y el área olfatoria primaria, esta última ubicada en la base del cerebro sobre la lámina cribosa del hueso etmoides, por donde ingresan los axones procedentes del epitelio olfatorio constituyendo los nervios olfatorios, denominados Primer Par Craneal ⁽⁷³⁾.

Cada bulbo olfatorio, situado en la base del lóbulo frontal, se adhiere por la parte caudal al hemisferio cerebral. A este nivel los axones de las células mitrales y en penacho que emergen del bulbo olfatorio forman las estrías olfatorias lateral, intermedia y medial que se distribuyen en las áreas olfatorias secundarias o corteza olfatoria ⁽⁷⁴⁾. En esta corteza, además del núcleo olfatorio anterior, se distinguen el tubérculo olfatorio, la corteza prepiriforme, la amígdala olfatoria formada por los núcleos corticales de la amígdala y el área entorrinal que se proyecta al hipocampo; estas tres últimas formaciones constituyen el paleocortex olfatorio. Las aferencias del bulbo olfatorio hacen sinapsis con las neuronas del tubérculo olfatorio, que a su vez envían información al núcleo dorsomedial del tálamo y de allí la información va a la corteza cerebral orbito-frontal, que es la zona cortical involucrada con la percepción consciente del olor ^(40, 74-77). En la corteza prepiriforme se realiza la discriminación olfatoria de los distintos olores. Los núcleos de la amígdala olfatoria son los centros de relevo que conectan la vía olfativa con el hipotálamo y conjuntamente con el área entorrinal, son responsables del componente afectivo de los estímulos del olor y de la regulación de funciones conductuales y neuroendocrinas a través de sus conexiones con el hipotálamo.

En resumen, desde el bulbo olfatorio la información viaja a otras regiones del SNC donde es susceptible de un procesamiento más elaborado. Entre estas regiones cabe destacar la corteza piriforme, a la amígdala y la corteza entorrinal (Fig. 1). Aunque la participación de estas estructuras como relevos olfativos no admite dudas, su función específica no está clara en absoluto. Algunos investigadores han propuesto que la amígdala es importante para conferir propiedades afectivas o aversivas a los olores, mientras que la corteza entorrinal parece contribuir a ciertos aspectos de nuestra memoria olfativa ^(42, 78).

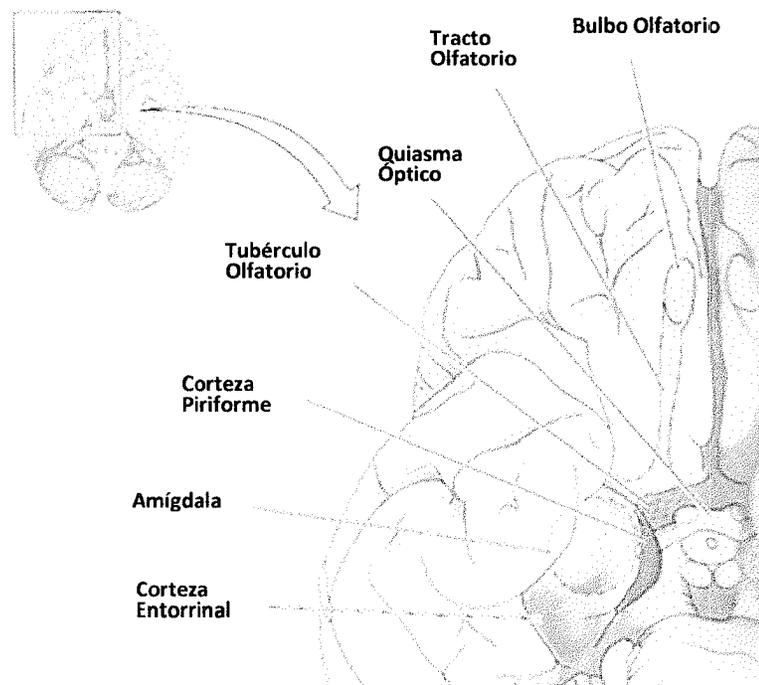


Figura 1. Elementos anatómicos que intervienen en la constitución del sistema olfativo en el humano. (Obtenida de http://kizzurblood.blogspot.com/2012/07/9_10.html).

2. ORGANIZACIÓN DEL EPITELIO OLFATORIO EN HUMANO ADULTO

El neuroepitelio olfatorio está constituido por las neuronas sensoriales olfatorias, las células de sostén y las glándulas de Bowman, que en conjunto se conocen como zona receptora superficial del olfato y está situada en la parte superior de la cavidad nasal, ocupando aproximadamente un área de $2,5 \text{ cm}^2$. En la parte interna de la mucosa olfatoria se encuentra el epitelio olfatorio basal, el cual está formado por células basales capaces de dividirse mitóticamente para generar *in situ* neuronas sensoriales olfatorias^(45, 73), ya que al igual que otros epitelios, la renovación celular persiste a través de la vida adulta que permiten reemplazar las neuronas sensoriales olfatorias, cuyo período de vida es de semanas a meses.

Las neuronas sensoriales olfatorias son células bipolares en las cuales el elemento dendrítico se dirige hacia la superficie del tejido y termina en una especie de botón o protuberancia a partir del cual se proyectan los cilios olfatorios hacia la mucosa que reviste la superficie interior de la cavidad nasal. Dispersas entre las células olfatorias se ubican las glándulas de Bowman, responsables de la producción y de la secreción de sustancia mucosa en la superficie de la membrana olfatoria. Los cilios están embebidos en esa sustancia mucosa, de manera que las moléculas olorosas deben disolverse primero en dicha sustancia para luego unirse a las proteínas receptoras de olor, localizadas en estos cilios. De la porción apical de cada neurona olfatoria se proyecta un fino axón y el conjunto de estos axones conforman el nervio sensitivo olfatorio es el primero y más corto de los nervios craneales o Pares Craneales (Fig. 2).

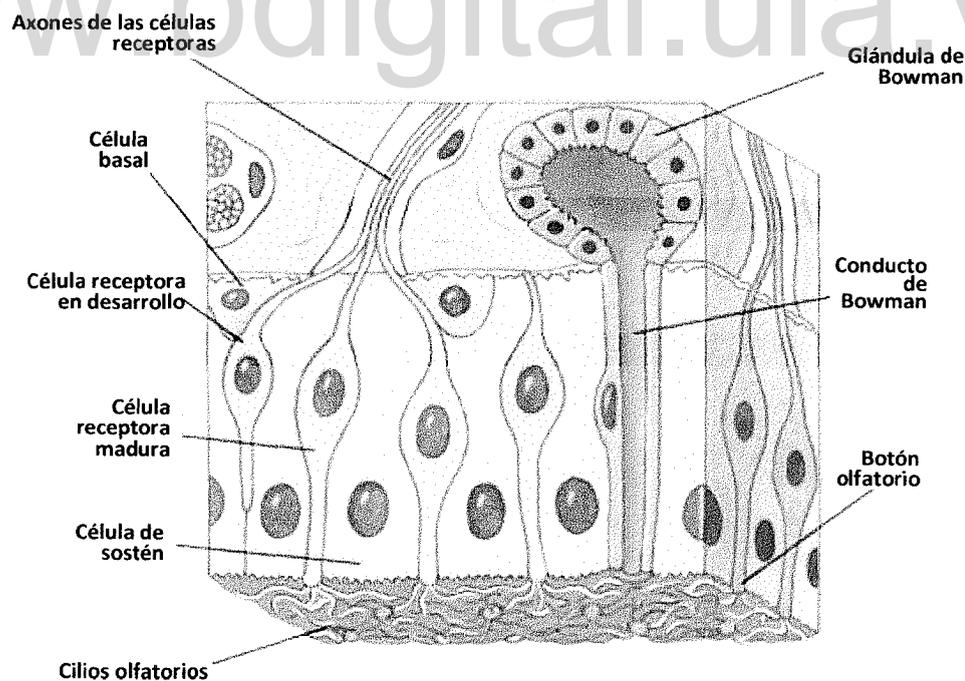


Figura 2. Epitelio olfatorio en humano adulto. (Obtenida de <http://www.uv.es/ramo/quimio/OLFATOVert.pdf>).

El nervio olfatorio, pasa a través de las perforaciones de la lámina cribosa del hueso etmoides para llegar a los bulbos olfatorios, donde establece sinapsis, a nivel de los glomérulos con las dendritas de las células mitrales y de las células en penacho; del bulbo olfatorio sale la información a través de los tractos olfatorios ^(48, 79). El nervio olfatorio es el responsable de conducir los impulsos olfativos desde la mucosa nasal hasta SNC, siendo clasificado como fibras aferentes viscerales especializadas ⁽³¹⁾.

3. ANATOMÍA DEL BULBO OLFATORIO EN HUMANO ADULTO

El bulbo olfatorio es una pequeña masa de tejido nervioso, alargada en sentido anteroposterior y aplanada en sentido cráneo-caudal, de un tamaño aproximado en el humano de 9 mm por 4 mm, que descansa sobre la lámina cribosa del etmoides, hueso que separa la cavidad craneal de la cavidad nasal ⁽⁴⁰⁾.

Los nervios olfatorios pasan por los orificios que perforan la lámina cribosa y llegan al bulbo olfatorio donde terminan estableciendo contacto con las dendritas de las principales células de proyección del bulbo que son las células mitrales y las células en penacho, formando los glomérulos, que son formaciones esferoidales de aproximadamente 50 a 100 μm de diámetro en humano y 32,48 a 60,32 μm en ratón (Fig. 3) ^(31, 76).

En cada glomérulo, un elevado número de axones de las neuronas sensoriales olfatorias hacen sinapsis con las dendritas de 5 a 25 células mitrales, siendo así uno de los casos más extremos de convergencia del sistema nervioso. Fisiológicamente, la convergencia que se produce en el ámbito de las células mitrales y de las células en penacho, incrementa la sensibilidad de la señal olfatoria enviada al cerebro. El mensaje es así transmitido, directamente a través del tracto nervioso olfatorio a las estructuras más altas del SNC que incluyen la corteza piriforme, el hipocampo y la amígdala, donde el

proceso de señalización es descodificado y donde ocurre la interpretación y se producen las respuestas olfatorias.

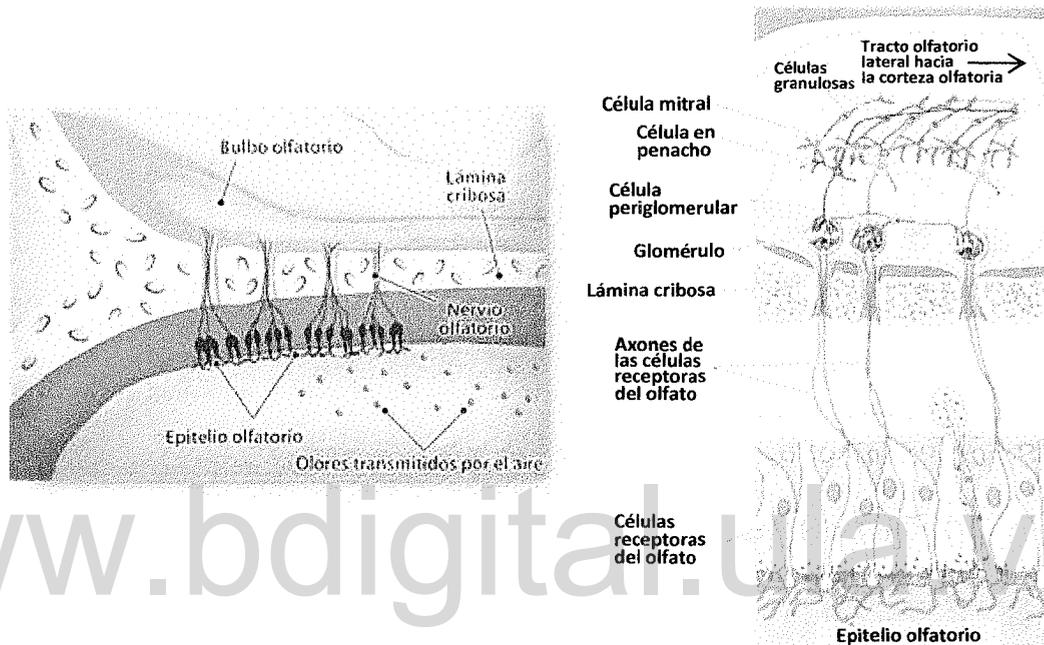


Figura 3. Estructura anatómica e histológica del bulbo olfatorio en humano adulto. (Obtenida de <http://www.uv.es/ramo/quimio/OLFATOVert.pdf>).

4. ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL BULBO OLFATORIO

Desde el punto de vista histológico, el bulbo olfatorio se compone de tres capas concéntricas: superficial, media y profunda. La capa superficial está formada por las fibras nerviosas de los nervios olfatorios. La capa media está constituida en la zona más externa por pequeñas masas esféricas denominadas glomérulos olfatorios y en la zona más profunda se encuentran las células principales del bulbo olfatorio y neuronas secundarias o interneuronas. La capa profunda está formada por fibras nerviosas que salen del bulbo olfatorio ^(39, 80, 81).

En el bulbo olfatorio se distinguen, a partir de la región periférica, la capa de fibras nerviosas olfatorias, la capa glomerular, la capa plexiforme y granular externa, la capa de células mitrales, la capa granular interna y la capa de fibras de la cintilla olfatoria (Fig. 3). Esta disposición histológica está determinada por la distribución del nervio olfatorio al ingresar al bulbo, la disposición de los axones emergentes del bulbo que forman la cintilla olfatoria y por la ubicación de las diferentes neuronas presentes en este tejido y que son: (a) las células mitrales, neuronas de diámetro grande, con amplio citoplasma y que forman una capa de una o de dos células; (b) las células en penacho, de tamaño más pequeño que las mitrales, localizadas desde el borde periférico de la capa de células mitrales hasta el límite interno de la capa de los glomérulos, siendo de mayor tamaño las que se encuentran más próximas a las células mitrales y van disminuyendo en dimensión hasta aproximarse a la capa glomerular, sitio donde se encuentran las células en penacho más pequeñas; (c) las células granulosas internas, son neuronas pequeñas, redondeadas y de citoplasma muy reducido; y (d) las células periglomerulares, son pequeñas neuronas que se sitúan en proximidad o en el interior de los glomérulos. Estas células periglomerulares conjuntamente con las células en penacho más pequeñas y más externas forman lo que los clásicos denominaban capa granulosa externa del bulbo olfatorio ^(54, 55, 82).

5. FUNCIONALIDAD DEL BULBO OLFATORIO

Los axones de las neuronas sensoriales del bulbo olfatorio se agrupan en la capa superficial de éste, a manera de estructuras esféricas denominadas glomérulos ⁽³⁹⁾. Cada bulbo olfatorio posee una organización topográfica diferente de los glomérulos; es decir, que un glomérulo o un grupo determinado de ellos recibe información de un único tipo de receptor y se ha demostrado que los axones de las neuronas que expresan el mismo receptor de moléculas odorantes convergen con extraordinaria precisión en su glomérulo específico, pudiendo proyectarse además a pocos glomérulos vecinos ⁽⁸³⁾.

Este concepto de convergencia es consistente con lo ampliamente aceptado sobre codificación olfativa, en la cual una combinación particular de glomérulos activados, establece una representación espacial informando al cerebro sobre lo que se está oliendo ⁽⁸⁴⁾. Se generan así los "mapas de olor", en los cuales se considera a los glomérulos olfatorios como módulos estructurales y funcionales ⁽⁸⁵⁾.

En los glomérulos olfatorios se establecen las sinapsis de las fibras del nervio olfatorio con las dendritas de las células mitrales y en penacho, las cuales también tienen importante función en el fenómeno de la convergencia de la información, ya que cada una de ellas recibe estimulación de un único glomérulo ⁽⁴³⁾. Estas neuronas a su vez, envían colaterales que contactan con las dendritas de las células granulosas bulbares y con interneuronas como son las neuronas periglomerulares, cuya función es formar circuitos reverberantes de retroalimentación negativa y positiva; de manera que las células mitrales modulan su propia labor, mediante la activación de las células granulosas, que le son inhibitorias ^(44,45, 84).

Los axones de las células mitrales y en penacho de cada bulbo se unen para formar los tractos olfatorios (Fig. 4). Esta estructura lleva la información de manera ipsilateral a un amplio número de áreas cerebrales dentro de la superficie orbital posterior del lóbulo frontal y la superficie dorsomedial del lóbulo temporal ⁽³⁷⁾. Las proyecciones procedentes de estructuras primarias convergen en la región denominada corteza olfatoria secundaria, que comprende la corteza orbitofrontal, el subnúcleo adicional de la amígdala, el hipotálamo, la ínsula, el tálamo dorsomedial y el hipocampo ⁽³⁷⁾.

Por su parte, la corteza piriforme aparece involucrada en la memoria y reconocimiento de los olores; la corteza entorrinal juega un rol en la codificación de la intensidad de la molécula odorante ⁽⁷⁹⁾; el hipocampo y la amígdala son activados durante la discriminación, identificación y memoria olfativas ⁽³⁹⁾. La corteza orbitofrontal, que es

el principal receptor de las proyecciones olfatorias vía directa desde la corteza olfatoria primaria y vía indirecta desde el núcleo dorso-medial del tálamo ^(29, 82).

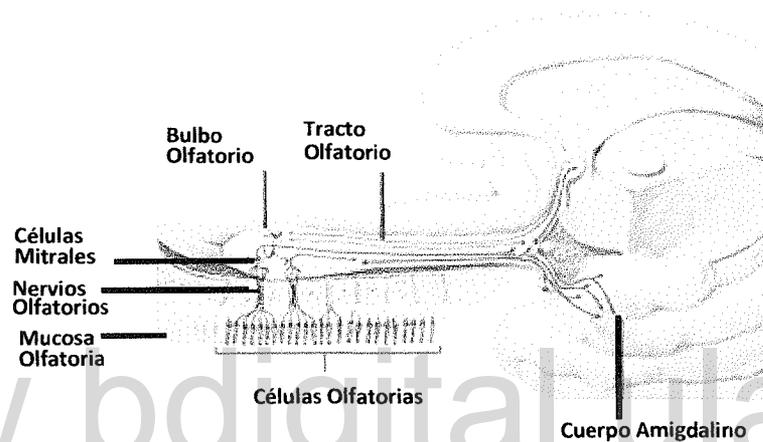


Figura 4. Principales conexiones aferentes y eferentes en el bulbo olfatorio en humano adulto. Obtenida de http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/14_vias_aferentes_archivos/Page384.htm

Es importante destacar, que la función olfativa involucra una compleja y extensa red neuronal, por lo que dichas funciones no son exclusivas de cada estructura neuronal sino del conjunto de ellas. Además, se considera que la información olfativa está basada en dos maneras principales de procesamiento: un procesamiento en serie con la participación sucesiva de las áreas olfatorias primaria y secundaria, y un procesamiento paralelo (hemisferio derecho versus hemisferio izquierdo), donde las estructuras en el hemisferio derecho se encuentran más involucradas en los procesos de memoria, mientras que las del hemisferio izquierdo lo están en los procesos emocionales ⁽⁸⁶⁾.

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES

El estudio fue realizado con ratones de la cepa Naval Medical Research Institute (NMRI), para estudiar las células del bulbo olfatorio, suministrados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes. Los animales seleccionados para el estudio, fueron tratados de acuerdo a la Reglamentación del Comité de Bioética del referido Bioterio, enmarcada en las 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 (FONACIT-Caracas, Venezuela) y por el NIH (National Institute of Health-USA)^(87, 88).

Se utilizaron embriones (E) de ratones de 13, 15, 17, 19 y 21 días obtenidos de dos hembras gestadas por cada edad y cinco ratones de cada una de las siguientes edades postnatal (P): 0, 1, 3, 5, 7 y 9 días. Los ratones fueron anestesiados con Ketamina^R a una dosis de 240 mg/Kg-peso. A las hembras de ratones con el tiempo de gestación programado, 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 fueron separados del resto del encéfalo y un bulbo por cada una de las edades prenatal y postnatal estudiadas fue fijado inmediatamente en solución cromante para ser analizados con el método cromo-argéntico de Golgi; mientras que el otro bulbo de cada una de las edades, fue fijado en mezcla 3:3 para el estudio ultraestructural.

2. IMPREGNACIÓN CROMO-ARGÉNTICA

Para la impregnación cromo-argéntica los bulbos olfatorios fueron transferidos a la mezcla cromante, utilizando la variación a este método conocida como Golgi 44^(54, 89-91), la cual fue preparada en el momento previo a ser utilizada y que está compuesta por 44 ml de solución acuosa de dicromato de sodio al 2%, 2 ml de glutaraldehído al 50%, 3ml de formaldehído al 37% y 1 ml de ácido acético glacial. Los tejidos fueron fijados durante un tiempo promedio de 24h, después del cual se lavaron con abundante agua destilada y se incubaron en una solución acuosa de nitrato de plata al 1,5% durante un mínimo de 16h.

Después, los bulbos olfatorios fueron lavados varias veces con agua destilada y sumergidos en alcohol isopropílico al 80%. Se hicieron cortes de un espesor promedio de 50 μm utilizando un micrótomo Sorvall JB-4. Se continuó la deshidratación del tejido utilizando alcohol isopropílico al 90% y al 100% y se clarificaron con xilol. La observación se hizo a través de un microscopio fotónico Polyvar Reichert Jung, utilizando un sistema fotográfico con digitalización incorporada.

3. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL

Para el análisis ultraestructural los bulbos olfatorios, inmediatamente después de ser extraídos, fueron sumergidos en mezcla fijadora 3:3 (glutaraldehído al 3% más formaldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3)⁽⁹²⁾, a 4°C y seccionados en bloques de aproximadamente 3 mm³, condiciones en las cuales fueron mantenidos durante 12h, luego fueron lavados con abundante tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3, para después ser postfijados, durante 18h en tetraóxido de osmio al 1% preparado en la misma solución tampón. Luego se lavaron nuevamente en solución tampón y se inició la deshidratación y la infiltración epoxídica del tejido, de acuerdo a los siguientes esquemas:

- Proceso de Deshidratación:

Alcohol Etílico al 30%	10 min
Alcohol Etílico al 50%	10 min
Alcohol Etílico al 80%	10 min
Alcohol Etílico al 100%	20 min
Alcohol Etílico al 100%	30 min
Alcohol Etílico al 100% + Oxido de Propileno al 100%	20 min
Oxido de Propileno al 100%	20 min

- Proceso de Infiltración Epoxídica:

Oxido de Propileno al 100% : Resina Epoxídica en proporción 4:1	30 min
Oxido de Propileno al 100% : Resina Epoxídica en proporción 3:2	30 min
Oxido de Propileno al 100% : Resina Epoxídica en proporción 2:3	60 min
Oxido de Propileno al 100% : Resina Epoxídica en proporción 1:4	60 min

Posteriormente, el material fue incluido en resina epoxídica y se llevó a una estufa, a 60° C durante 48h, para garantizar la polimerización de la resina, lo cual permitió realizar cortes gruesos de 1 a 2 μm de espesor y cortes ultrafinos de 90 nm de espesor, para ser observados respectivamente, con microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión, después de haber sido contrastados los cortes gruesos con p-fenil-endiamina y los cortes ultrafinos con acetato de uranilo y citrato de plomo⁽⁹³⁻⁹⁵⁾. Los cortes fueron realizados utilizando un Ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B y observados a través de un microscopio fotónico Polyvar Reichert Jung,

con cámara fotográfica Infinity digitalizada y de un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Se realizaron mediciones del diámetro de los glomérulos olfatorios y los resultados se analizaron aplicando el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) ⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾ para valorar las diferencias estadísticamente significativas en los promedios de dichos diámetros. Además, se hicieron comparaciones con la prueba de Tukey, para ello fue utilizado el programa estadístico SPSS versión 15. Los valores obtenidos se expresaron en promedio de media \pm desviación estándar (Promedio \pm DE), tomando el 95% como índice de confiabilidad estadística ($p < 0,05$). Se compararon los resultados de los análisis estadísticos para determinar si existía o no relación entre el diámetro de los glomérulos con el incremento de las edades de los ratones estudiados.
- 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-dendriticas como dendro-dendríticas. Para valorar las diferencias estadísticamente significativas se utilizó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) 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 \pm Desviación Estándar (Promedio \pm 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

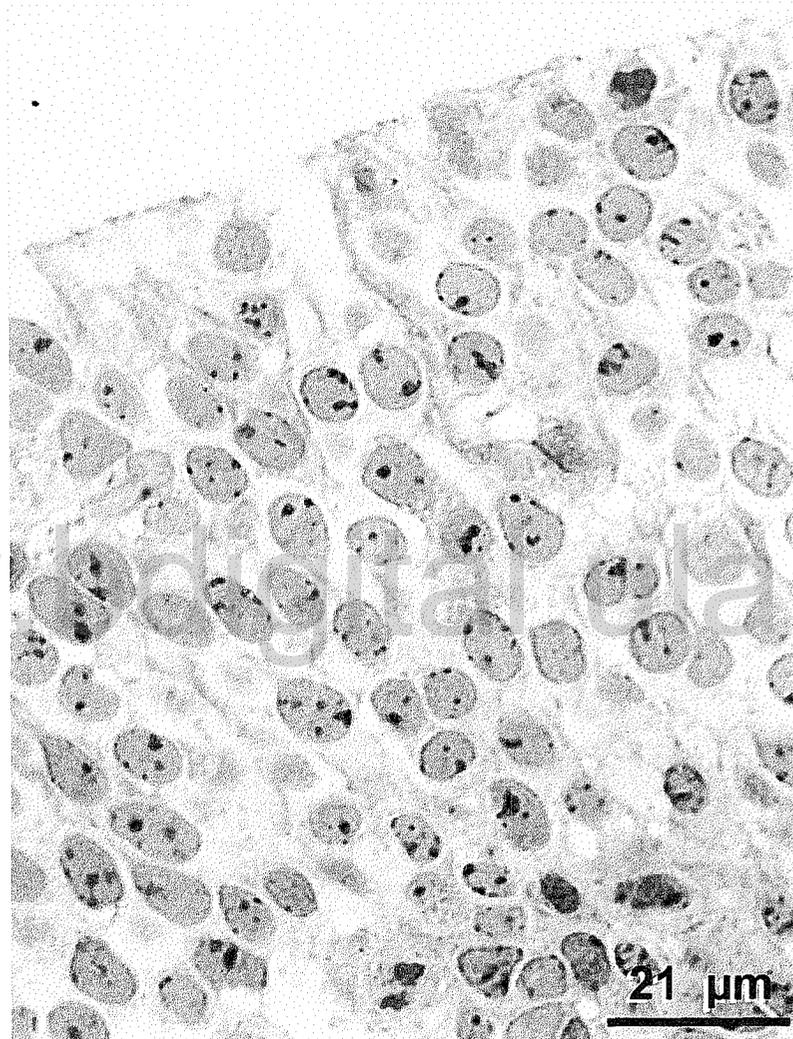
1. DIFERENCIACIÓN CELULAR

El período seleccionado para la realización del análisis del desarrollo del bulbo olfatorio comprende el lapso de los dieciocho días más próximos al momento del nacimiento; es decir, desde el día 13 de gestación hasta el día 9 de edad postnatal y que es conocido como Períodos Prenatal Tardío (entre E13 y E21) y Postnatal Temprano (entre P0 y P9).

El día E13 de desarrollo embrionario toda la población celular del bulbo olfatorio está inmaduro y constituido predominantemente por un solo tipo celular. Son células redondeadas o ligeramente ovaladas, con cuerpos pequeños aun cuando puede observarse una discreta variabilidad de tamaño entre ellos. Presentan uniformidad citológica determinada por un citoplasma electrón transparente, con escasas organelas y un núcleo grande. Este conglomerado de células neuronales inmaduras está distribuido sin ningún patrón organizativo en todo el espesor del tejido bulbar (Fig. 5).

El bulbo olfatorio de ratón el día E15 muestra su histoarquitectura característica. Presenta un límite externo regular y la población celular inicia la diferenciación morfológica, mostrando cierto grado de laminación. Se distinguen 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 (Fig. 6).



Figuras 5. Uniformidad e inmadurez citológica del bulbo olfatorio en ratón E13. En el bulbo olfatorio de ratón E13 destaca la uniformidad e inmadurez citológica en todo el espesor del tejido. Son células de núcleo voluminoso y un citoplasma muy claro con organelas no bien diferenciadas.

Al día E17, se distinguen prolongaciones neuronales inmaduras entre los cuerpos celulares, en las cuales es posible observar formaciones vesiculares de diferentes tamaños, algunas de ellas semejantes a vesículas sinápticas. Además, destaca la

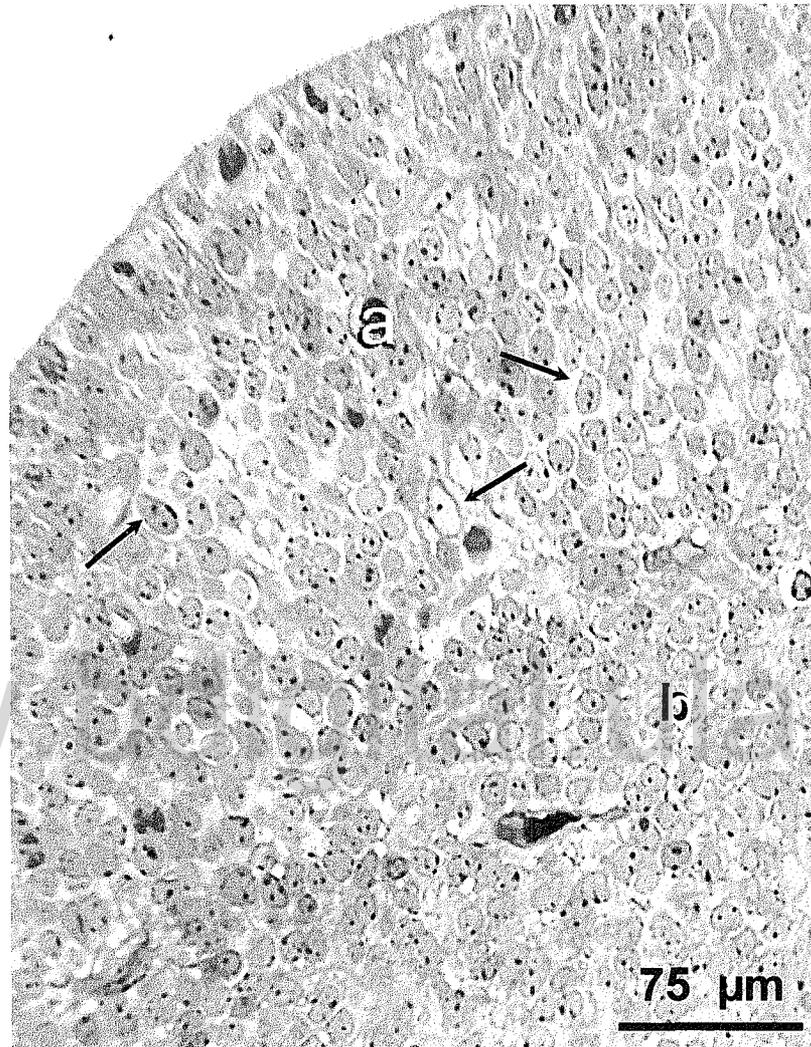


Figura 6. Inicio de la laminación tisular del bulbo olfatorio en ratón E15. Sección de bulbo olfatorio de ratón E15 que permite observar el inicio de la laminación tisular. La parte periférica (a) está formada por células de morfología variada, algunas con amplio citoplasma (flechas). En la zona interna (b) las células tienden a ser redondeadas con núcleos grandes y escaso citoplasma.

escasa presencia de material electrón denso adosado a la cara interna de la membrana de las prolongaciones celulares (Fig. 7), que puede ser interpretado como el primer contacto intermembranoso y por tanto, el inicio del proceso de formación sináptica en la especie estudiada.

A partir de la edad embrionaria E19 ya se ha perdido la regularidad y uniformidad del borde periférico del tejido bulbar debido a la presencia de las fibras del nervio olfatorio, que previamente a la edad E17 inician su ingreso al bulbo olfatorio 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 (Fig. 8). A esta edad la parte más cortical del bulbo olfatorio se observa diferenciada en dos segmentos, uno externo donde la celularidad disminuye de manera importante para iniciar su transformación en una verdadera capa plexiforme

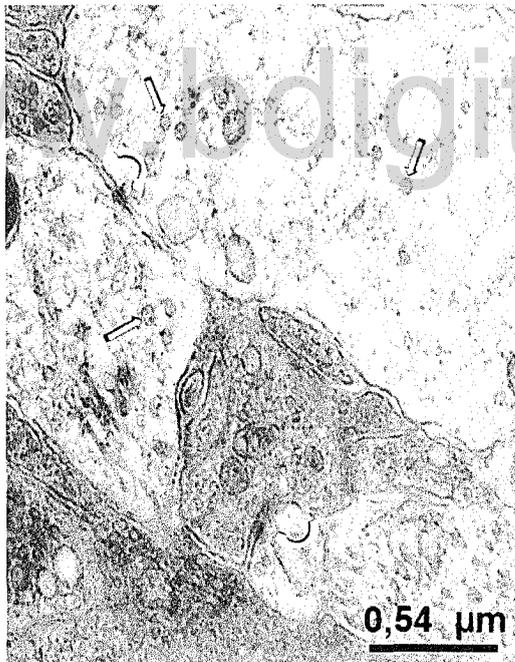


Figura 7. Inicio de la formación de contactos interneuronales en bulbo olfatorio de ratón E17. Prolongaciones neuronales observadas en la región plexiforme del bulbo olfatorio de ratón E17, en cuyo interior destaca la presencia de formaciones vesiculares (flechas rectas). En algunos sitios de contacto entre las prolongaciones se observa depósito de material electrón denso (flechas curvas).

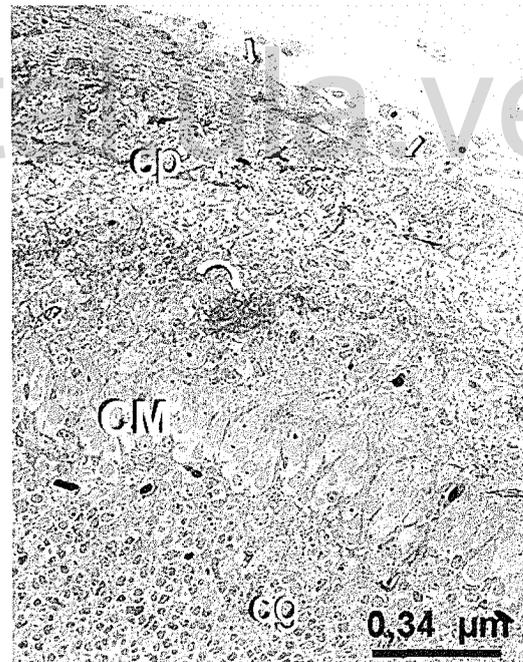


Figura 8. Ingreso del nervio olfatorio al bulbo olfatorio en ratón E19. Se observa la irregularidad de la periferia del bulbo olfatorio, debido al ingreso de las fibras del nervio olfatorio (flechas cortas) a la capa plexiforme (cp), donde puede observarse una incipiente formación glomerular (flecha 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.

y un segmento 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 celular conformada por interneuronas. Por debajo de esta capa se observa la presencia de grandes células redondeadas, 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 de células granulosas (Fig. 8).

El 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 bulbar, el tejido se hace más laxo y se observa un aumento en la cantidad de formaciones glomerulares, a pesar 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. 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 células periglomerulares, las interneuronas y las prolongaciones gliales. 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 (Figs. 9 y 10).

El 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 debido al aumento de la población celular constituida por cuerpos neuronales con escaso citoplasma y núcleo voluminoso, con prolongaciones de trayectos cortos, orientados radialmente.

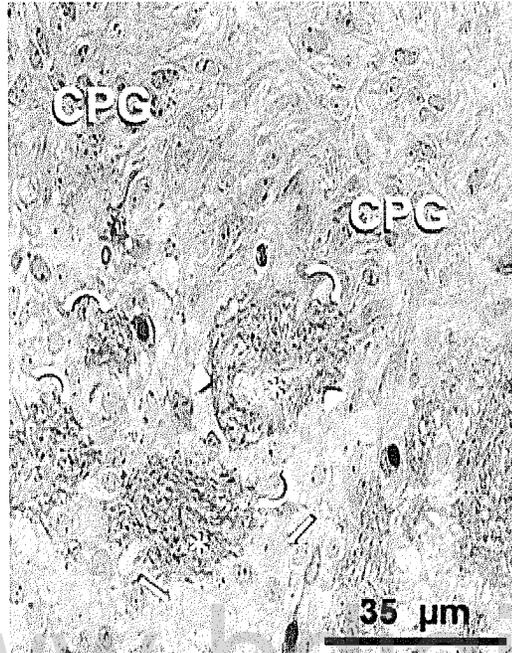


Figura 9. Interacción del nervio olfatorio con neuronas del bulbo olfatorio en ratón E21. Detalles de la interacción que se establece entre las fibras del nervio olfatorio (cabezas de flecha) con los elementos neuronales propios del bulbo olfatorio (asteriscos), para formar los glomérulos (flechas curvas). En proximidad a estos se identifican cuerpos de células en penacho (flechas rectas). CPG, conjunto de células periglomerulares.

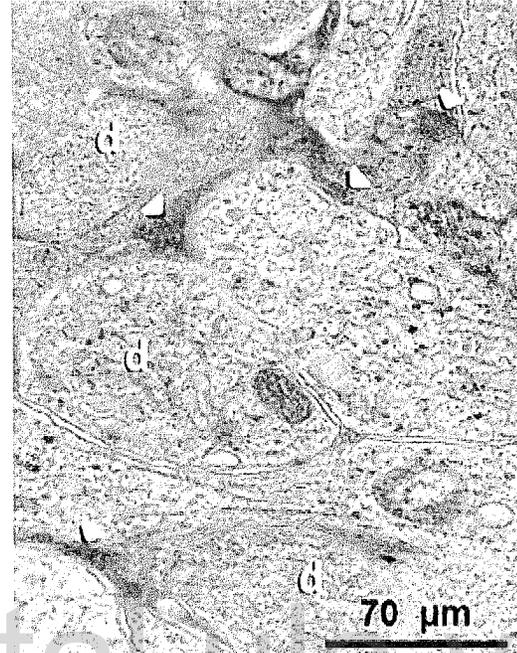


Figura 10. Glomérulo en formación en bulbo olfatorio de ratón E21. Segmento de un glomérulo en formación ubicado en la zona periférica del bulbo olfatorio, donde se observan entremezcladas prolongaciones electrón densas pertenecientes a fibras del nervio olfatorio (cabezas de flecha) entremezcladas con procesos neuronales de mediana densidad electrónica que corresponden a dendritas (d) de células mitrales y células en penacho.

Al observar el bulbo olfatorio de ratones P1 llama la atención la presencia de escasas prolongaciones neuronales largas y 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 la disminución de 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 células en penacho y algunas células mitrales que aún no han alcanzado su topotípia (Fig. 11).

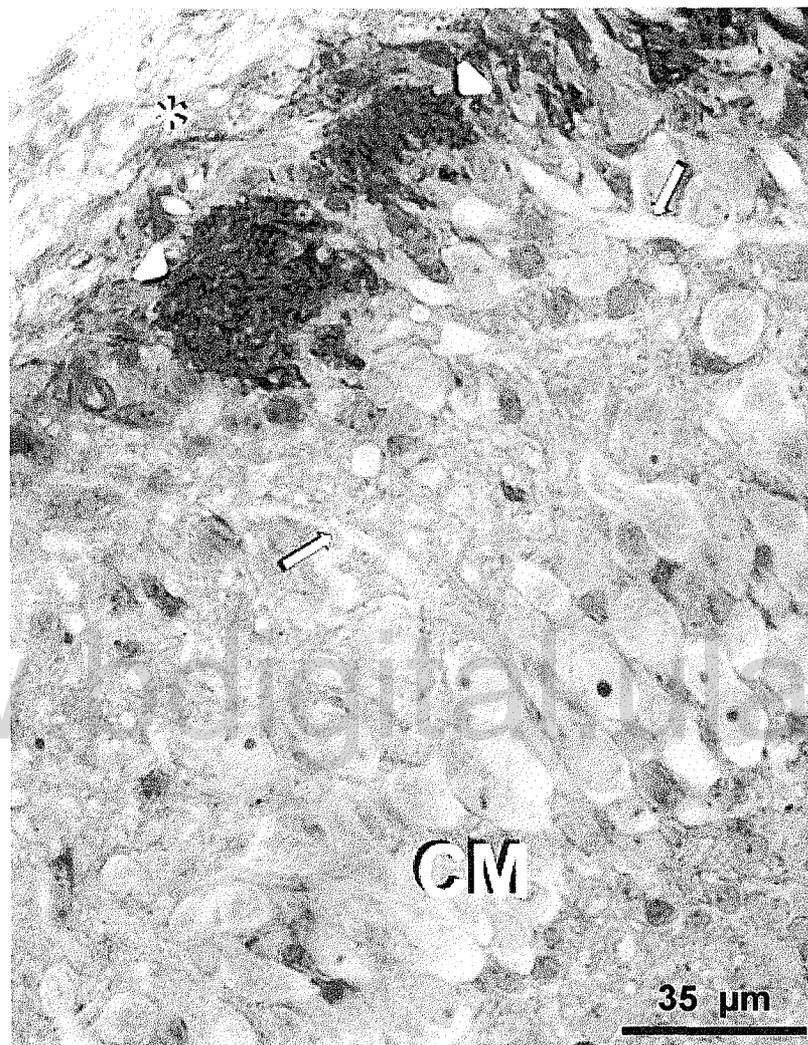


Figura 11. Crecimiento de prolongaciones neuronales en bulbo olfatorio de ratón P1. Al día P1 en el bulbo olfatorio de ratón se observan trayectos de prolongaciones neuronales (asterisco) en la parte más periférica e inmediatamente hacia el interior se ven formaciones glomerulares (cabezas de flecha) hasta donde llegan prolongaciones dendríticas de las células mitrales (flechas rectas). CM, células mitrales.

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 estas estructuras dendríticas (Fig. 12). Es de destacar, que a

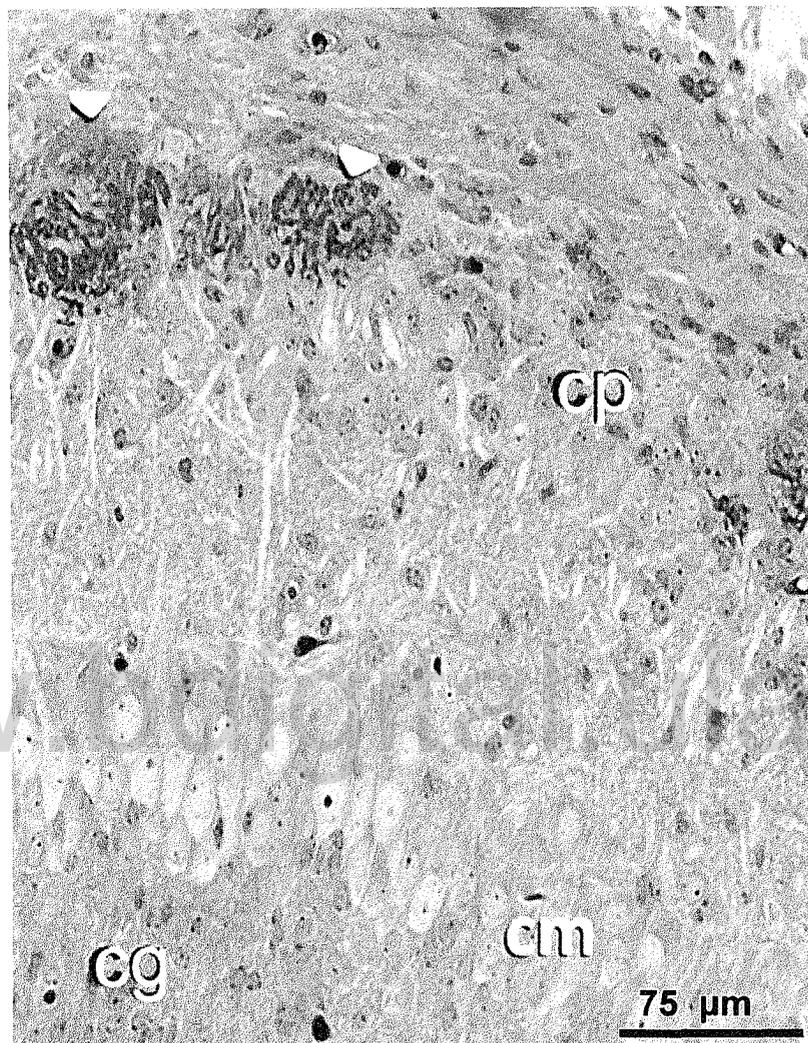


Figura 12. Diferenciación laminar del bulbo olfatorio de ratón P3. A esta edad se observan bien definidas la capa plexiforme (cp), la capa de células mitrales (cm) y la capa de células granulosas (cg). En la capa plexiforme se visualizan dos formaciones glomerulares (cabezas de flecha), sitio hasta donde llegan las ramificaciones dendríticas de las células mitrales y de las células en penacho.

la edad P3, en la zona periférica se pueden observar trayectos descendientes del nervio olfatorio, que al ramificarse para formar los glómerulos se direccionan en sentido transversal y/u oblicuo. Sin embargo, más profundamente ya se visualizan zonas de neuropila donde las prolongaciones neuronales poseen en su interior vesículas del tipo

sináptico (Fig. 13), presentando algunas terminaciones neuronales engrosamientos de membrana y en oportunidades se distinguen contactos sinápticos dendro-dendríticos en formación (Fig. 14).

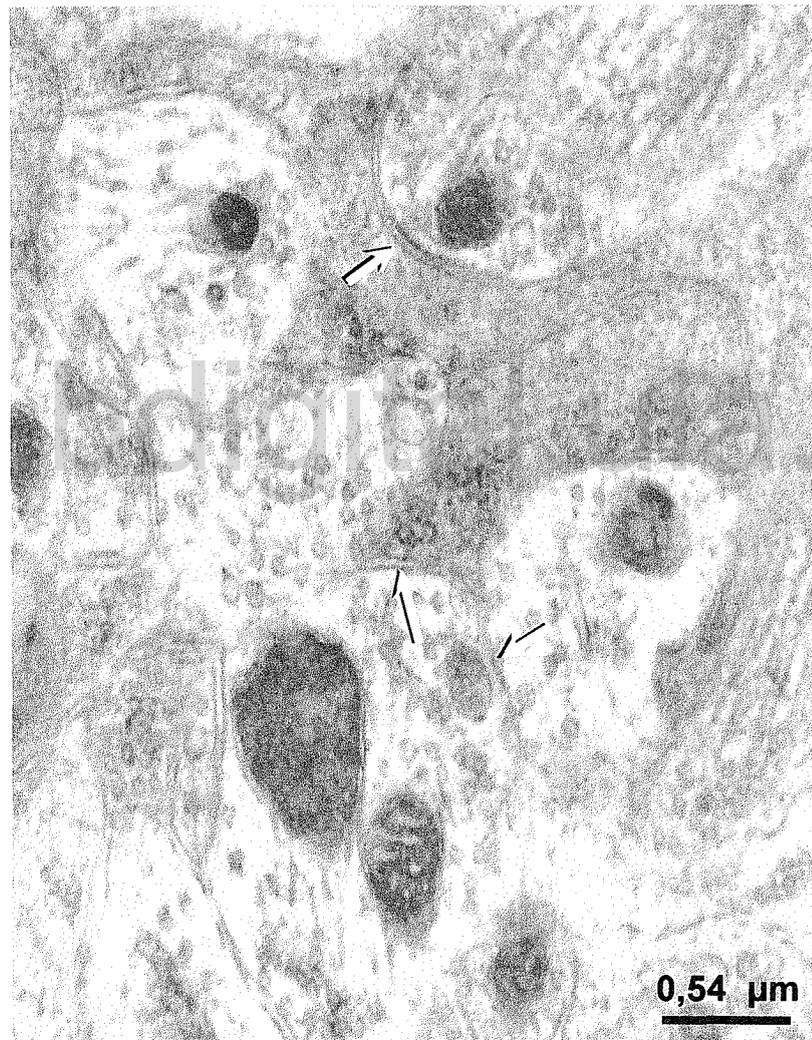


Figura 13. Contactos sinápticos inmaduros en bulbo olfatorio de ratón P3. Detalle de prolongaciones neuronales con vesículas sinápticas en bulbo olfatorio de ratón P3. Las flechas señalan el inicio, en algunos sitios, de los engrosamientos de la membrana neuronal. Las prolongaciones más electrón densas corresponden a ramificaciones del nervio olfatorio (olf) y las menos electrón densas a dendritas (d) de células mitrales y en penacho.

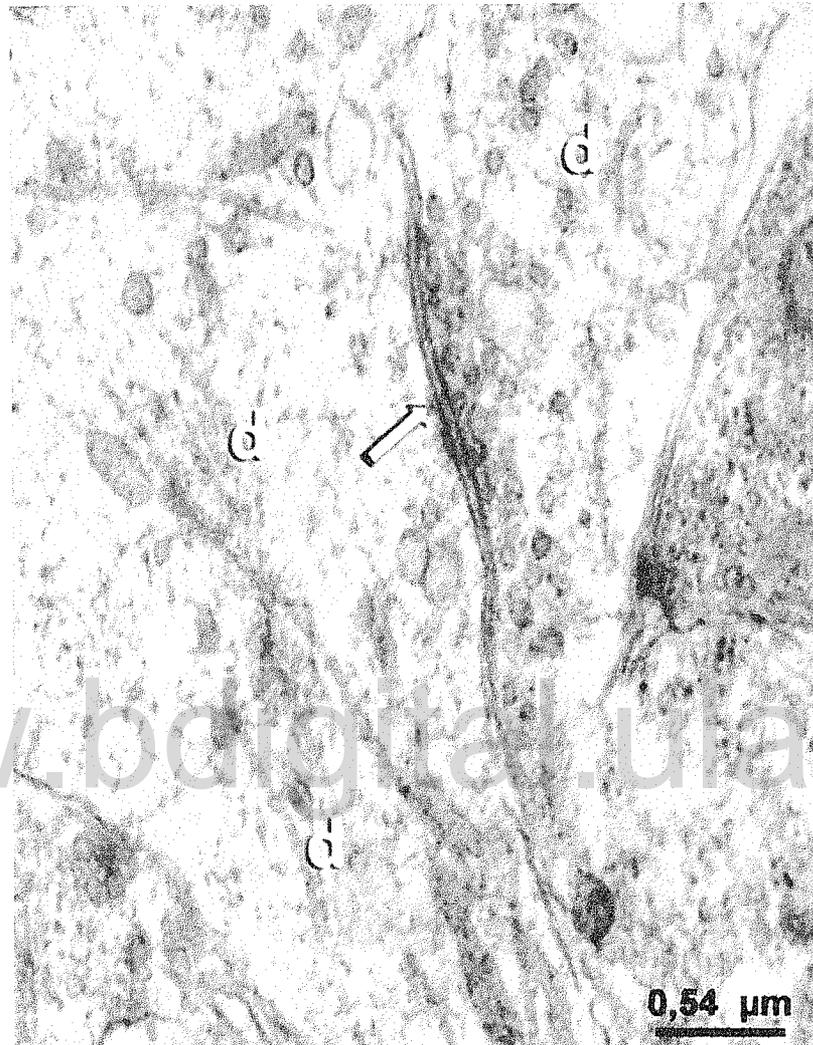


Figura 14. Contacto sináptico dendro-dendrítico en bulbo olfatorio de ratón P3. Conjunto de prolongaciones dendríticas (d) en el bulbo olfatorio de ratón P3. Entre dos de estas prolongaciones se observa la fase inicial en la formación de un contacto dendro-dendrítico (flecha).

En el día P5, el bulbo olfatorio de la especie estudiada ya tiene una organización tisular definida y las células presentan un alto porcentaje de las características que las identifican. Las células periglomerulares ubicadas en proximidad a los glomérulos, son células de baja densidad electrónica, con escaso citoplasma y núcleo grande. Las células en penacho de cuerpo de tamaño variable, núcleo voluminoso y citoplasma de baja densidad electrónica, se localizan en la mitad inferior de la capa plexiforme. Al

aumentar el bulbo olfatorio de tamaño, las células mitrales modifican su distribución multilaminar y al día P5 sus cuerpos forman una monocapa o una bicapa celular y 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

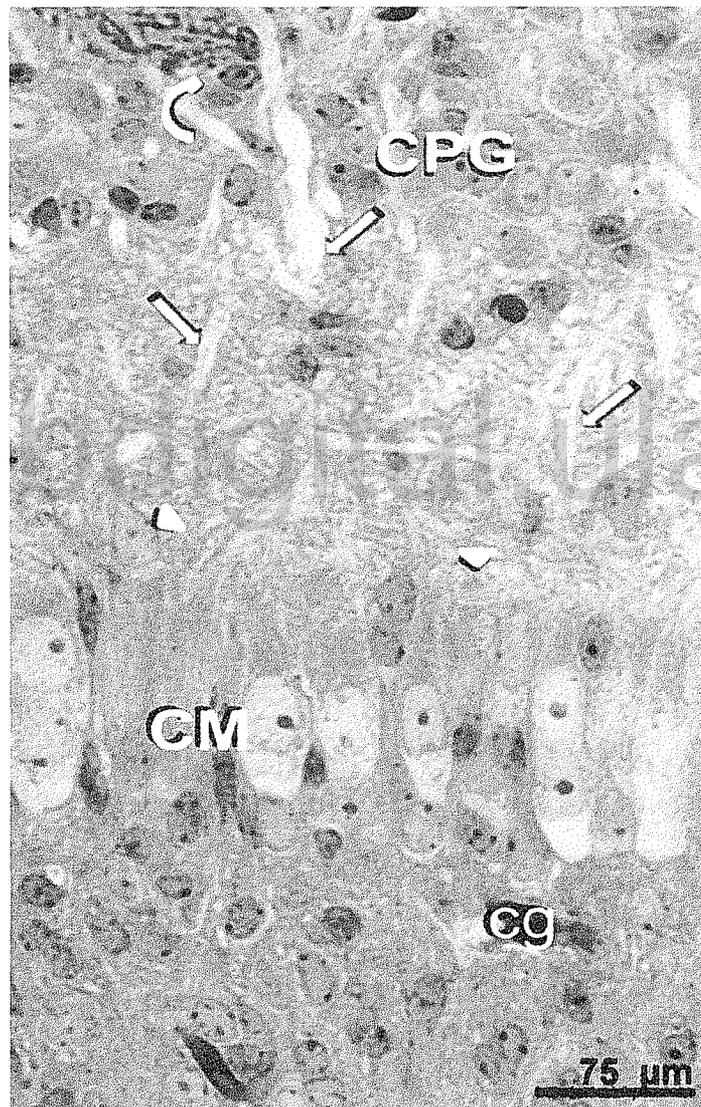


Figura 15. Madurez organizacional del bulbo olfatorio de ratón P5. Al día P5 el bulbo olfatorio de ratón muestra características de madurez organizacional. Se observan los trayectos claros de las dendritas (flechas rectas) de las células mitrales (CM) y entre ellas células periglomerulares (CPG) y células en penacho (cabezas de flecha). Un segmento de un glomérulo está señalado con la flecha curva. cg, capa de células granulosas.

de la capa plexiforme (Fig. 15), que al integrarse conjuntamente con las fibras olfatorias y las dendritas de las células en penacho, participan en la formación de los glomérulos (Figs. 15). Distribuidas en todo el espesor de la capa plexiforme y entre los cuerpos de las células mitrales, es frecuente observar interneuronas.

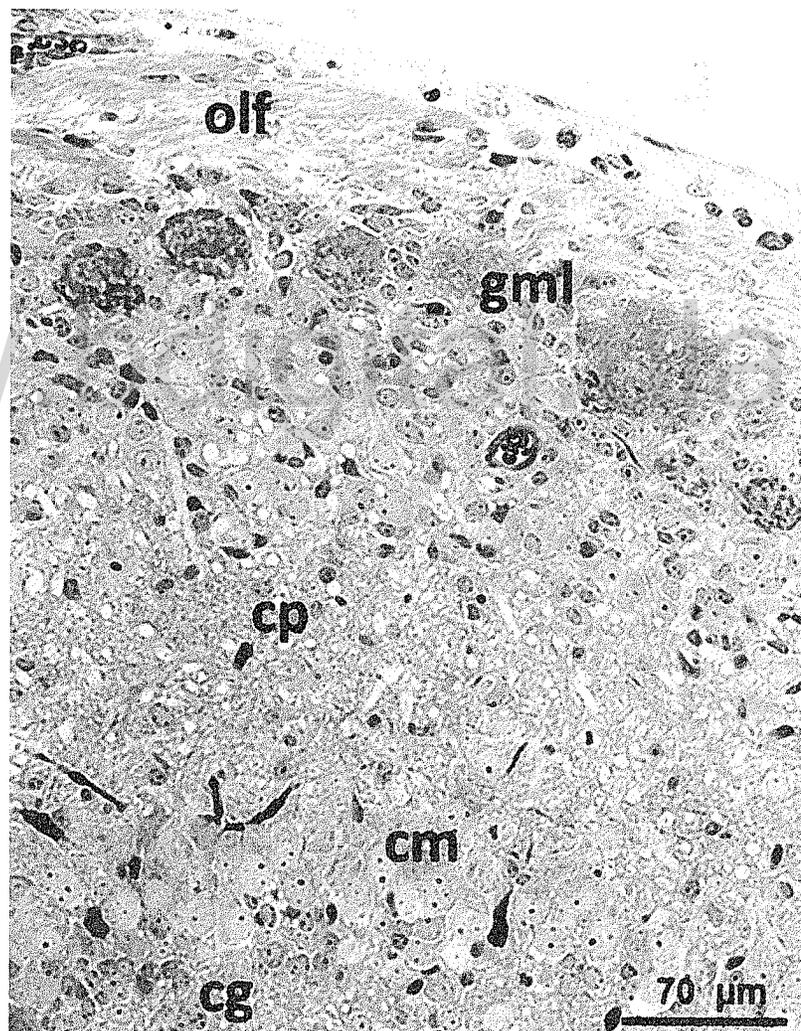


Figura 16. Citotípia e histotípia del bulbo olfatorio de ratón P7. Se observa una lámina periférica de axones olfatorios (olf), la capa formada por los glomérulos olfatorios (gml), una amplia capa plexiforme (cp), la capa de las células mitrales (cm) y hacia la parte más interna, la capa de las células granulosas (cg).

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 citotípica e histotípica, 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 (Fig. 16).

2. FORMACIÓN DE LOS GLOMÉRULOS OLFATORIOS

En los embriones de edad E17, el límite externo del bulbo olfatorio empieza a hacerse irregular, la capa plexiforme externa es bastante delgada y destaca la presencia de escasas prolongaciones neuronales formando una neuropila muy laxa con abundantes prolongaciones gliales, pudiéndose encontrar un reducido número de incipientes formaciones glomerulares de magnitud y ubicación variables, aunque predomina la localización en el tercio más superficial de la capa plexiforme externa. Estos esbozos glomerulares se originan a partir de las fibras del nervio olfatorio que al ingresar al bulbo olfatorio se distribuyen paralelamente al límite bulbar externo, para luego ramificarse perpendicularmente al mismo, formando el elemento aferente del glomérulo (Fig. 17a).

En los embriones E19 aumenta la cantidad de fibras que ingresan al bulbo olfatorio, lo cual permite que al ramificarse adquieran una mejor y más densa organización (Fig. 17b); sin embargo, a esta edad dichas fibras permanecen, próximas a la región periférica, aumentando ligeramente el espesor de esta región, en función al mayor ingreso de fibras del nervio olfatorio.

Entre los días E21 y P0 se inicia la aproximación entre los axones olfatorios y las prolongaciones neuronales propias del bulbo olfatorio que se dirigen hacia la periferia del tejido (Fig. 17c), aun cuando los primeros no han completado su descenso

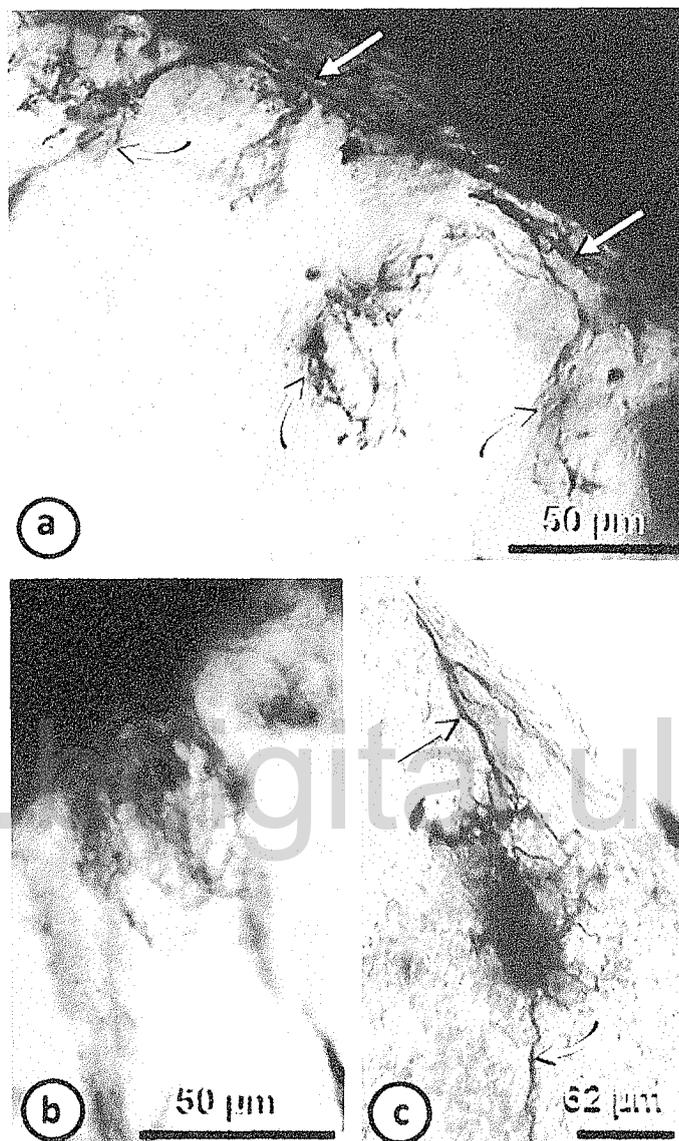


Figura 17. Proceso de formación de glomérulos en bulbo olfatorio de ratón entre los días E17 y E21 de desarrollo embrionario. (a), Fibras aferentes del nervio olfatorio (flechas rectas) ramificándose (flechas curvas) para formar los glomérulos en el bulbo olfatorio E17. Al día E19 (b), se observa una mejor organización de las fibras ramificadas y en el día E21 (c), se inicia la interrelación de las fibras que ingresan (flecha recta) con prolongaciones propias del bulbo olfatorio (flecha curva).

para ocupar su sitio definitivo en la capa glomerular propiamente dicha, permaneciendo ambas prolongaciones inmersas entre amplios procesos gliales que impiden un mayor contacto entre los componentes neuronales. No es sino después del

nacimiento (P1) cuando los glomérulos alcanzan su topotípica, para lo cual es necesario que los haces de las fibras olfatorias experimenten un proceso de elongación, alejándose de la periferia y formando un grueso pedúnculo antes de ramificarse de forma definitiva (Fig. 18).



Figura 18. Detalles de axones olfatorios de ratón al día P1 al organizarse para formar un glomérulo. Se nota un aumento del número de fibras axónicas y de la longitud de las mismas (flechas rectas) al alejarse del límite externo del bulbo para ramificarse (flechas curvas) y conformar el glomérulo.

Al día P3, a pesar que la parte aferente glomerular ha completado su desarrollo morfológico y ocupado su sitio definitivo, aún se encuentra rodeada por

prolongaciones gliales (Fig. 19), las cuales completan su función como elemento modulador de la plasticidad celular durante las primeras etapas del desarrollo postnatal del bulbo olfatorio. En el día P5 se visualiza el ascenso de las dendritas de las células mitrales y de las células en penacho para establecer contactos con los axones aferentes y formar los glomérulos definitivos (Fig. 20), siendo notoria la presencia de contactos sinápticos aun no totalmente desarrollados (Fig. 21). Los sitios ocupados por las glías en edades previas, son ocupados por prolongaciones neuronales que se entremezclan con los axones olfatorios para conformar definitivamente los glomérulos, como se ilustra en la figura 20.

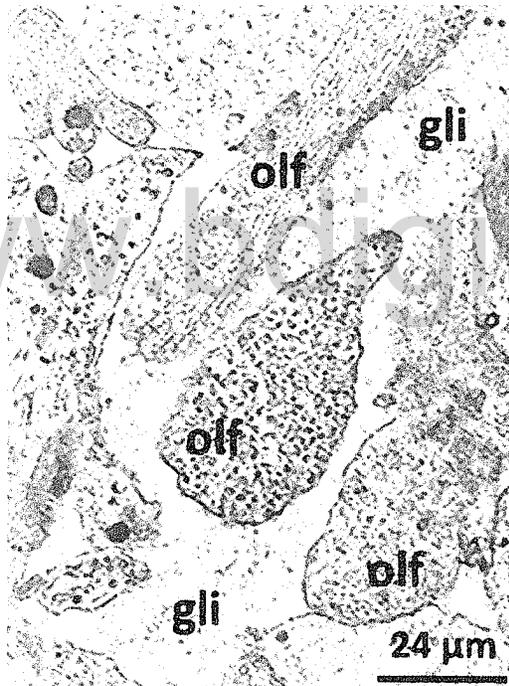


Figura 19. Interacción de fibras terminales del nervio olfatorio con prolongaciones gliales en bulbo olfatorio de ratón P3. Al día 3 postnatal las fibras terminales del nervio olfatorio (olf) se observan rodeadas por amplias prolongaciones gliales (gli).

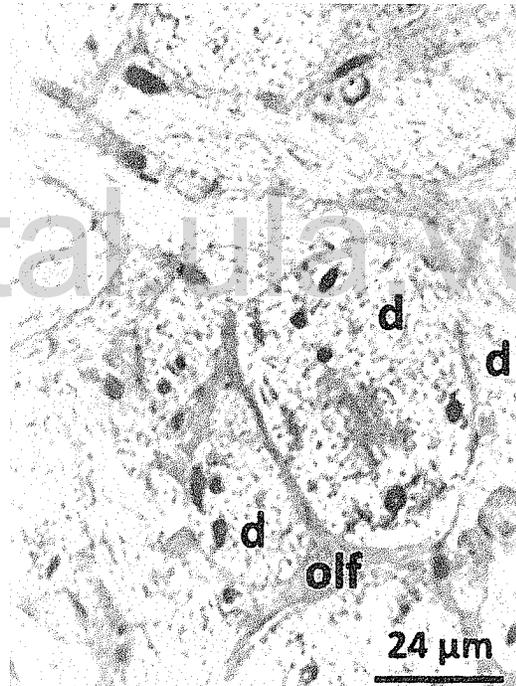


Figura 20. Interrelación de axones del nervio olfatorio con prolongaciones dendríticas en bulbo olfatorio de ratón P5. Se observa la relación directa que se establece entre los axones del nervio olfatorio (olf) y las prolongaciones dendríticas intrínsecas del bulbo olfatorio (d).

Ultraestructuralmente en el bulbo olfatorio de ratones de edades superiores, se identifican claramente los componentes neuronales glomerulares: por una parte,

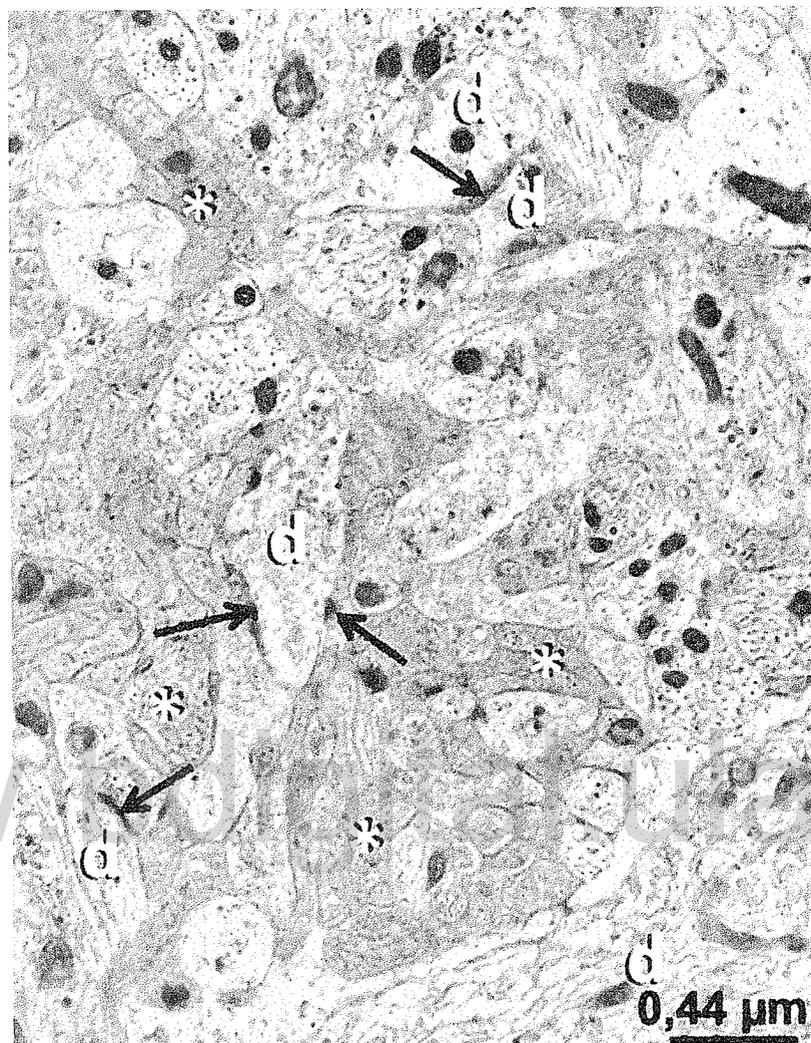


Figura 21. Glomérulo olfatorio en ratón P5. Segmento glomerular de ratón P5 donde se observan prolongaciones neuronales electrón densas correspondientes a fibras del nervio olfatorio (asteriscos) y prolongaciones dendríticas (d), medianamente electrón densas, de las neuronas del bulbo olfatorio. Entre estas estructuras neuronales se observan contactos sinápticos axo-dendríticos y dendro-dendríticos (flechas).

prolongaciones celulares electrón densas propias de las fibras olfatorias, y por otra, prolongaciones de menor densidad electrónicas correspondientes, las de mayores dimensiones a las dendritas de las células mitrales y las de menor tamaño a las dendritas de las células en penacho y a prolongaciones de las neuronas periglomerulares ^(97, 98). Al día P7 todas las estructuras glomerulares están

interconectadas (Fig. 22) observándose sitios intermembranosos de mayor densidad electrónica y aumento en la cantidad de vesículas sinápticas; es decir, se observan verdaderos contactos sinápticos, que al día P9 alcanza la maduración definitiva (Fig. 23).

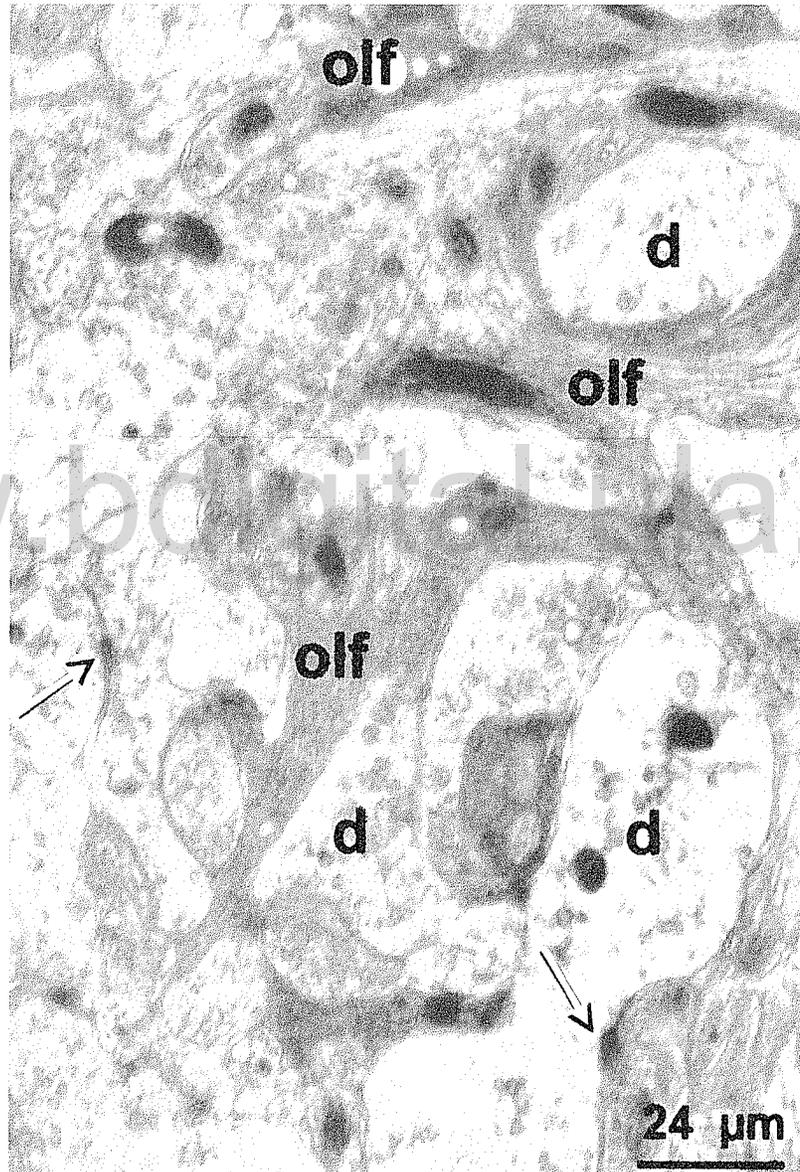


Figura 22. Detalles de contactos sinápticos en un glomérulo del bulbo olfatorio de ratón P7. Axones olfatorios (olf) y dendritas (d) de células mitrales y de células en penacho al día P7, entre los cuales se observan contactos interneuronales (flechas). Destaca la presencia de vesículas sinápticas en el interior de las prolongaciones neuronales.

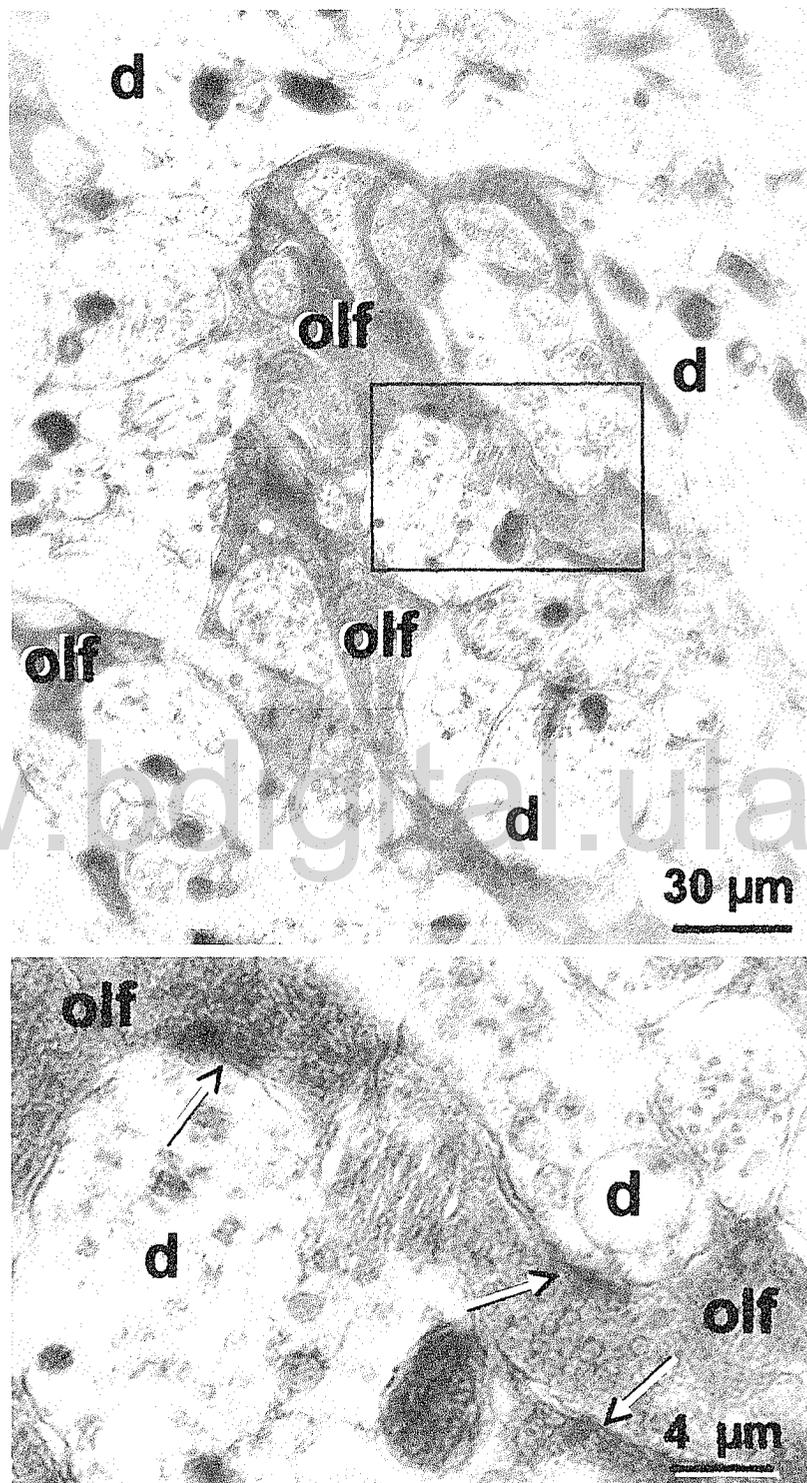


Figura 23. Contactos sinápticos en bulbo olfatorio de ratón P9. Al día P9 se observan contactos sinápticos entre los elementos neuronales que integran los glomérulos. En el recuadro, ampliado en la parte inferior, se indican dos sinapsis (flechas) establecidas por axones del nervio olfatorio (olf) con dos prolongaciones dendríticas (d).

3. SINAPTOGÉNESIS EN EL BULBO OLFATORIO

En las primeras etapas de desarrollo del bulbo olfatorio, la proporción de ramificaciones neuronales en la capa plexiforme externa y a nivel de la zona donde posteriormente estará ubicada la capa glomerular, es bastante reducida y esa región está ocupada fundamentalmente por cuerpos neuronales inmaduros.

Al día E17 se observan engrosamientos en la parte interna de algunas membranas neuronales adosadas con presencia de vesículas tipo sináptico en una de las dos estructuras neuronales. A medida que se analizan edades más avanzadas, esos contactos van aumentando en número y se hacen más acentuadas y con mayor densificación interna de la membrana a predominio de las estructuras dendríticas; sin embargo, el crecimiento en el número de contactos sinápticos es muy lento aunque tiende a ser constante. Es a partir de P0 cuando se observa un leve aumento en el número de formaciones sinápticas y en P1 comienzan a diferenciarse las sinapsis axo-dendríticas, mientras que las sinapsis dendro-dendríticas empiezan a visualizarse al día P3.

Ambos contactos aumentan cuantitativamente hasta los días P7 y P9 cuando se registra el mayor número de sinapsis, lo cual coincide con el hecho que es a partir del día P7 cuando los contactos sinápticos en el bulbo olfatorio de ratón muestran sus características definitivas, las cuales se consolidan al día P9.

En los días P7 y P9 los contactos sinápticos tienen todas sus características de madurez morfológica tanto los axo-dendríticos como los contactos dendro-dendríticos (Fig. 24) y su presencia es cuantitativamente más elevada en relación a las edades previas.

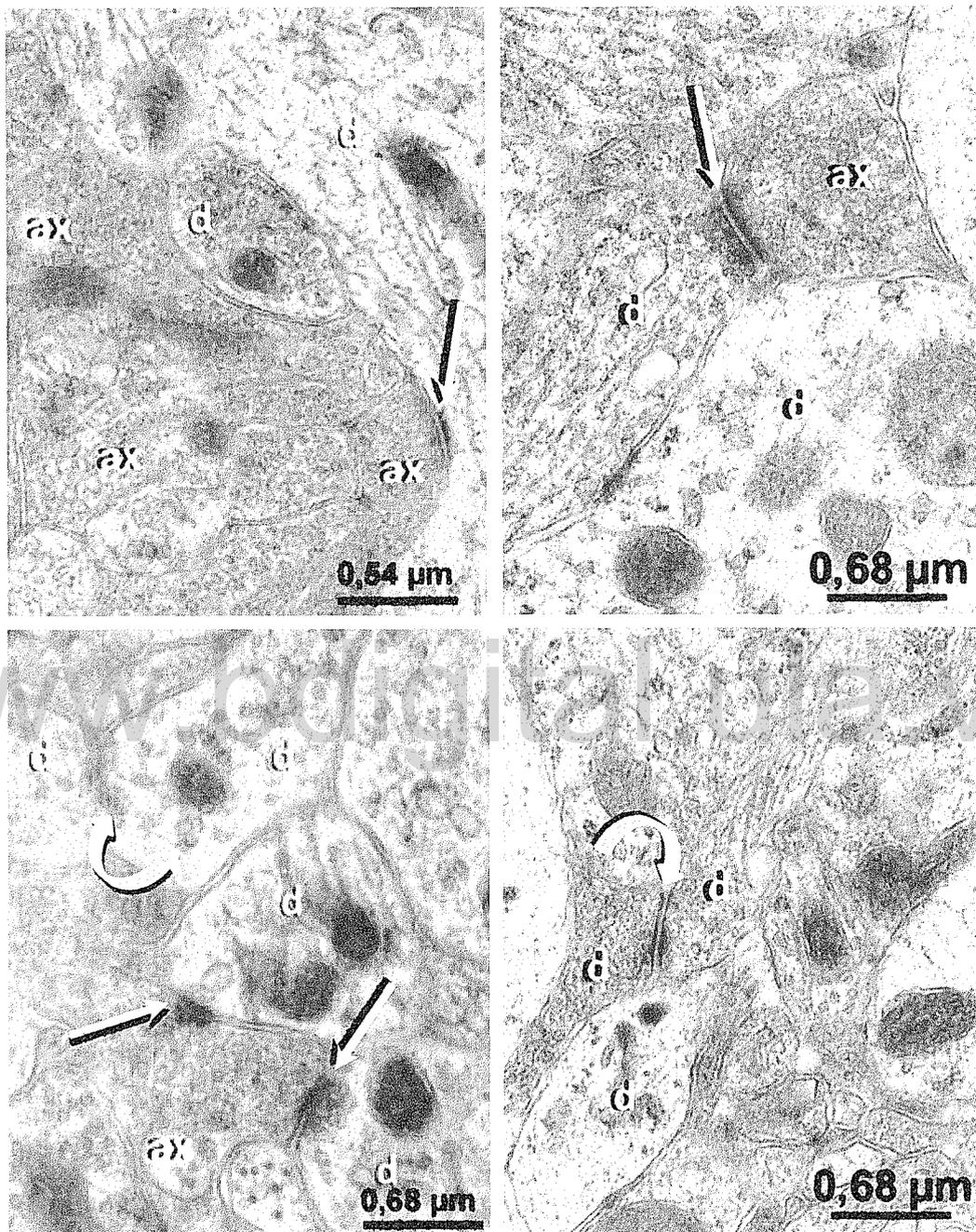


Figura 24. Contactos sinápticos axo-dendríticos y dendro-dendríticos en bulbos olfatorios de ratón P7 y P9. Características de madurez de las sinapsis axo-dendríticas (flechas rectas) y dendro-dendríticas (flechas curvas) observadas en el bulbo olfatorio de ratón en los días 7 y 9 de desarrollo postnatal. ax, axón; d, dendrita.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

a. Proceso de Formación de los Glomérulos Olfatorios

Cuando se comparan los promedios del diámetro de los glomérulos olfatorios en las distintas edades estudiadas, utilizando ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0,05$, los resultados muestran un $p = 0,000$, lo cual indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los promedios de los diámetros glomerulares (Tabla I).

Tabla I. Comparación de los promedios \pm DE del diámetro de los glomérulos olfatorios desde E17 hasta P9, utilizando ANOVA

Edades	Diámetro (μm)	p
	Promedio \pm DE	
E17	32,48 \pm 4,01	0,000
E19	34,38 \pm 3,59	
E21	38,9 \pm 3,85	
P0	41,32 \pm 3,54	
P1	44,76 \pm 1,90	
P3	47,94 \pm 2,34	
P5	52,14 \pm 2,75	
P7	59,9 \pm 3,83	
P9	60,32 \pm 5,36	

Adicionalmente, se aplicó la prueba de Tukey (Tabla II), revelando que entre E17 y E19 no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,1729$), mientras que al comparar E17 con las otras edades estudiadas, tanto embrionarias como postnatales, se evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,000$). Al

analizar los resultados de significancia de P7 y P9 se observa que entre ambas edades tampoco existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,9996$), aun cuando sí las hay en comparación con las demás edades. Finalmente, al comparar las edades postnatales podemos observar que P0, P1, P3 y P5 tienen diferencias estadísticamente significativas con todas las edades ($p=0,000$).

Tabla II. Comparaciones múltiples de los diámetros glomerulares utilizando la Prueba de Tukey (n = 50).

Edad	Edad								
	E17	E19	E21	P0	P1	P3	P5	P7	P9
E17		0,1729	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
E19	0,1729		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
E21	0,000*	0,000*		0,0234*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
P0	0,000*	0,000*	0,0234*		0,0001*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
P1	0,000*	0,000*	0,000*	0,0001*		0,0004*	0,000*	0,000*	0,000*
P3	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,0004*		0,000*	0,000*	0,000*
P5	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*		0,000*	0,000*
P7	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*		0,9996
P9	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,9996	

* La diferencia de medias es significativa al nivel . 0,05.

Estos resultados nos indican (Fig. 25) que no hay cambios bruscos en el diámetro de los glomérulos entre las edades embrionarias E17 y E19, así como tampoco entre las edades postnatales P7 y P9. Como se observa en la figura 25 el aumento en el diámetro de los glomérulos es constante y continuo durante todo el período de desarrollo estudiado. Los resultados estadísticos corroboran lo observado en el análisis histológico y ultraestructural; es decir que en el período embrionario las

fibras axónicas y dendríticas del glomérulo aún no han alcanzado su topotípia ni su madurez citológica, ya que las células de las cuales provienen son inmaduras, por lo tanto durante este período la citoarquitectura del glomérulo está en proceso de formación y morfológicamente no ha logrado el diámetro definitivo.

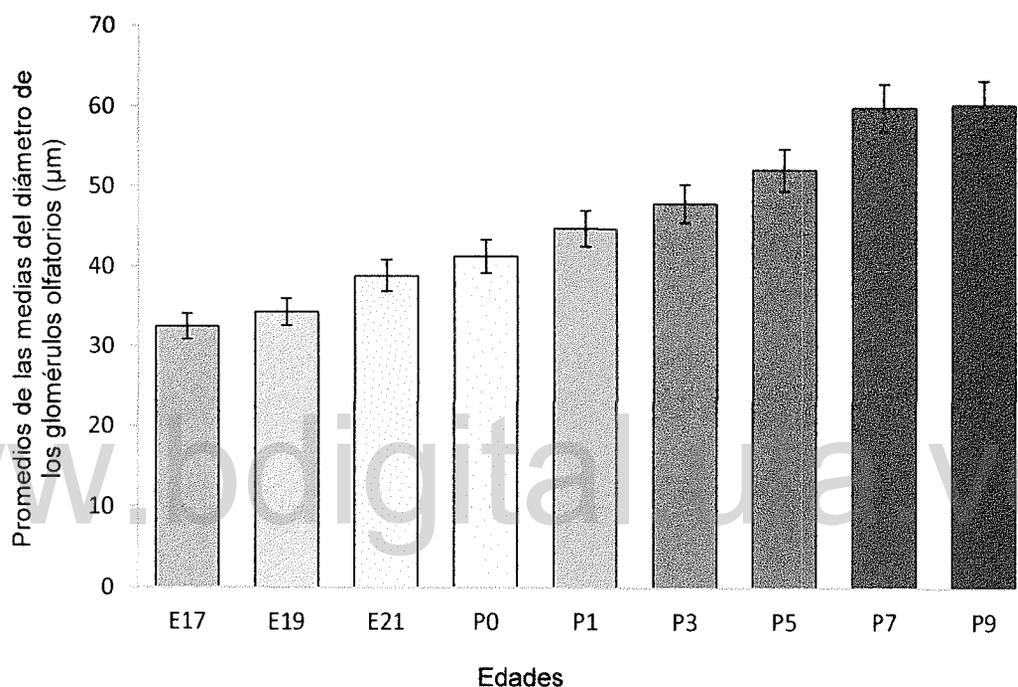


Figura 25. Variabilidad de los promedios de las medias de los diámetros de los glomérulos con respecto a la edad.

Hasta el día P5 el crecimiento de axones y dendritas ocurre de manera progresiva. A partir de esta edad, el diámetro glomerular muestra un brusco crecimiento, de 14,8% aproximadamente, al compararlo con P7; mientras que entre P7 y P9 sólo hay un incremento del 0,7%, indicando que a partir de P7 la estructura glomerular comienza a experimentar un proceso de maduración desde el punto de vista funcional.

En nuestro estudio, es entre P7 y P9 cuando se manifiesta el mayor diámetro glomerular ($59,9\pm 3,83$ y $60,32\pm 5,36$ μm), lo que nos permite inferir, en forma indirecta, que el proceso de maduración neuronal expresado por el desarrollo de axones y dendritas y por la formación de sinapsis para la conformación de los circuitos olfatorios finales, alcanzan su madurez definitiva en estas últimas edades.

b. Proceso de Sinaptogénesis en el Bulbo Olfatorio

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 expresa que hay una diferencia estadísticamente muy significativa entre las edades estudiadas ya que $p<0,05$ (Tabla III).

www.bdigital.ula.ve

Tabla III. Variabilidad en el número de sinapsis dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón en edades postnatal temprana (n = 50)

Edades	Cantidad de sinapsis/ μm^2	p
	Promedio \pm DE	
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	

Cuando analizamos el test *a posteriori* (Tabla IV) encontramos que los promedios en el número de sinapsis dendro-dendríticas, son diferentes con respecto a cada edad, lo que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas en el número de contactos sinápticos en las edades estudiadas.

En la figura 26 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 V) 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 nos indica que hay diferencias muy significativas en el número de sinapsis axo-dendríticas en las edades estudiadas.

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

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

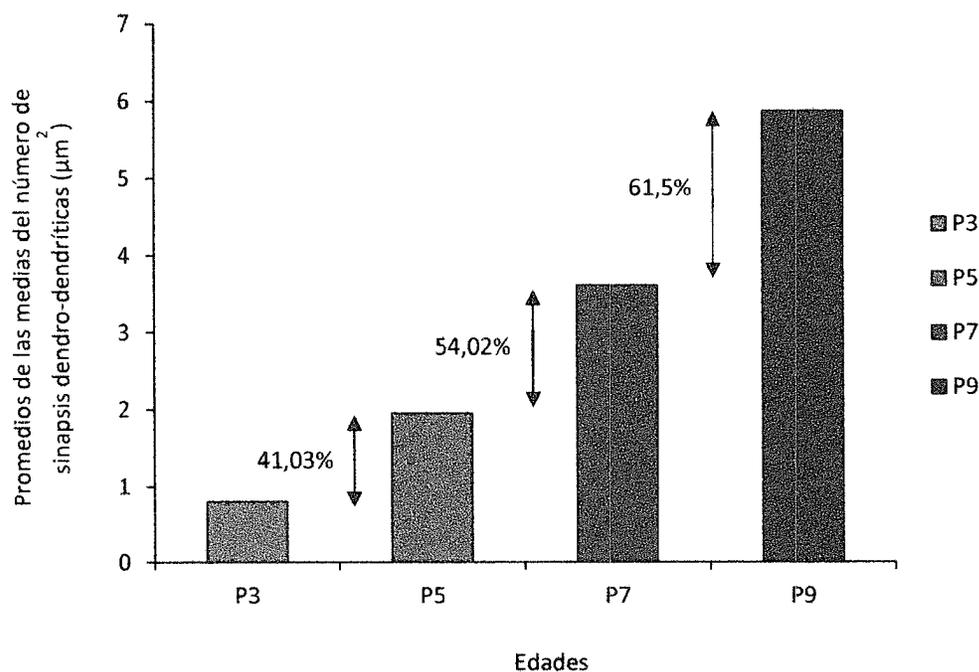


Figura 26. Comparación del aumento en el número de sinapsis dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón de edades postnatales.

www.bdigital.ula.ve

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

Edades	Cantidad de sinapsis/μm ²	p
	Promedio±DE	
E17	0,97±0,29	0,000
E19	1,61±0,21	
E21	1,69±0,50	
P0	1,80±0,47	
P1	2,16±0,57	
P3	3,34±0,42	
P5	4,38±0,58	
P7	5,81±0,78	
P9	6,42±0,89	

Al comparar con el test *a posteriori* (Tabla VI) 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.

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

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			2,1598				
P3	50				3,3404			
P5	50					4,3810		
P7	50						5,8078	
P9	50							6,4194

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 27 el aumento real del número de sinapsis axo-dendríticas comienza a partir de P1 y este incremento se hace constante y progresivo hasta P9, edad que corresponde a la última analizada en este trabajo. Los resultados obtenidos tanto del promedio de las medias en el número de sinapsis axo-dendríticas y de las dendro-dendríticas (Fig. 28), indican que la formación principal de ambos tipos de sinapsis comienza durante el desarrollo postnatal, es decir, entre las edades P3 y P9.

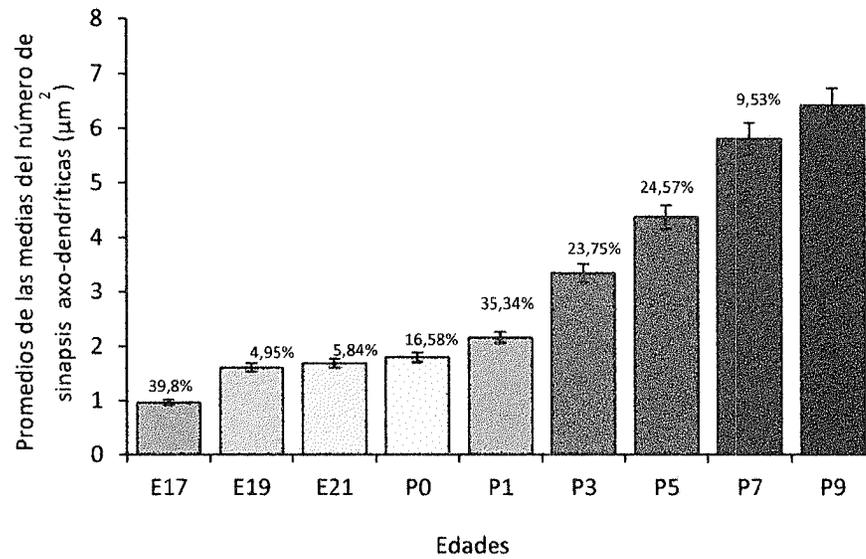


Figura 27. Comparación porcentual del aumento en el número de sinapsis axo-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón de edades embrionarias y postnatales.

www.bdigital.ula.ve

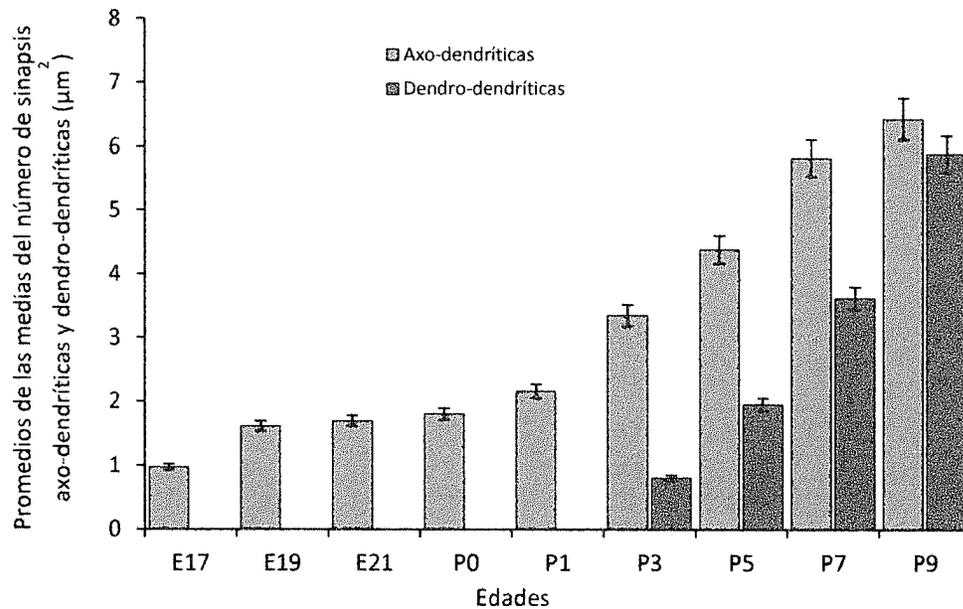


Figura 28. Cuantificación, por μm^2 de superficie, de sinapsis axo-dendríticas y dendro-dendríticas en el bulbo olfatorio de ratón en edad prenatal tardía y postnatal temprana.

DISCUSION

Durante la etapa de neurodiferenciación y maduración citológica, el bulbo olfatorio experimenta una serie de cambios dinámicos tanto citomorfológicos como citofuncionales lo cual le permite alcanzar la definición funcional mediante la cual va a ejercer las diversas y complejas funciones que le corresponde desempeñar, a pesar de ser una red neuronal relativamente simple ^(27, 29, 37, 57-62, 100) 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 ^(38, 63, 64, 101-103) 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. Durante las primeras etapas de desarrollo del bulbo olfatorio, la proporción de ramificaciones neuronales en la capa plexiforme externa y a nivel de la zona donde posteriormente estará ubicada la capa glomerular, es bastante reducida y está ocupada fundamentalmente por cuerpos neuronales, observándose en la periferia una franja bastante delgada de axones, que a medida que se avanza en edad se hace de mayor espesor. Esto es debido a que inicialmente ingresan escasos axones provenientes de la mucosa olfatoria, en parte porque el sistema olfativo externo aun no alcanzado la madurez y porque además, no existen estímulos suficientes que favorezcan el necesario crecimiento axónico para la formación de los glomérulos olfatorios ⁽³⁸⁾.

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 del nervio olfatorio que ingresan al tejido bulbar, este

resultado coincide con los hallazgos de Valverde ⁽¹⁸⁾ y Lazarini ⁽⁶⁸⁾ quienes ubican la formación glomerular entre los días E20 y P0. Sin embargo, Blanchart ⁽¹⁰⁴⁾ 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 ⁽¹⁸⁾. 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, 62, 64).

Algunos autores refieren la formación de las primeras sinapsis en el bulbo olfatorio, específicamente las glomerulares, entre los días E13 y E16 ^(18, 37-39). En el caso de la especie estudiada en este trabajo, 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 citotípica e histotípica; edad que se denomina 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 ^(36, 66).

Según Blanchart y col. ⁽¹⁰⁴⁾ en el ratón, las uniones electrón-densas se observan a partir de E13 y ellos pudieron visualizar vesículas tipo sinápticas en E14. No obstante, 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 tal engrosamientos se incrementa, a predominio de las estructuras dendríticas, a medida que se avanza en edad, haciéndose más acentuados y con mayor densificación. Por otra parte, Marchand y Bélanger ⁽¹⁰⁵⁾ han reportado que en rata es en E16 cuando los axones empiezan a establecer contactos en el bulbo olfatorio.

Al relacionar 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, que 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%.

Mediante el 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 41,03%, entre P5 y P7 de 54,02% y entre P7 y P9 la diferencia es de 61,5%. Este aumento continuo y acelerado coincide con la maduración y consolidación de los glomérulos olfatorios, estructuras que constituyen el primer sitio de relevo del sistema nervioso central para el procesamiento de la información olfativa, al establecerse allí las primeras sinapsis entre los axones de las neuronas sensoriales olfativas del epitelio nasal y las dendritas de las células mitrales y células en penacho, moduladas por las prolongaciones neuronales de las células periglomerulares que, rodeando los glomérulos, transfieren la información a las células mitrales, cumpliendo una importante función en la conformación de la información olfativa ^(44, 61, 106), modulada a su vez por la función inhibitoria de las células granulosas ⁽¹⁰⁷⁾.

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. Esto 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 ⁽¹⁰⁸⁾ y por Kopel y col. ⁽¹⁰⁹⁾. 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, 40, 41, 43, 48, 49, 80).

Es relevante 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 $P7 \pm 24h$, se definió como 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 de este trabajo permitirán proyectar estudios experimentales sobre enfermedades en las que el sistema olfatorio esté implicado.

CONCLUSIONES

1. Este estudio permitió determinar la manera cómo las estructuras neuronales que conforman el bulbo olfatorio van interconectándose e interactuando hasta constituir un circuito sináptico importante y fundamental para la funcionalidad de las vías olfativas.
2. Es importante señalar que el componente glomerular que primero se desarrolla es el periférico o extrabulbar, sirviendo este de “blanco” para atraer el componente intrabulbar constituido por las prolongaciones de las células mitrales y células en penacho que ascienden en búsqueda de las terminaciones del nervio olfatorio, uniéndose a ellas los procesos neuronales de las células periglomerulares.
3. Ultraestructural y estadísticamente se comprobó que las sinapsis dendro-dendríticas son una expresión morfo-funcional postnatal, que comienza a partir del día P3; mientras que las sinapsis axo-dendríticas se observan desde la edad E17. Ambas aumentan su número y madurez morfológica de manera continua y constante hasta P7, edad cuando el bulbo olfatorio expresa su potencialidad funcional.
4. El estudio y comprensión del desarrollo del bulbo olfatorio, así como el conocimiento de los distintos eventos morfológicos y sinápticos que ocurren durante la maduración embrionaria y postnatal, son imprescindibles para comprender la relación de esta área del SNC con diversas patologías neuronales y de comportamiento tanto en biomodelos de mamíferos y aves, como en el humano.
5. El análisis de los procesos de morfogénesis que ocurren en esta región del sistema nervioso es importante para la comprensión y tratamiento de enfermedades en las cuales está involucrado el bulbo olfatorio.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar y ampliar el estudio del bulbo olfatorio utilizando otras metodologías, tanto básicas como nuevas tecnologías, para establecer de manera más específica la correlación entre los diferentes tipos celulares del bulbo olfatorio y las distintas patologías como el Parkinson y Alzheimer, que afectan o en las que interviene el bulbo olfatorio.
2. Estudiar, además de los mecanismos celulares ya conocidos, los mecanismos moleculares que suceden en el bulbo olfatorio, lo cual ayudara a un mejor entendimiento del comportamiento sensorial, reproductivo y/o social de los individuos, esferas estas del comportamiento animal en las que interviene de forma fundamental el bulbo olfatorio.
3. Investigar sobre la biología de las células madres (*stem cells*) en el bulbo olfatorio, lo cual permitirá conocer los procesos de diferenciación y desarrollo de células neuronales *de novo*, así como los mecanismos de integración sináptica en los circuitos neuronales, aspectos de gran interés para el desarrollo de terapias de reemplazo en el caso de enfermedades degenerativas.

BIBLIOGRAFÍA

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 Korsakoffs, 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. Valley MT, Henderson LG, Inverso SA, Lledo PM. Adult neurogenesis produces neurons with unique GABAergic synapses in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 2013; 33: 14660-14665. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2845-13.2013.
23. Arruda D, Publio R, Roque AC. The periglomerular cell of the olfactory bulb and its role in controlling mitral cell spiking: a computational model. *PLoS One.* 2013; 8: 56148. doi: 10.1371/journal.pone.0056148.
24. Lepousez G, Valley MT, Lledo PM. The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annu Rev Physiol.* 2013; 75: 339-63. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183731.

25. Nunez-Parra A, Maurer RK, Krahe K, Smith RS, Araneda RC. Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 14777-14782. doi: 10.1073/pnas.1310686110.
26. Price JL. The termination of centrifugal fibres in the olfactory bulb. *Brain Res*. 1968; 7: 483-486.
27. Price JL, Powell TPS. The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*. 1970a; 7: 91-123.
28. Price JL, Powell TPS. The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*. 1970b; 7: 125-155.
29. Pinching AJ, Powell TPS. The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci*. 1971b; 9: 347-377.
30. Shepherd GM. *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press. New York, USA. 1974.
31. Garcia-Gonzalez D, Murcia-Belmonte V, Clemente D, De Castro F. Olfactory system and demyelination. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013; 296: 1424-34. doi: 10.1002/ar.22736.
32. David LS, Schachner M, Saghatelian A. The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-R Affects Adult But Not Developmental Neurogenesis in the Olfactory Bulb. *J Neurosci*. 2013; 33: 10324-10339.
33. Vargas-Barroso V, Larriva-Sahd J. A cytological and experimental study of the neuropil and primary olfactory afferences to the piriform cortex. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013; 296: 1297-1316. doi: 10.1002/ar.22753.
34. Moreno M, Richard M, Landrein B, Sacquet J, Didier A, Mandairon N. Alteration of olfactory perceptual learning and its cellular basis in aged mice. *Neurobiol Aging*. 2013; 35: 680-691. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.
35. Smear M, Resulaj A, Zhang J, Bozza T, Rinberg D. Multiple perceptible signals from a single olfactory glomerulus. *Nat Neurosci*. 2013; 16: 1687-1691. doi: 10.1038/nn.3519.
36. Huart C, Rombaix P, Hummel T. Plasticity of the human olfactory system: the olfactory bulb. *Molecules*. 2013; 18: 11586-11600. doi: 10.3390/molecules180911586.

37. Gottfried JA, Small DM, Zald DH. The chemical senses. En: Zald DH, Rauch S. *The Orbitofrontal Cortex*. Editorial Oxford University Press 1ª edición. Oxford, Reino Unido. 2006; p. 125-171.
38. Zelano C, Sobel N. Humans as an animal model for systems-level organization of olfaction. *Neuron*. 2005; 48: 431-454.
39. Kivity S, Ortega-Hernández OD, Shoenfeld Y. Olfaction a window to the mind. *Isr Med Assoc J*. 2009; 11: 238-243.
40. Engen T. *The Perception of Odors*. New York. Academic Press. 1982.
41. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen CHR. *The human central nervous system, a synopsis and atlas*. 2a ed. Berlin. Springer-Verlag. Versión en castellano de C. Barastegui Almagro (1982): *Sinopsis y Atlas del Sistema Nervioso Humano*. Madrid. Ed. AC. 1981.
42. Nemitz JW, Goldberg SJ. Neuronal responses of rat pyriform cortex to odor stimulation: an extracellular and intracellular study. *J Neurophysiol*. 1983; 49: 188-203.
43. 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.
44. Doty R. Olfaction. *Annu Rev Psychol*. 2001; 52: 424-452.
45. Herz R, Engen T. Odor memory: review and analysis. *Psychon Bull Rev*. 1996; 3: 300-313.
46. Ruan L, Lau BW, Wang J, Huang L, Zhuge Q, Wang B, Jin K, So KF. Neurogenesis in neurological and psychiatric diseases and brain injury: From bench to bedside. *Prog Neurobiol*. 2013; pii: S0301-0082(13)00146-9. doi: 10.1016/j.pneurobio.
47. Liu Q, Li A, Gong L, Zhang L, Wu N, Xu F. Decreased coherence between the two olfactory bulbs in Alzheimer's disease model mice. *Neurosci Lett*. 2013; 545: 81-85. doi: 10.1016/j.neulet.2013.04.023.
48. Licht T, Eavri R, Goshen I, Shlomai Y, Mizrahi A, Keshet E. VEGF is required for dendritogenesis of newly born olfactory bulb interneurons. *Development*. 2010; 137: 261-271.
49. Cummings DM, Belluscio L. Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry. *J Neurosci*. 2010; 30: 9172-9180.

50. Lipscomb BW, Treloar HB, Greer ChA. Novel microglomerular structures in the olfactory bulb of mice. *J Neurosci.* 2002; 22: 766-774.
51. De Saint Jan D, Hirnet D, Westbrook GL, Charpak S. External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli. *J Neurosci.* 2009; 29: 2043-2052.
52. Kiyokage E, Pan YZ, Shao Z, Kobayashi K, Szabo G, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, Shipley MT. Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci.* 2010; 30: 1185-1196.
53. Keller A, Yagodin S, Aroniadou-Anderjaska V, Zimme LA, Ennis M, Sheppard Jr NF, Shipley MT. Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging. *J Neurosci.* 1998; 18: 2602-2612.
54. Ramón y Cajal S. *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres.* Paris, Maloine. 1911.
55. Ramón y Cajal S, Tello y Muñoz JF. *Elementos de histología normal y de técnica micrográficas.* 12 ed. Editora Nacional. México. 1966.
56. Belnoue L, Grosjean N, Ladevèze E, Abrous DN, Koeh M. Prenatal stress inhibits hippocampal neurogenesis but spares olfactory bulb neurogenesis. *PLoS One.* 2013; 8: 72972. doi: 10.1371/journal.pone.0072972.
57. Prince JL, Powell TPS. The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 1970c; 7: 631-651.
58. Takami S, Toida K. Structure and function of the olfactory system: overview. *Anat Sci Int.* 2008. 83: 183-185.
59. Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol.* 2009; 89: 162-75.
60. Christie JM, Schoppa NE, Westbrook GL. Tufted cell dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is dependent on NMDA receptor activity. *J Neurophysiol.* 2001; 85: 169-173.
61. Ennis M, Zhou FM, Ciombor KJ, Aroniadou-Anderjaska V, Hayar A, Borrelli E, Zimmer LA, Margolis F, Shipley MT. Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol.* 2001; 86: 2986-2997.
62. Ennis M, Zhu M, Heinbockel T, Hayar A. Olfactory nerve-evoked, metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic responses in rat olfactory bulb mitral cells. *J Neurophysiol.* 2006; 95: 2233-2241.

63. Hayar A, Karnup S, Ennis M, Shipley MT. External tufted cells: A major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci*. 2004a; 24: 6676-6685.
64. Hayar A, Karnup S, Shipley MT, Ennis M. Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *J Neurosci*. 2004b; 24: 1190-1199.
65. Hayar A, Shipley MT, Ennis M. Olfactory bulb external tufted cells are synchronized by multiple intraglomerular mechanisms. *J Neurosci*. 2005; 25: 8197-8208.
66. McQuiston AR, Katz LC. Electrophysiology of interneurons in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol*. 2001; 86: 1899-1907.
67. Rubin DB, Cleland TA. Dynamical mechanisms of odor processing in olfactory bulb mitral cells. *J Neurophysiol*. 2006; 96: 555-568.
68. Lazarini F, Lledo PM. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci*. 2011; 34: 20-30.
69. Macrides F, Davis BJ. The olfactory bulb. *J Chem Neuroanat*. (Emson, P.C. Ed.). Raven Press. Nueva York. 1983; pp. 391-426.
70. Shipley MT, Ennis M. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol*. 1996; 30: 123-176.
71. Finger ET, Silver LW. *Neurobiology of taste and smell*. (Finger ET, Silver LW. Eds. John Wiley & sons). Nueva York. 1987.
72. Davenport D. Specificity and behavior in symbioses. *Q Rev Biol*. 1955; 30: 29-46.
73. Orensanz LM, Guillamón A, Ambrosio E, Segovia S, Azuara MC. Sex differences in alpha-adrenergic receptors in the rat brain. *Neurosci Lett*. 1982; 30: 275-278.
74. Tresguerres JAF. *Fisiología humana*. 1ª edición. México DF. McGraw-Hill. 1992; pp. 328-340.
75. Kringelbach ML. The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6: 691-702.
76. Royet JP, Plailly J. Lateralization of olfactory processes. *Chem Senses*. 2004; 29: 731-45.
77. Takagi SF. Multiple olfactory pathways in mammals: a review. *Chem Senses*. 1981; 6: 329-333.

78. Rausch R, Serafetinides EA. Specific alterations of olfactory functions in humans with temporal lobe lesions. *Nature*. 1975; 225: 557-558.
79. Rolls ET, Kringelbach ML, de-Araujo IE. Different representations of pleasant and unpleasant odours in the human brain. *Eur J Neurosci*. 2003; 18: 695-703.
80. Lledo PM, Carleton A, Vincent D. Odeur et olfaction. *J Soc Biol*. 2002; 196: 59-65.
81. Pernellet JC, Sanz G, Briand L. Les récepteurs des molécules odorantes et le codage olfactif. *C R Biol*. 2006; 329: 679-690.
82. Williams PL, Warwick R. *Gray anatomy*. Salvat Editores. Barcelona, España. 1985; pp. 1088-1093.
83. Mombaerts P. How smell develops. *Nat Neurosci*. 2001; 4: 1192-1198.
84. Menini A, Lagostena L, Boccaccio A. Olfaction: from odorant molecules to the olfactory cortex. *News Physiol Sci*. 2004; 19: 101-104.
85. Kratskin IL, Belluzzi O. Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. Murphy C, Doty R, Duncan H. *Clinical Disorders of Olfaction*. En: Doty R. *Handbook of Olfaction and Gustation*. Nueva York, Estados Unidos: Editorial Marcel Dekker 2ª edición; 2003.
86. Royet JP, Plailly J. Lateralization of olfactory processes. *Chem Senses*. 2004; 29: 731-45.
87. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academy Press. Washington, DC. 1996.
88. *Código de Bioética y Bioseguridad*. 2ª edición. Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Caracas. 2002.
89. Golgi C. *Opera Omnia*. Ulrico Hoepli (Ed.) Milano. 1903; 1: 99-111.
90. Palacios-Prü EL. Two useful variations of the Golgi silver-chromate method. *Acta Cient Venezolana*. 1970; 21: 105-106.
91. Peña-Contreras Z, Mendoza-Briceño RV, Dávila-Vera D, Rivera-Valecillos S, Palacios-Prü EL. Aplicabilidad del método de Golgi modificado en cultivos de células neuronales. *Acta Microscópica*. 2010; 19: 45-151.

92. 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.
93. Watson HL. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958; 4: 475-478.
94. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963; 17: 208-212.
95. Sato T. A modified method for lead staining of thin sections. *J Electron Microsc.* 1967; 16: 133.
96. Spiegel MR, Schiller J, Srinivasan RA. Análisis de la varianza. Probabilidad y estadística. 2ª edición. México DF. McGraw-Hill. 2007; p. 335-371.
97. Tejedor FJ. Análisis de varianza. Schaum. Madrid: La Muralla S.A. 1999.
98. Hernández R. Metodología de la Investigación. 4ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 2006; p. 850.
99. Kosaka T, Kosaka K. Interneurons in the olfactory bulb revisited. *Neurosci Res.* 2011; 69: 93-99.
100. Sonogo M, Zhou Y, Oudin MJ, Doherty P, Lalli G. In vivo postnatal electroporation and time-lapse imaging of neuroblast migration in mouse acute brain slices. *J Vis Exp.* 2013; doi: 10.3791/50905.
101. Huang L, Garcia I, Jen HI, Arenkiel BR. Reciprocal connectivity between mitral cells and external plexiform layer interneurons in the mouse olfactory bulb. *Front Neural Circuits.* 2013; 7: 32. doi: 10.3389/fncir.2013.00032.
102. Díaz-Guerra E, Pignatelli J, Nieto-Estévez V, Vicario-Abejón C. Transcriptional regulation of olfactory bulb neurogenesis. *Anat Rec (Hoboken).* 2013; 296: 1364-1382. doi: 10.1002/ar.22733.
103. Crespo C, Liberia T, Blasco-Ibáñez JM, Nacher J, Varea E. The circuits of the olfactory bulb. The exception as a rule. *Anat Rec (Hoboken).* 2013; 296: 1401-1412. doi: 10.1002/ar.22732.
104. 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.

105. Marchand R, Bélanger MC. Ontogenesis of the axonal circuitry associated with the olfactory system of the rat embryo. *Neurosci Lett.* 1991; 129: 285-290.
106. Shipley MT, Ennis M. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol.* 1996; 30: 123-176.
107. Shao Z, Puche AC, Shipley MT. Intraglomerular inhibition maintains mitral cell response contrast across input frequencies. *J Neurophysiol.* 2013; 110: 2185-2191. doi: 10.1152/jn.00023.2013.
108. Walton RM. Postnatal neurogenesis: of mice, men, macaques. *Vet Pathol.* 2012; 49: 155-165.
109. 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.

www.bdigital.ula.ve