

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

Neuronas interfasciculares de la comisura anterior del ratón normal y con anosmia unilateral. Estudio morfométrico.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

BIOL. MARÍA GUADALUPE MORENO OCAÑA

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE A. LARRIVA SAHD.**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente a todas las personas que de una u otra forma hicieron posible la realización y conclusión de esta tesis.

En primer término a la Universidad Nacional Autónoma de México, que ha permitido mi estancia en ella durante prácticamente toda mi formación académica.

Al Dr. Jorge Antonio Larriva-Sahd por darme la oportunidad de realizar esta tesis en el laboratorio de Neuromorfología a su cargo y por su apoyo académico, paciencia y valiosas enseñanzas aportadas a lo largo de la Maestría. Muchas gracias.

A la Q.F.B. Gema Martínez-Cabrera, técnico académico del laboratorio de Neuromorfología por su asesoría técnica en la preparación de reactivos y técnicas de tinción y perfusión y por su inconmensurable apoyo y amistad.

Al laboratorista Víctor Hugo Pérez Romero, por el apoyo en diversas técnicas de preparación y en especial en la elaboración de gráficas y figuras.

Al comité tutorial, por la revisión de los manuscritos y sus valiosas sugerencias:

Dr. Jorge A. Larriva-Sahd.

Dr. Raúl Paredes Guerrero

Dra. Magdalena Giordano Noyola (agradezco especialmente su asesoría en la realización de la parte estadística)

Dra. Sofía Y. Díaz Miranda.

A los sinodales: Dr. Manuel Salas Alvarado, Dra. Martha León Olea y al Dr. León F. Cintra Mc Glone por la revisión crítica del escrito y valiosas sugerencias

Al personal del bioterio del INB, en especial al V. Z. Martín García Servín y al señor Luis Huitrón por el aporte y cuidado de los sujetos experimentales.

A la Unidad de Imágenes, en especial al Ing. Leopoldo González por su ayuda en el cálculo de las áreas y a Nydia Hernández.

A Guadalupe Martínez-Lorenzana por su apoyo en el cálculo inicial de las áreas.

Al personal de la Biblioteca del INB por su apoyo en la localización y recuperación de material bibliográfico, muy en especial a Pilar Galarza, Elsa y Rafael, por su gentileza y buena disposición.

Y finalmente, en la coordinación de la Maestría en Ciencias, a la Lic. Leonor Casanova por su eficiente y valiosa asesoría en el manejo de los trámites académicos.

Esta tesis fue realizada con el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México D. F., (beca 57731) a María Guadalupe Moreno Ocaña y con el donativo de CONACyT 40286M.

DEDICATORIA PERSONAL

Dedico esta tesis con especial cariño a mi querido hijo Joe, por su amor, ternura, comprensión, amistad y compañía a lo largo de su pequeña vida.

A mis padres que me apoyaron incondicionalmente y aplaudieron la terminación de esta tesis.

A mis hermanos con mucho cariño por la tierna infancia compartida y porque han apoyado todos mis proyectos, los han compartido y se han involucrado en ellos, impulsándome a ir hacia delante. A Socorro, Dulce, Manuel, Alba y muy especialmente a Mauricio por sus consejos, apoyo en los momentos difíciles, las inyecciones de buen humor y de optimismo, perseverancia, constante impulso y preocupación por saber el grado de avance y terminación de mi trabajo.

A mis amigos de la maestría, Bertha, Luis, Edith, Ceci, Gely, pero muy especialmente a Lucy y a Lety porque formamos un buen equipo en donde hubo muchas ideas y sueños compartidos, alegrías, tristezas, risa, llanto, satisfacciones y descalabros académicos, pero finalmente nació una sincera amistad que perdura más allá de la estancia dentro del instituto.

Igualmente una parte fundamental de mi estadía en el Instituto fueron mis compañeros del laboratorio a quienes nos une un fuerte lazo de compañerismo y amistad sincera. A ellos quiero agradecerles por todos los buenos ratos que pasamos y su ayuda incondicional y cariñosa, especialmente a Gema, Nancy, Liset, Fabiola y Víctor.

A mi queridísima amiga, compañera y asesora estadística a quien estimo profunda y muy sinceramente la M. en C. Gloria Avecilla (aunque no me invitó a su examen de graduación, mi estima va mucho más allá).

A todos los maestros del posgrado por las bellísimas cátedras que disfruté gracias a la oportunidad maravillosa que me dio mi universidad, la UNAM, esta casa de estudios que es orgullo no solo de México sino de América Latina.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.	
Organización del sistema olfatorio.....	4
La vía olfatoria principal.....	6
Conexiones olfatorias.....	10
Conexiones de la comisura anterior.....	11
Estructura histológica de la comisura anterior.....	13
Función de la comisura anterior.....	14
Neuronas interfasciculares.....	15
La anosmia como modelo experimental.....	17
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS	21
HIPÓTESIS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	
Grupos experimentales.....	22
Sacrificio y fijación.....	23
Obtención y procesamiento de muestras.....	23
Morfometría.	24
RESULTADOS	
Obtención de los grupos experimentales.....	26
Peso corporal.....	26
Peso de los hemisferios cerebrales.....	26
Diámetro medio sagital de la comisura anterior.....	26
Área de la comisura anterior.....	28
Densidad neuronal en la comisura anterior.....	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	39
ABREVIATURAS	40
REFERENCIAS	41

RESUMEN

En este estudio se detallan el efecto de la anosmia unilateral provocada al nacimiento sobre el área de la comisura anterior (CA) y sobre su número de neuronas interfasciculares (NIFs). El efecto de la anosmia fue evaluado en ratones a las 10 semanas posteriores a la lesión en comparación con sus controles respectivos. Se estimaron el peso cerebral ipsi y contralateral a la oclusión, el diámetro medio sagital y área comisural, así como la densidad numérica de las NIFs. Se concluyó 1. que no existe diferencia significativa en el peso del hemisferio derecho (lesionado), con respecto al izquierdo; tanto entre los animales anósmicos como entre los controles; 2. el diámetro medio sagital de la comisura anterior es significativamente mayor en los machos que en las hembras controles; 3. el tratamiento provocó una disminución significativa en el área de la CA en hembras y machos así como en el número de NIFs. 4. aunque la densidad numérica de NIFs no se modificó, la disminución en tamaño de la CA en los animales anósmicos se tradujo en un número significativamente menor de neuronas en los tejidos de animales anósmicos 5. la disminución en el área comisural se atribuye a una posible disminución en número y/o diámetro de sus fibras. Lo anterior prueba que la supresión temprana de estímulos olfatorios altera las dimensiones y el número de neuronas en la CA del ratón adulto.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: MARIA CAROLINA HERRERA

CCANIO

FECHA: 22 Marzo 2006

FIRMA: MA

ABSTRACT

In this study we describe the effect of new-born unilateral anosmia on the microscopic structure of the mouse anterior commissure and its harboring cells: the interfascicular neurons (IFN's). The study was performed at ten weeks of age and in age-matched controls. The brain weight was additionally determined ipsi- and contralaterally to the site of the anosmia. It was found that: 1. the numerical density of IFN's and brain dimension did not change as a function of sex or anosmia in either side of the brain. 2. The diameter of the anterior commissure is significantly different as a function of sex, being bigger in the male mouse; 3. The treatment proves a significant loss to the AC area on female and males and also on the number of IFN's; 4. Even though the density of the IFN's didn't change, the loss of AC size on anosmic animals meant a significant lower number of neurons in the tissues of anosmic animals; 5. The loss to the commissural area can be attributed to a possible loss to the dimension and number of neurons in the AC of the adult mouse.

INTRODUCCIÓN

Las comisuras cerebrales se definen como fascículos de fibras que proyectan a zonas homónimas del encéfalo asumiendo funciones de integración interhemisférica (Jouandet y Harstein, 1983). En este sentido, las fibras comisurales se distinguen de las fibras decusantes en tanto que éstas atraviesan la línea media y terminan también en un sitio contralateral, pero heterónimo, es decir, diferente a su sitio de origen. En los mamíferos euplacentados existen tres sistemas comisurales: el cuerpo calloso, la comisura anterior y la comisura del hipocampo (Ramón y Cajal, 1904; Guadaño-Ferraz, 1994; Larriva-Sahd *et al.*, 2002).

En el caso de los mamíferos, la comisura anterior (CA) interconecta numerosas áreas de la porción basal del encéfalo, en particular, más no exclusivamente, al rinencéfalo y a la tercera circunvolución temporal. No obstante que en la CA convergen axones procedentes de áreas y grupos neuronales heterogéneos, en los mamíferos placentados, estas fibras se agrupan en un componente rostral o anterior (CAa) y otro caudal o posterior (CAc); un tercer componente, asociado a la CAc, lo constituye un grupo importante de fibras procedentes de la amígdala y del núcleo lecho de la estría terminal, que decusan ocupando la porción postero-superior de ésta. Cada uno de estos componentes se identifica fácilmente en cortes sagitales u horizontales a través de la CA (Ramón y Cajal, 1904; Sturrock, 1974; Larriva-Sahd, 2002). La suposición inicial de S. Ramón y Cajal de que la CAa contiene axones de estructuras olfatorias (“porción olfatoria”), mientras que la CAc contiene axones procedentes de la corteza temporal (“porción esfenooidal”) (Ramón y Cajal, 1904), ha resultado fundamentalmente correcta, sin embargo, en la actualidad se acepta que la CAa resulta de la agrupación de fibras tanto de áreas olfatorias primarias, como de las procedentes del núcleo olfatorio anterior, más que exclusivamente del bulbo olfatorio propiamente dicho (Horel y Stelzner, 1981). Por otra parte, la CAc incluye también procedentes de la corteza olfatoria primaria, así como de numerosas estructuras de la corteza olfatoria secundaria, incluyendo a la amígdala y a la isocorteza temporal. Además, y como ya se mencionó, la CAc recluta algunas fibras decusantes de la estría terminal, en

particular las que atraviesan el núcleo lecho de la estría terminal y las que se originan de éste (De Olmos e Ingram, 1972).

La organización histológica de la CA es relativamente sencilla, ya que está compuesta de axones, capilares y glía; sin embargo, esta relativa simplicidad, también inherente a la sustancia blanca en general, se ha cuestionado a partir de la observación de que ciertas neuronas pueden estar inmersas y funcionalmente relacionadas con las fibras adyacentes. Neuronas con esta localización fueron descritas inicialmente en el cerebelo y el salterio (Ramón y Cajal, 1904), e identificadas después en el cuerpo calloso de la rata adulta por Ling y Ahmed en 1974, quienes sugirieron que estas células podrían haber quedado “atrapadas” durante su migración ontogénica desde la pared ventricular hacia la corteza cerebral. Unos años después (Sturrock, 1977), al estudiar la CA del ratón, reportó la presencia de neuronas en cada una de las etapas del desarrollo embrionario, así como la densidad numérica de éstas, en las porciones anterior y posterior de la CA, pero, debido a la metodología empleada, no pudo determinar cuáles eran sus aferencias y/o proyecciones. En cambio, infirió que las neuronas interfasciculares (NIFs), hacen sinapsis con neuronas adyacentes a la CA. Posteriormente, mediante técnicas de impregnación argéntica (Larriva-Sahd *et al.*, 2002) y electrofisiología (Condés-Lara *et al.*, 2002) fue posible definir que las NIFs reciben aferencias de colaterales emitidas por los axones comisurales. Además, mediante estas técnicas, en particular el Golgi rápido, se probó la existencia de dos tipos de neuronas: las de axón corto (interneuronas) y las de axón largo (de proyección). Lo anterior, en conjunción con la observación de que las NIFs parecen recibir aferencias emitidas por las fibras adyacentes, hizo proponer que este circuito pudiera estar involucrado en el procesamiento de la información procedente de los hemisferios cerebrales, modificando la idea tradicional de que las NIFs son solo neuronas atrapadas durante el desarrollo o bien, células de relevo. Más aún, la identificación de neuronas intrínsecas o de axón corto en los sistemas comisurales, en particular la CA, es fuertemente sugestiva, sino es que concluyente de que en ésta tiene lugar la recepción y neuromodulación de la información recibida por las NIFs mediante las colaterales comisurales, diversificando así la idea tradicional de que la sustancia blanca,

y en particular la CA constituye solamente un vehículo de impulsos nerviosos entre áreas homónimas del cerebro (Larriva-Sahd *et al.*, 2002).

Puesto que, en los roedores y otros mamíferos, la CA representa la principal ruta mediante la cual se intercambia la información procedente del sistema olfatorio y límbico de cada hemisferio, se ha puesto especial atención a las diferencias estructurales de la CA en función de ciertas variables que tienen relación con estos sistemas, tales como funciones reproductivas, vegetativas y endocrinas. Entre los factores que modifican la estructura de la CA están: las hormonas sexuales (Lamantia y Rakic, 1990; Allen y Gorski, 1991 y 1992; Larriva-Sahd *et al.*, 1998; Noonan *et al.*, 1998), el estrés prenatal (Jones *et al.*, 1997), la manipulación hormonal (Guadaño-Ferraz *et al.*, 1994 y Larriva-Sahd *et al.*, 1998) y la agenesia del cuerpo caloso (Livy *et al.*, 1997), entre otros.

En la actualidad se sabe que el desarrollo del SNC de los mamíferos altriciales como los roedores, continúa después del nacimiento y que esta maduración está también determinada por la información sensorial recibida durante la etapa perinatal del desarrollo (Meisami y Timiras, 1974; Meisami, 1976). Por lo anterior, en los últimos años se ha dado particular importancia al estudio de la privación sensorial perinatal, utilizando como modelo experimental la anosmia en roedores, puesto que en las especies macrosmáticas, por definición existe un sistema olfatorio bien desarrollado. En efecto, la información transmitida por el sentido del olfato tiene un papel cardinal en la sobrevivencia de esta especie, ya que participa directamente en las funciones reproductivas, endócrinas y de defensa (Shiple y Ennis, 1996; Carleton *et al.*, 2001).

Por lo anteriormente mencionado, se infiere que la estructura de la CA puede estar influida por diferentes condiciones, ya sea inducidas experimentalmente o espontáneas. En este contexto, y puesto que sabemos que las NIFs de la CA reciben aferencias de los axones comisurales y son influenciadas por estímulos aplicados en sitios que se sabe, proyectan a través de la CA, es factible que la supresión de estímulos durante el desarrollo, en particular los olfatorios, pudieran modificar la estructura y el número de las NIFs. Este postulado constituye la hipótesis central del estudio aquí presentado. El objetivo principal es establecer el efecto de la privación

olfatoria unilateral sobre el desarrollo de la comisura anterior y las neuronas interfasciculares de ratones hemianósmicos.

RESUMEN

En este estudio se detallan el efecto de la anosmia unilateral provocada al nacimiento sobre el área de la comisura anterior (CA) y sobre su número de neuronas interfasciculares (NIFs). El efecto de la anosmia fue evaluado en ratones a las 10 semanas posteriores a la lesión en comparación con sus controles respectivos. Se estimaron el peso cerebral ipsi y contralateral a la oclusión, el diámetro medio sagital y área comisural, así como la densidad numérica de las NIFs. Se concluyó 1. que no existe diferencia significativa en el peso del hemisferio derecho (lesionado), con respecto al izquierdo; tanto entre los animales anósmicos como entre los controles; 2. el diámetro medio sagital de la comisura anterior es significativamente mayor en los machos que en las hembras controles; 3. el tratamiento provocó una disminución significativa en el área de la CA en hembras y machos así como en el número de NIFs. 4. aunque la densidad numérica de NIFs no se modificó, la disminución en tamaño de la CA en los animales anósmicos se tradujo en un número significativamente menor de neuronas en los tejidos de animales anósmicos 5. la disminución en el área comisural se atribuye a una posible disminución en número y/o diámetro de sus fibras. Lo anterior prueba que la supresión temprana de estímulos olfatorios altera las dimensiones y el número de neuronas en la CA del ratón adulto.

ANTECEDENTES

Organización del Sistema Olfatorio

El rinencéfalo o allocorteza es el nombre que von Kölliker (1896), dio a un tipo peculiar de la corteza cerebral, que se diferencia claramente de la isocorteza en que su capa plexiforme ocupa la porción más externa; dicho rasgo depende de la presencia de fibras superficiales procedentes del sistema olfatorio. En el sentido evolutivo, el olfato se ha considerado como el sentido “más antiguo” y, aunque si bien es cierto que el olfato está presente a lo largo de la escala evolutiva, y en casi todas las especies de mamíferos terrestres, no se ha demostrado que su aparición filogenética anticipe a la de otras modalidades sensoriales. Para comprender la evolución del cerebro es importante el conocimiento del cerebro olfatorio o rinencéfalo, ya que en los vertebrados primitivos casi la totalidad del cerebro tiene relación con el procesamiento de los impulsos olfatorios. En los vertebrados superiores, emergen nuevas partes del cerebro que, de manera gradual, adquieren relevancia fisiológica, cursando por procesos de desarrollo y diferenciación más complejos, caracterizados por el desarrollo del telencéfalo, en particular de su componente isocortical (Meisami y Bhatnagar, 1998), lo cual repercute en un desarrollo paralelo de los núcleos y áreas del encéfalo implicados en dichas funciones. Tal es el caso de la visión y tacto en los primates, en los que el área de representación cortical de estas modalidades excede a la correspondiente al sentido del olfato (Brodal, 1998). Por otra parte, la organización de las rutas centrales y el procesamiento de la información olfatoria, sugiere, que el desarrollo de este sistema precedió al de las partes de la neocorteza implicadas en el procesamiento de otras modalidades sensoriales, conservando su organización y elementos estructurales originales. En los vertebrados superiores numerosas partes de las regiones correspondientes al rinencéfalo, aunque tienen relación directa con el sentido del olfato, cumplen otras funciones importantes, tal como sucede con la amígdala y el hipocampo de los primates, implicados en la memoria, funciones vegetativas e integración de conductas adaptativas complejas. Lo anterior es un buen ejemplo de que durante la evolución, las estructuras que ejercen una función pueden ser base para el desarrollo y adquisición de nuevas modalidades. Tal parece ser el caso de la olfacción, en tanto que alguno de sus elementos no han tenido el mismo grado de desarrollo filogenético con respecto al resto del encéfalo, por lo que

son relativamente más pequeños en humanos que, por ejemplo en los macrosmáticos como los cánidos o los murinos (Meisami y Bhatnagar, 1998). La observación de que

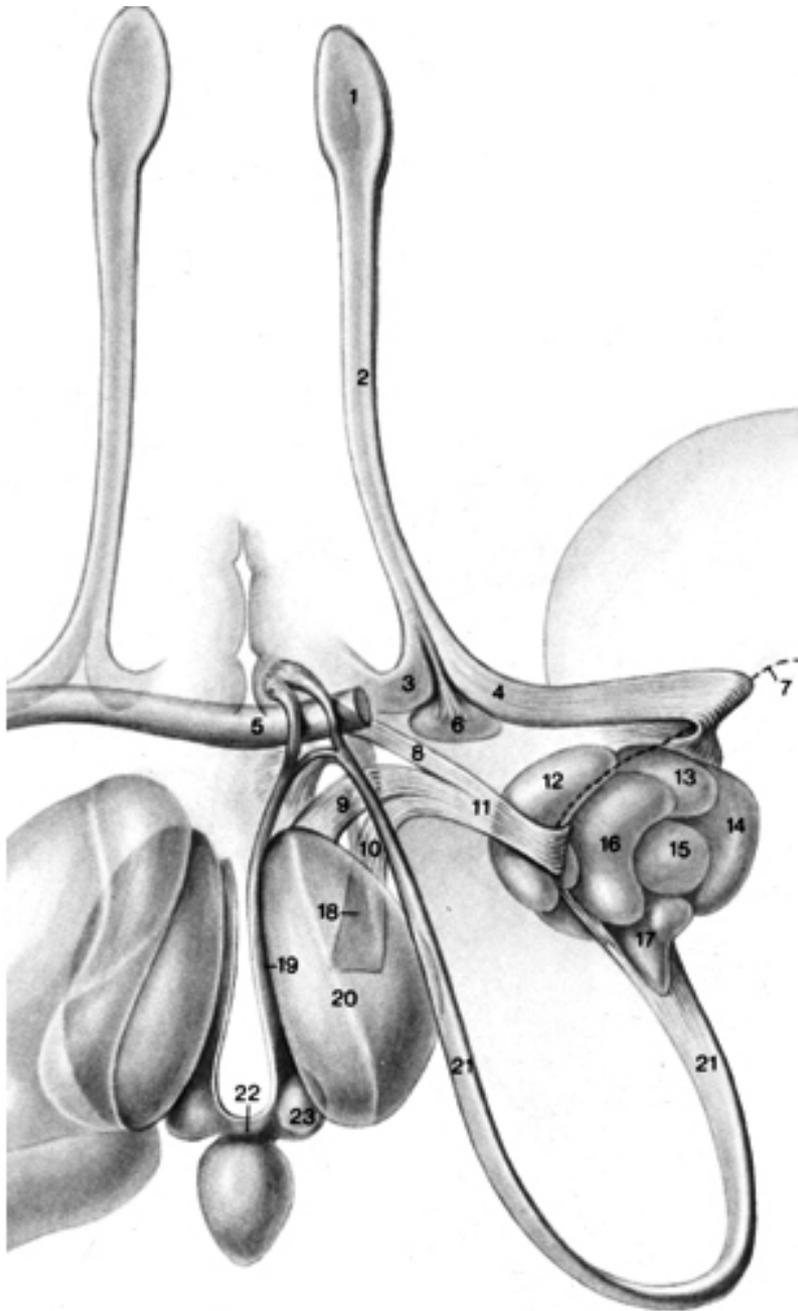


Fig. 1. Estructura parcial del rinencéfalo.

Aunque las estructuras que conforman al rinencéfalo varían entre las diferentes especies, en general, entre los mamíferos se presentan las siguientes: (1) bulbo olfatorio, (2) tracto olfatorio, (3) estría olfatoria medial, (4) estría olfatoria lateral, (5) comisura anterior, (6) tubérculo olfatorio, (7) límen insulae, (8) banda diagonal, (9) pedúnculo talámico anterior, (10) fascículo telencefálico medial, (11) fibras amigdalofugales ventrales, (12) núcleo cortical, (13) núcleo anterior, (14) núcleo lateral, (15) núcleo central, (16) núcleo medial, (17) núcleo basal, (18) área lateral del hipotálamo, (19) estría medular del tálamo, (20) núcleo medial del tálamo, (21) estría terminal, (22) comisura habenular y (23) núcleos habenulares. Modificado de *The Human CNS a synopsis and Atlas*.

estas diferencias estructurales coexisten con el desarrollo e incorporación de otras modalidades sensoriales en los procesos adaptativos, aunada a la presencia de elementos neuronales identificables en organismos evolutivamente antiguos, ha dado lugar a la idea, más filosófica que factual, de que el sistema olfatorio es “el sentido más antiguo”.

De esta forma, las estructuras olfatorias varían entre las diferentes especies, sin embargo, entre los mamíferos pueden distinguirse las siguientes en común:

Los nervios olfatorios, el bulbo olfatorio (BO) y los nervios terminales, el bulbo olfatorio accesorio (BOAc) y el órgano vomeronasal (OVN), el núcleo olfatorio anterior (NOA), los tractos olfatorio medial (TOM), y lateral (TOL), los giros olfatorios medial y lateral, el triángulo olfatorio, la sustancia perforada anterior, el tubérculo olfatorio (TuO), la banda diagonal de Broca, el lóbulo piriforme (incluye al giro olfatorio lateral, la estría olfatoria, el uncus y la corteza entorrinal), el complejo nuclear amigdaloides, las áreas septales y la formación hipocámpica, el fórnix, la estría terminal, la parte medial del tálamo, el hipotálamo, la corteza frontal media y la comisura anterior (Fig. 1).

La vía olfatoria principal

En los animales macrosmáticos como la rata y el ratón, se reconocen dos componentes del sistema olfatorio: el sistema olfatorio principal (SOP) y el sistema olfatorio accesorio (SOA). Los dos sistemas están relacionados funcionalmente, pero se consideran anatómicamente divergentes (Fig. 2). En el SOA, las neuronas receptoras localizadas en el órgano vomeronasal (OVN), están expuestas a sustancias hidrosolubles y poco volátiles, transportadas mediante un mecanismo de succión, determinado por reflejos vasculares de los elementos sanguíneos asociados al receptor del OVN. Los axones de las neuronas sensoriales vomeronasales, proyectan exclusivamente al bulbo olfatorio accesorio (BOAc), localizado en el límite dorsocaudal del BO. En la actualidad se acepta que las conexiones centrales del BO y BOAc a estructuras olfatorias de más alto orden son paralelas, pero no convergen (Shiple *et al.*, 1995). Por sus implicaciones obvias para el presente estudio, a continuación se hace énfasis en el SOP, cuya vía se inicia en la mucosa olfatoria, donde sus receptores se

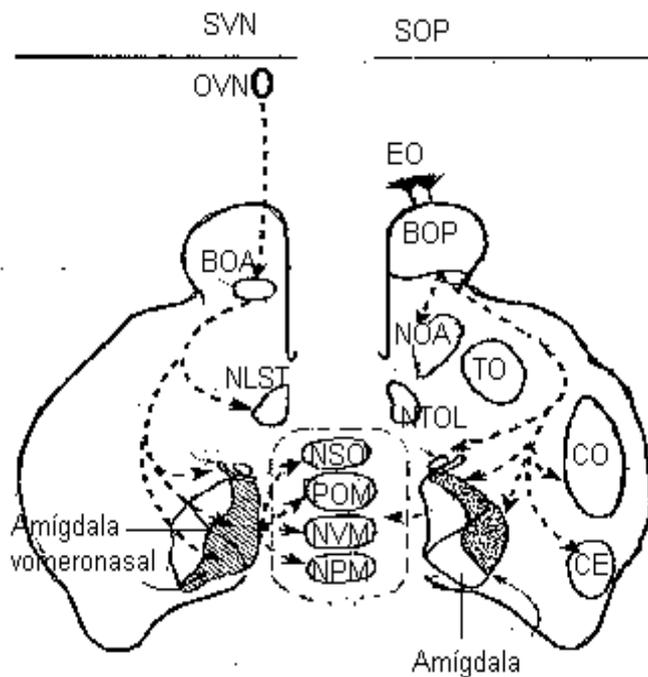


Fig. 2. Conexiones principales de los sistemas olfatorio principal (SOP) y accesorio o vomeronasal (SVN). Como se detalla, las conexiones de ambos son paralelas y no se traslapan. Epitelio olfatorio (EO); bulbo olfatorio principal (BOP); núcleo olfatorio anterior (NOA); núcleo del tracto olfatorio lateral (NTOL); tubérculo olfatorio (TO); corteza olfatoria (CO); corteza entorrinal (CE); órgano vomeronasal (OVN); núcleo del lecho de la estría terminal (NLST); bulbo olfatorio accesorio (BOA); núcleo supraóptico (NSO); área preóptica medial (POM); núcleo ventromedial (NVM) y núcleo posteromedial (NPM). *Modificado de Meisami, 1991.*

combinan con sustancias odoríferas, principalmente aquéllas que son volátiles y, por ende, transportadas en los gases atmosféricos. La mucosa olfatoria tiene un área superficial y una cantidad de receptores que varía entre las especies; por ejemplo, en el ser humano adulto tiene aproximadamente 10 centímetros cuadrados, mientras que en el gato es de 20 cm² (Purves *et al.*, 2001). Entre las células epiteliales columnares, están los receptores olfatorios, que son células que se regeneran con periodicidad aproximada de cada 30 a 60 días, y que se reemplazan de manera continua, a partir células precursoras o indiferenciadas que se encuentran en la porción basal de la mucosa olfatoria. Estos receptores son células bipolares especializadas que como ya se mencionó responden a los olores del aire inhalado, que desde su polo apical extienden una dendrita hacia la superficie de la mucosa (Fig. 3); mientras que desde el polo basal envían su axón en sentido inverso, hacia el BO, atravesando la lámina

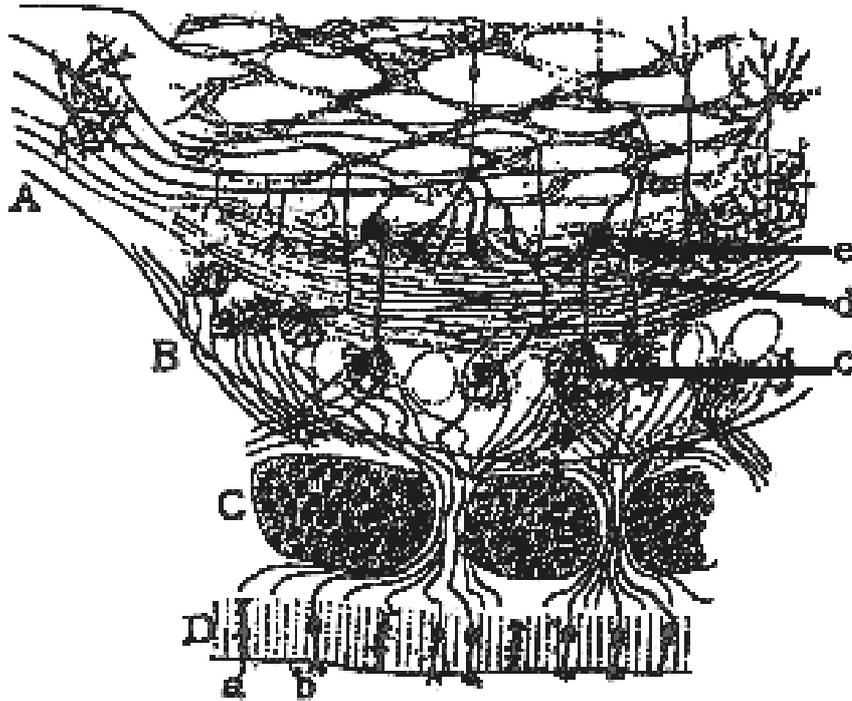
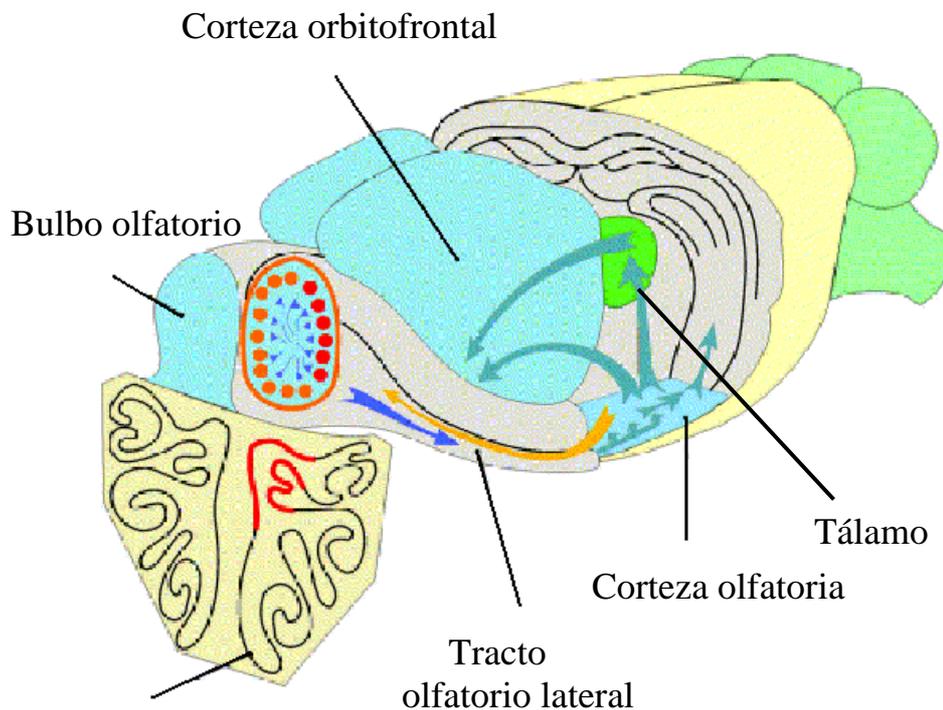


Fig. 3. La vía olfatoria. Inicia en la mucosa olfatoria (D), en donde están las células de soporte (a), con las neuronas bipolares (b), los axones de éstas últimas, hacen sinapsis con las dendritas de las células mitrales (e) y en penacho (d), en los glomérulos (c), dentro del bulbo olfatorio (B), los axones de las células mitrales y en penacho forman el tracto olfatorio (A). *Modificado de Ramón y Cajal, (1904).*

cribosa del hueso etmoides, estos axones no mielinizados forman el nervio olfatorio o primer par craneal. La proyección al BO, termina sobre una estructura esférica o glomérulo, que se encuentra bajo la capa superficial de aquel (Carleton *et al.*, 2001). Debido a la organización en capas del BO, los axones del nervio olfatorio solo se encuentran en las dos más superficiales: la capa del nervio olfatorio y la glomerular. Dentro de cada glomérulo los axones de los receptores olfatorios forman sinapsis asimétricas con las células mitrales que corresponden a neuronas de primer orden, donde se inicia el procesamiento central de la información olfatoria. En el ratón, cada glomérulo olfatorio incluye las dendritas apicales de aproximadamente 25 células mitrales y convergen en él alrededor de 25 000 axones de los receptores olfatorios, es decir, unos 1,000 axones, esta convergencia está conservada en otras especies (Purves, 2001). Una vez que las fibras del nervio olfatorio establecen contacto sináptico con las células mitrales, el axón de éstas se dirige hacia la corteza olfatoria primaria formando el tracto olfatorio (Fig. 4). Cada BO envía proyecciones



Epitelio olfatorio

Fig. 4. La ruta olfatoria. Vista coronal de la fosa nasal mostrando al epitelio sensorial olfatorio que proyecta directamente al bulbo olfatorio del sistema nervioso central. Las moléculas odoríferas y sustancias del ambiente entran a través de los nostrilos e interactúan con las neuronas sensoriales localizadas en el epitelio olfatorio. Los axones de las células mitrales y en penacho forman el tracto olfatorio lateral y hacen sinapsis con las neuronas en la corteza olfatoria. La corteza olfatoria proyecta a regiones corticales olfatorias y al núcleo medial dorsal del tálamo. (Modificado de Carleton *et al.*, 2002).

estrictamente ipsilaterales hacia la corteza olfatoria primaria. La proyección más rostral está situada dentro del pedúnculo olfatorio e incluye al núcleo olfatorio anterior (NOA), a la parte ventral de la tenia tecta y la corteza peduncular dorsal (Luskin y Price, 1983). El principal componente de la corteza olfatoria primaria, es la corteza piriforme. la cual está dividida en una parte anterior o prepiriforme y posterior o piriforme. El tubérculo olfatorio (TuO), también recibe fibras bulbares eferentes, así como del núcleo amigdaloides cortical anterior, la corteza periamigdaloides y el núcleo del tracto olfatorio lateral (TOL). Todas estas estructuras, excepto el TuO, están interconectadas recíprocamente con el BO (Warwick y Williams, 1973). En situación caudal y dorsal del BO, se encuentran grupos de neuronas de tamaño intermedio que forman el NOA. Las

dendritas de estas células pasan entre las fibras del TO del cual reciben aferencias. Los axones de las células del NOA y del núcleo del TO se cruzan en la parte anterior de la comisura anterior (CA) e ingresan al NOA, núcleo del TO y al BO contralaterales.

Conexiones olfatorias

Las conexiones del sistema olfatorio han sido extensamente estudiadas con diferentes metodologías y enfoques por los siguientes autores: Ramón y Cajal, 1904; Crosby y Humprey, 1938; Lohman, 1963; Lohman y Mentink, 1969; De Olmos e Ingram, 1972; Horel y Stelzner, 1981; Jouandet y Harstein, 1983; Luskin y Price, 1983; Itaya, 1987, entre otros. Uno de los trabajos más completos en el que se estudiaron las conexiones del BO y BOAc, mediante técnicas de lesión electrolítica y degeneración ortógrada es el de Lohman, (1963). Este autor lesionó la parte rostral del bulbo olfatorio del cobayo y encontró degeneración axonal circunscrita al tracto olfatorio; solamente cuando las lesiones incidieron en la parte caudal del bulbo olfatorio, causaron degeneración de las fibras que cursan por la comisura anterior.

El tracto olfatorio por su parte, tiene su origen principal en el bulbo olfatorio, y envía sus fibras principalmente a la corteza prepiriforme y periamigdalina; ello se confirmó ulteriormente mediante inyecciones de aglutinina de germen de trigo acoplado con peroxidasa de rábano (WGA-HRP), en el epitelio olfatorio principal y en el órgano vomeronasal, demostrando que aquel se relaciona de manera recíproca con el bulbo olfatorio principal y a la corteza olfatoria primaria ipsilateral; mientras que el OVN proyecta al bulbo olfatorio accesorio, al tracto olfatorio accesorio y termina en el núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio, los núcleos medial y posterodorsal cortical de la amígdala medial y el área posterodorsal del núcleo del lecho de la estría terminal (NLST) (Itaya, 1987). Estos resultados fueron confirmados en investigaciones posteriores en la rata, por Scalia y Winans, (1975). Más recientemente, mediante inyección de peroxidasa por presión hidráulica o micro electroforésis en el bulbo olfatorio principal y en el accesorio, se encontró que el BOP envía eferencias TOL, y a todas las porciones del NOA, excepto a su parte externa, así como a toda la corteza olfatoria primaria, al haz medial del cerebro anterior o fascículo prosencefálico medial por debajo del tubérculo olfatorio, al núcleo del brazo vertical de la banda diagonal y al núcleo del TOL y la parte ventral superficial del núcleo del brazo vertical de la banda diagonal. Otras eferencias menores son enviadas al hipocampo ventral precomisural, a la parte sublenticular de la sustancia innominada, al área anterior de la amígdala, al

núcleo amigdaloides cortical posterolateral y una región de transición entre la corteza olfatoria periamigdalina y el área entorrinal propiamente dicha (De Olmos *et al.*, 1978). El tracto olfatorio, como ya se mencionó, tiene su origen en el BO y está formado por los axones de células mitrales y en penacho. Se ha establecido que en el cobayo, existen dos rutas independientes que llevan impulsos olfatorios desde los glomérulos: un sistema célula mitral-tracto olfatorio lateral y un sistema célula en penacho-comisura anterior.

En la rata, el TOL distribuye sus fibras principalmente en las cortezas prepiriforme y en la periamigdalina (Itaya, 1987); además en la parte anterior de la comisura anterior y en el TuO. En otras especies, como en el cobayo, el TOL envía fibras al TuO, el área amigdaloides anterior y el núcleo del TOL.

Conexiones de la comisura anterior

La comisura anterior en los roedores interconecta estructuras isocorticales basales y estructuras olfatorias; mientras que el resto de la neocorteza está conectada interhemisféricamente por el cuerpo calloso (CC). En mamíferos euplacentados la comisura anterior está formada por tres componentes: el anterior (parte olfatoria), el posterior (parte interhemisférica) y el componente de la estría terminal (parte estriatal) (De Olmos e Ingram, 1972). El origen y terminación de las fibras de estas subdivisiones varía entre las especies de mamíferos, como el conejo (Van Alphen, 1969) y en la rata (De Olmos e Ingram, 1972; Jouandet y Harstein, 1983), entre otros. Se han realizado estudios para conocer el origen de cada uno de los tres componentes de la CA, basándose en técnicas de lesión de la CA e inyección de peroxidasa de rábano (HRP) en la rata y en el cobayo (Lohman, 1963), lesión electrolítica y método de coagulación laminar (Lohman y Mentink, 1969), e incisión seguida de inyección de HRP (Jouandet y Harstein, 1983).

Como resultado de estos estudios se ha encontrado que las fibras de la CA se originan en el NOA, los tubérculos olfatorios, la corteza piriforme anterior, el núcleo del tracto olfatorio lateral, el núcleo lateral, basolateral, cortical, medial y posterior de la amígdala, la corteza perirrinal y la corteza entorrinal (Jouandet y Harstein, 1983). (Fig. 5). La CA interconecta las siguientes estructuras telencefálicas: el NOA, el TuO, la corteza piriforme anterior, el núcleo del TOL, los núcleos lateral, basolateral, basomedial y cortical de la amígdala, la corteza perirrinal posterior y la corteza entorrinal, además del BO y la capa plexiforme de la corteza piriforme anterior y

posterior (Jouandet y Harstein, 1983). Las conexiones neocorticales temporales forman el componente más grande de la CA en primates incluyendo el cerebro humano, puesto que en estos microsmáticos, el componente bulbar o anterior es vestigial.

El componente anterior de la CA proyecta y recibe fibras de los tubérculos olfatorios y del NOA, la corteza piriforme anterior y frontal medial. Los dos primeros son la mayor fuente de fibras de la CAa (Jouandet y Harstein, 1983). Aunque el origen y la terminación de estas fibras varía entre las especies, el plan general de proyección antes descrito no muestra variaciones cualitativas significativas entre los mamíferos no marsupiales (Lohman y Mentink, 1969; Van Alphen, 1969; De Olmos e Ingram, 1972; Jouandet y Harstein, 1983).

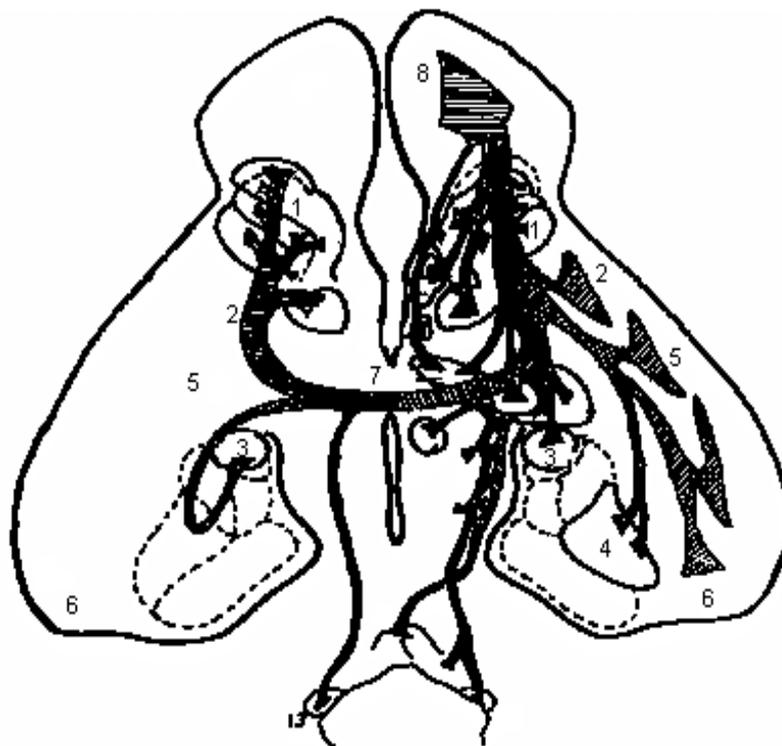


Fig. 5. Las fibras que cruzan por la comisura anterior se originan en el núcleo olfatorio anterior (1); tubérculo olfatorio (2); núcleo del tracto olfatorio lateral (3); núcleos basomedial, basolateral y cortical de la amígdala (4); corteza olfatoria primaria (5) y corteza entorrinal (6). Estas fibras proyectan contralateralmente a través de la comisura anterior (7), a la corteza piriforme anterior y posterior, el NOA y al BO (8). Modificado de De Olmos *et al.*, (1978).

El contingente posterior de la CA de la rata recibe la mayoría de sus fibras de las células piramidales de la corteza perirrinal y la neocorteza temporal, así como una contribución sustancial de axones de la amígdala.

Las fibras del componente posterior en la rata corren lateralmente en la porción medial de la cápsula interna (Jouandet y Harstein, 1983).

Finalmente, el componente comisural de la estría terminal consiste en un pequeño fascículo adosado a la porción caudal de la CA. Este, se origina del núcleo del TOL y una parte adicional del complejo amigdaloides. Las células de origen de estas fibras, están localizadas en los núcleos amigdaloides cortical, basomedial y basolateral.

Tal y como lo comentan de Olmos e Ingram, este componente comisural, corresponde a una vía decusante puesto que sus fibras aunque terminan contralateralmente, un número importante de éstas, lo hacen en sitios diferentes a sus orígenes.

Estructura histológica de la comisura anterior

En un contexto general, la estructura histológica de la CA está constituida por fascículos de axones mielínicos y amielínicos, oligodendrocitos, astrocitos y microglia perivascular. No obstante esta constitución, sus diferencias en el calibre de las fibras, el grado de mielinización y el tamaño de los oligodendrocitos, permiten identificar fácilmente sus componentes anterior y posterior (Ramón y Cajal, 1904 y Larriva-Sahd *et al.*, 1998 y 2002). (Fig. 6).

El desarrollo y estructura de la comisura anterior puede ser modificada por algunos factores, tales como las hormonas. Así, se ha demostrado que estas juegan un papel importante en el desarrollo de la CA, puesto que la administración perinatal de testosterona induce hipertrofia de ésta en ratas adultas. Lo anterior prueba que los andrógenos modifican la estructura de las proyecciones axonales, resultando en una mayor área en la porción rostral de la CA (Larriva-Sahd *et al.*, 1998). En contraste, la administración perinatal de drogas antitiroideas (metimazol) provoca reducción en el área de la CA, siendo ligeramente mayor el efecto en la porción anterior (Guadaño-Ferraz *et al.*, 1994).

Función de la comisura anterior

En monotremas y marsupiales, animales en los que no existe cuerpo calloso (CC), se ha encontrado que la comisura anterior es relativamente más grande que en euterinos,

siendo la propia CA la principal ruta interhemisférica (Granger y Masterton, 1985). En ratones y hamsters carentes de CC, por agenesia de éste, se ha encontrado que el área de la CA no muestra variaciones significativas en número o diámetro de los axones mielinizados; no obstante, el número de los axones no mielinizados es aproximadamente 17% mayor. Es decir, que el número de fibras de la CA de animales sin cuerpo calloso es mayor, por lo que se infiere que la comisura anterior transmite las fibras interhemisféricas callosales con lo que compensa funcionalmente la pérdida del cuerpo calloso (Livy *et al.*, 1997).

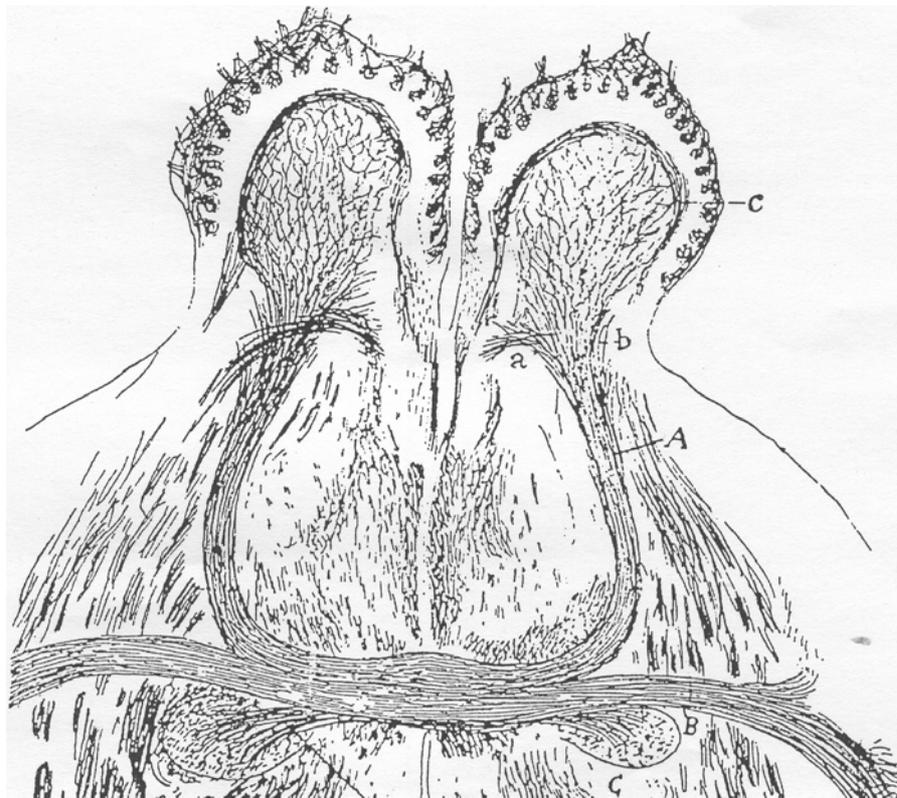


Fig. 6. La comisura anterior del ratón. Corte coronal del cerebro de ratón en donde se distinguen las tres partes de la comisura anterior. A: componente anterior, B: componente posterior, y D: componente estriatal. Además, C: fórnix, a: haz dorsal terminal de la comisura, b: haz principal o lateral y c: bulbo olfatorio. Tomada de Ramón y Cajal, (1904).

Mediante pruebas de habituación y corte de la CA, se ha demostrado que ésta es el sustrato por medio del cual ocurre la transferencia interhemisférica de información olfatoria y posiblemente, la consolidación del aprendizaje olfatorio (King y Hall, 1990). Adicionalmente, se ha visto que en el mono Rhesus tanto la CA como el cuerpo calloso participan en la transferencia de información visual. Al parecer el esplenio y la CA

pueden proveer información desde el campo visual ipsilateral a neuronas de la corteza temporal opuesta (Gross *et al.*, 1977). En apoyo de esta hipótesis, está la observación de que estímulos eléctricos administrados en la superficie de un hemisferio alcanzan el área homónima contralateral a través de la CA (Condés-Lara *et al.*, 2003).

Neuronas Interfasciculares

La presencia de neuronas y neuropilo dispuestos entre los fascículos axonales de la CA, fueron originalmente descritos por Sturrock, (1977). Inicialmente se supuso que dichas neuronas reciben aferencias procedentes de las neuronas adyacentes a la CA y, por las características metodológicas de ese estudio, solamente se detalló su estructura mediante microscopia de luz y electrónica. Más recientemente, mediante técnicas de impregnación argéntica, Larriva-Sahd *et al.*, (2002), han demostrado que las NIFs reciben aferencias a partir de colaterales emitidas por los axones comisurales adyacentes. Más aún, en cortes procesados mediante la técnica de Golgi y sus variantes, se demuestra la existencia de dos subtipos de NIFs (Fig. 7): de proyección (axón largo) e internunciales (axón corto). Lo anterior, en conjunción con los registros electrofisiológicos realizados en las NIFs (Condés-Lara *et al.*, 2002 y 2003), apuntan a que estas células están involucradas en el procesamiento de información interhemisférica (Larriva-Sahd *et al.*, 2002). Con estos antecedentes, se ha propuesto un modelo (Larriva-Sahd *et al.*, 2002). (Fig. 8), que detalla la posible participación de estas neuronas en el procesamiento de información dentro de la propia CA. Dicho modelo propone que: 1. La información generada en los sitios de proyección hacia la CA, alcanzan a ésta y pueden controlar la actividad de las NIFs, mediante las colaterales comisurales que parecen terminar en éstas; 2. Los impulsos comisurales activan también a las NIFs de axón corto; 3. La actividad de las NIFs de proyección está controlada tanto por las aferencias comisurales, como por las enviadas por neuronas de axón corto; 4. Los axones de las NIFs de proyección transmiten la respuesta hacia otros sitios del encéfalo, posiblemente hacia las áreas homónimas de este. La identidad neuronal de las NIFs se confirmó mediante registros electrofisiológicos extracelulares, puesto que la aplicación de estímulos eléctricos en los sitios adyacentes (Condés-Lara *et al.*, 2002) y distantes (Condés-Lara *et al.*, 2003), modifican la frecuencia de descarga espontánea de estas células (Condés-Lara *et al.*, 2002). Adicionalmente, Condés-Lara *et al.*, 2003, han hecho posible establecer que el modelo inicialmente postulado en general, es correcto, por lo menos en dos de

sus aspectos. Primero, la aplicación de estímulos eléctricos en el núcleo olfatorio anterior, la corteza infralímbica y el núcleo posterior de la amígdala, modifican la frecuencia espontánea de descarga de las NIFs, con períodos de latencia corta, lo cual demuestra una interacción monosináptica entre las neuronas de proyección de estas áreas y las NIFs. Además, la observación de que algunos estímulos eléctricos aplicados al núcleo posterior de la amígdala provocan la aparición de potenciales de acción en las NIFs, seguidos de un período de supresión o inhibición de la frecuencia espontánea, sugieren la presencia de recurrencias inhibitorias emitidas por las NIFs. Puesto que observaciones realizadas en nuestro laboratorio prueban la presencia de NIFs que expresan el RNAm para la enzima que sintetiza GABA (glutamato descarboxilasa), parece ser que la respuesta antedicha, podría estar mediada por una interneurona inhibitoria, posiblemente gabaérgica.

Por lo expresado en párrafos anteriores, resulta evidente que la vía olfatoria alcanza un elevado grado de complejidad estructural en los animales macrosmáticos, representada por sus numerosos relevos centrales, así como por las diferentes vías que les concatenan. Tal vez una importante excepción del sistema olfatorio sea la comisura anterior, en tanto que el origen y proyección de las fibras que le constituyen son bien conocidas (Lamantia y Rakic, 1990; Huerta-Ocampo, 2003). A estas ventajas se suma que, a diferencia de la mayor parte de los núcleos relacionados con la olfacción, las NIFs están enteramente confinadas a este tracto, haciendo sencilla su identificación. Además, y en franco contraste con la vasta convergencia de tractos y fibras colaterales de las estructuras adyacentes hacia la mayoría de las estructuras rinencefálicas, las aferencias de las NIFs, están restringidas a las colaterales emitidas por las fibras comisurales adyacentes. En conjunción con estas características está el hecho de que tanto la CA como las NIFs están relativamente aisladas, ya que están sólo rodeadas de pequeñas áreas de neuropilo (Larriva-Sahd *et al.*, 2002). Estas peculiaridades hacen suponer que las NIFs pueden ser un modelo idóneo para establecer las posibles repercusiones estructurales de ciertos factores epigenéticos sobre la diferenciación neuronal.

La anosmia como modelo experimental

A partir de estudios realizados en el sistema visual, se sabe que la supresión de estímulos fotónicos influye de manera significativa sobre el desarrollo de las áreas del encéfalo relacionadas con esta modalidad sensorial; es decir, la instauración

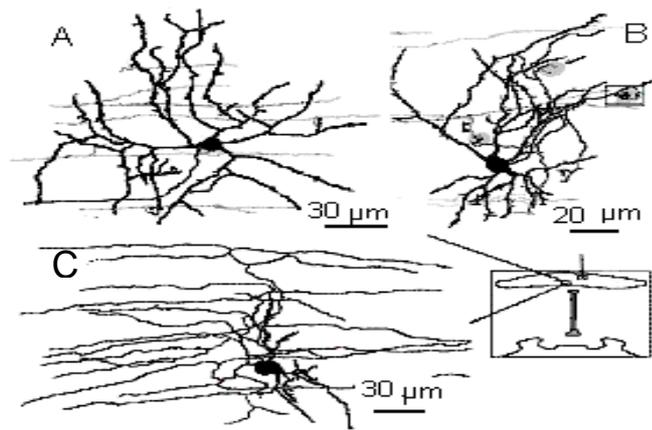


Fig. 7. Tipos de neuronas interfasciculares en la parte caudal de la comisura anterior de la rata (recuadro). *A*: neurona de proyección, *B*: neurona de asociación, *C*: neurona de proyección bilateral. Tomado de *Larriva-Sahd et al., (2002)*.

oportuna de impulsos provenientes de la retina permite la consolidación funcional y estructural de la vía y centros relacionados con la visión (Meisami, 1976). Los estudios sobre el tema han mostrado que la privación sensorial durante los denominados períodos críticos del desarrollo, conduce a cambios involutivos en la organización y fisiología de las estructuras sensoriales, incluso aquellas indirectamente relacionadas con la visión. Si la privación sensorial ocurre durante el período crítico durante el cual el sustrato anatómico del sistema sensorial es vulnerable, los cambios a menudo son permanentes; si, por otra parte, la privación de estímulos ocurre fuera del período crítico, generalmente tiene un efecto moderado (Maruniak, 1995). Una gran parte de estos estudios se ha realizado mediante supresión de estímulos visuales (Meisami y Timiras, 1971 y 1974; Pearson *et al.*, 1981; Tong *et al.*, 1982; Orona *et al.*, 1984; Spear, 1985, entre otros), mientras que más recientemente se ha recurrido a la privación olfatoria (anosmia).

Como se ha detallado, el sistema olfatorio principal es importante en forma particular en los roedores, ya que participa en los aspectos conductuales y endocrinológicos de la reproducción, en las respuestas emocionales, agresión, y en el reconocimiento de individuos. La olfacción también juega un papel muy importante en la memoria y el aprendizaje (Adamopoulos *et al.*, 1992; Shipley y Ennis, 1996). Por ello resulta evidente que, las estructuras relacionadas con este sentido, alcancen un máximo desarrollo y complejidad en las especies macrosmáticas. Tal es el caso de la rata y el ratón, que

representan un modelo experimental idóneo para el estudio de las estructuras relacionadas con el olfato.

La anosmia puede producirse experimentalmente por lesión periférica, bulbectomía o lesión o por destrucción de la mucosa olfatoria (Meisami, 1976). Los efectos de la privación se han estudiado principalmente en roedores (Meisami, 1976; Dessi-Fulgheri *et al.*, 1980; Brunjes, 1985; Skeen *et al.*, 1986; Frazier-Cierpial y Brunjes, 1989; Boehm y Aron, 1990; Corotto *et al.*, 1994; McLean *et al.*, 2001), en los que resulta claro que la supresión del sentido del olfato provoca una serie de alteraciones en el sistema nervioso central y periférico (Maruniak, 1995).

Así, los roedores que al nacer son privados unilateralmente del olfato tienen bulbos olfatorios que son casi 25% más pequeños del lado ocluído en relación al control (Meisami, 1976; Brunjes, 1985; Brunjes y Frazier-Cierpial, 1986). Más aún, la privación olfatoria de la rata recién nacida, ocasiona que las dos capas que contienen células en penacho en el bulbo olfatorio (plexiforme externa y glomerular), sean significativamente más pequeñas del lado privado que del contralateral y la disminución de sus dimensiones parece deberse a un decremento en la sinaptogénesis y desarrollo dendrítico. Además, se ha sugerido que algunas de estas alteraciones en tamaño podrían resultar de un proceso alterado de migración y/o de una mayor incidencia de muerte celular (Skeen *et al.*, 1986). Otros factores que contribuyen al desarrollo

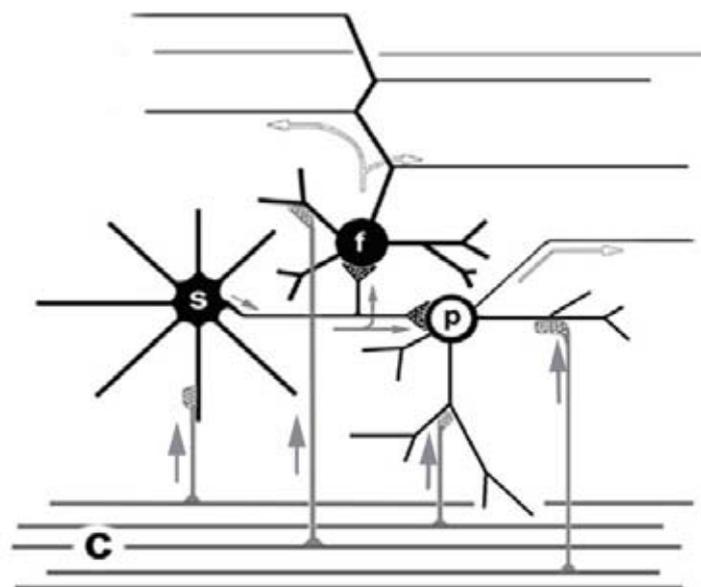


Fig. 8. Circuito neuronal propuesto en la comisura anterior de la rata. Las neuronas de asociación (s), de proyección unilateral (p) y furcadas (f), estarían recibiendo impulsos de las fibras comisurales (C) y procesándolos. Tomado de Larriva-Sahd *et al.*. (2002).

anormal de los grupos neuronales relacionados con la olfacción derivan de la pérdida de blancos sinápticos por el desarrollo tardío de la población de células granulosas, lo que también sugiere que su diferenciación puede estar alterada (Frazier-Cierpial y Brunjes, 1989; Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002). Puesto que la privación olfatoria provoca un decremento en la expresión del Factor Neurotrófico Dependiente del Cerebro (BDNF), se propone que esta deficiencia podría repercutir adicionalmente a las deficiencias celulares y sinápticas descritas en la anosmia experimental (Mc Lean *et al.*, 2001). El período crítico para la disminución del volumen laminar de las capas del bulbo olfatorio causada por la anosmia ocurre cuando la oclusión se realiza durante los primeros 12 días de vida (Brunjes, 1985).

En lo referente a la conducta, la anosmia provocada experimentalmente en el ratón, por la remoción del bulbo olfatorio, elimina ciertos aspectos del comportamiento maternal en hembras lactantes y vírgenes. Así, se ha encontrado que las ratas anósmicas no muestran la conducta de recuperación de las crías (Ehret y Buckenmaier, 1994; Poindron *et al.*, 2001), existe un efecto inhibitorio en la conducta de monta en la rata, además de que provoca alteración del patrón de alimentación (Bohem y Aron, 1990). Este comportamiento coexiste con importantes alteraciones en el patrón de secreción hormonal. Las alteraciones además, se modifican diferencialmente en ratas anósmicas con o sin experiencia sexual, pues la anosmia en ratas macho sexualmente expertas produce un decremento en los niveles plasmáticos de testosterona (T) y estradiol (E) y un incremento en dihidrotestosterona (DHT) y corticosterona, mientras que en ratas inexpertas, la anosmia causa incremento en los niveles de DHT. Estas observaciones sugieren que los estímulos olfatorios pueden influir sobre la secreción de T, E, DHT y corticosterona y que la experiencia previa también determina su patrón de secreción influye sobre estas secreciones (Dessi-Fulgheri *et al.*, 1980).

La lesión de las vías centrales relacionadas con el olfato, como el pedúnculo olfatorio, el tracto olfatorio y la comisura anterior, resulta en severas deficiencias en la retención de la memoria y en el aprendizaje. Puesto que las lesiones circunscritas al TOL tienen poco, o ningún efecto, sobre la retención de experiencias, parece ser que las rutas olfatorias intermedias o laterales no son esenciales para “oler”, por lo que se ha sugerido que los eventos conductuales relacionados con función olfatoria, pueden estar mediados por las proyecciones del bulbo olfatorio hacia los centros de integración

olfatoria distribuidos en la porción medial del encéfalo (Slotnick y Berman, 1980; Slotnick y Schoonover, 1992).

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer el efecto de la privación olfatoria unilateral sobre el desarrollo de la comisura anterior y las neuronas interfasciculares en ratones hemianósmicos.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la hemianosmia sobre el área de la CA y sobre la densidad
numérica de las NIFs
2. Determinar un posible efecto de lateralidad causada por la hemianosmia sobre el
área de la comisura anterior y sobre su densidad neuronal.

HIPÓTESIS

La supresión unilateral de estímulos olfatorios a partir del nacimiento provoca hipotrofia de la CA y disminución de la densidad numérica de las NIFs ipsilaterales en el ratón adulto.

JUSTIFICACIÓN

El sentido del olfato juega un papel central en las funciones de relación, apareamiento y endocrina de las especies macrosmáticas. Concurrentemente, el desarrollo estructural y fisiológico normal de este sistema, tiene estrecha relación con la estimulación perinatal de sus receptores y, en consecuencia, de sus vías centrales. Lo anterior está en consonancia con numerosas observaciones realizadas en animales con anosmia provocada, en los que se identifican alteraciones anatómicas y conductuales; las primeras atribuidas a la ausencia o disminución de algunos factores tróficos reconocidos como necesarios para la diferenciación neuronal adecuada; mientras que las alteraciones conductuales y endocrinas parecen resultar de la carencia de

estímulos y, en consecuencia, de los impulsos nerviosos procedentes del receptor y de las vías olfatorias correspondientes. Adicionalmente, dado que la CA representa a las fibras de proyección de neuronas en áreas isocorticales y alo corticales relacionadas con la integración de estímulos olfatorios, es factible que la supresión o disminución de estímulos altere su estructura y posiblemente el número de fibras comisurales. En consecuencia y dado que la única aferencia conocida de las NIFs son las colaterales emitidas por los axones comisurales, es plausible que la anosmia experimental también provoque alteraciones estructurales en estas células.

MATERIAL Y MÉTODOS

En todos los casos se utilizaron ratones albinos *Mus musculus* de la cepa CD-1 de 10 semanas de edad. Los sujetos fueron obtenidos del Bioterio del INB y mantenidos en condiciones constantes de temperatura (21 ± 2 °C) y humedad (45-60%), teniendo acceso libre a agua y alimento para roedores (Rodent Lab Diet 5001 de PMI). Los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-O62-ZOO-1999 y avalados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Grupos experimentales

Los grupos experimentales constaron de 6 sujetos cada uno y fueron divididos como sigue:

Grupo 1. Machos control.

Grupo 2. Hembras control.

Grupo 3. Machos hemianósmicos.

Grupo 4. Hembras hemianósmicas.

Los grupos se obtuvieron mediante el apareamiento durante una noche de machos sexualmente competentes con hembras en estro. Transcurrido este lapso, se practicaron frotis vaginales a todas las hembras y la observación de espermatozoides permitió designar el primer día de la gestación. Solamente los animales nacidos el día 21 de la gestación fueron incluidos en el estudio. Al término de la ingesta de membranas y restos placentarios, la madre fue separada de las crías y a la mitad de las hembras y machos de cada camada se les críoanestesió y aplicó una aguja incandescente en la porción lateral externa de la narina derecha, simulando así la lesión en los controles. Estos individuos formaron los grupos 1 y 2. Al resto de las crías de cada camada, también bajo críoanestesia, se le ocluyó la narina derecha mediante una aguja previamente expuesta a una flama de gas butano (Meisami, 1976). Al término de 30 minutos, los animales fueron devueltos a su madre.

Este método se empleó porque el epitelio olfatorio queda intacto y de ésta forma puede estudiarse el efecto neto de la restricción olfatoria unilateral neonatal sobre el área de la CA y sobre la densidad de las NIFs en la misma. Los animales que resultaron totalmente ocluidos y con peso de adulto mayor a 25 grs formaron los grupos 3 y 4.

Sacrificio y fijación

A los animales experimentales se les sometió a los siguientes criterios de inclusión:

- a) que la narina derecha estuviera completamente ocluida, lo cual se comprobó inspeccionando el macizo facial al microscopio estereoscópico.
- b) que el peso de los animales fuera mayor de 25 grs.
- c) que tuvieran 10 semanas de edad.

Tanto los animales experimentales como los controles, fueron pesados antes de ser sacrificados a las 10 semanas de edad.

El procedimiento para la obtención de los tejidos fue como sigue. Bajo anestesia profunda con pentobarbital, se practicó una toracotomía bilateral, y exponiendo los contenidos mediastinales se inyectó 0.2 ml de heparina (PiSA Farmacéutica Mexicana No 093689) (10000 ui/ml) en el ventrículo izquierdo. Posteriormente, se colocó una aguja en el ventrículo izquierdo, haciendo pasar 20 ml de solución salina, seguidos de solución fijadora. Esta consistió en una mezcla de glutaraldehido (Electron Microscopy Sciences No 16312) y paraformaldehido (J. T. Baker No 3090-01), al 2 y 4%, respectivamente, disueltos en amortiguador de fosfatos (J. T. Baker No 3090-01), 0.15 M, a un pH de 7.3. Al concluir la perfusión, el cadáver fue decapitado y el encéfalo retirado del cráneo. Posteriormente, el encéfalo fue pesado en una balanza analítica (Scientech 250 X 0.001 grs), y luego inmerso en fijador frío (4°C) recién hecho en donde se almacenó por 12 horas a esta temperatura. Finalmente, del encéfalo se obtuvo la comisura anterior en bloque, mediante cortes realizados con una hoja de rasurar. El lado derecho del bloque fue identificado mediante una oquedad hecha al bloque con la navaja.

Obtención y procesamiento de las muestras

El bloque resultante tuvo un grosor no mayor de 0.5 mm y fue lavado durante 30 min en el mismo buffer empleado como vehículo de fijación. Posteriormente, el tejido fue posfijado por una hora en tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Sciences No 19110), al 1% diluido en solución de fosfatos (ver antes). Ulteriormente, se lavó en solución de fosfatos, practicando tres cambios de diez minutos cada uno en esta solución. Los tejidos se deshidrataron en acetona e incluyeron en plano en resinas epóxicas.

El corte se realizó en un microtomo de progresión térmica, con cuchillas de vidrio. El bloque fue cuidadosamente cortado en el plano coronal y se obtuvieron cortes seriados a través de la CA. Para tal efecto, el ultramicrotomo fue ajustado para cortar a 700 nm de espesor y se colectaron diez cortes después de 20 de “rebaje”. (que se desecharon). Los cortes seleccionados fueron montados y adheridos con calor a portaobjetos, numerados secuencialmente y teñidos con una solución alcalina de azul de toluidina (Hycel de México No 464).

Para evaluar el efecto de la hemianosmia sobre el peso de los hemisferios cerebrales ipsi y contralateral a la lesión, y dado que los encéfalos ya se habían procesado para la obtención de la comisura completa, se procedió a obtener de nuevo los cuatro grupos (controles y hemianósricos), a los que se sometió al mismo procedimiento ya descrito, hasta la obtención de los encéfalos y entonces con una cuchilla se cortaron los dos hemisferios y se pesaron por separado.

Morfometría

Microscopía de luz. Los cortes obtenidos como se describió fueron etiquetados con una clave que impidió al observador inferir el grupo de procedencia. El área cuantificada de la CA comprende de extremo a extremo, la parte donde se unen los limbos anterior y posterior a partir del limbo anterior de la misma hasta el punto donde desaparece caudalmente, en corte coronal. Para evaluar un posible efecto de la hemianosmia sobre el área y densidad neuronal ipsi y contralateral, se midió el área derecha (ipsilateral a la lesión) por separado del área izquierda (contralateral a la lesión), para lo cual se separaron ambas áreas mediante el trazo de una línea vertical a la mitad de la comisura anterior, tomando como punto de referencia el tercer ventrículo como se muestra en la Figura 9. Para la cuantificación del área se utilizó programa “IP- LAB” (Scanalytics, Inc). A continuación se determinó el número de neuronas y su densidad numérica (definida como el número de neuronas por unidad de área), para cada lado utilizando el mismo programa. Solo se contaron aquellas neuronas en que se observó al microscopio a una amplificación de X40, un núcleo grande con nucléolo. Los datos resultantes fueron agrupados en función de sexo-tratamiento-lado y comparados mediante ANOVA cuando la distribución fue normal y en caso contrario se utilizaron pruebas no paramétricas, para determinar el efecto del tratamiento sobre los pesos de los

encéfalos completos, por separado, el diámetro sagital y área de la CA y densidad neuronal de las NIFs de la CA, con un nivel de significancia estadística de 0.05 o menor.

RESULTADOS

Obtención de grupos experimentales

De cada camada se obtuvo la mitad de las crías para ocluir y al resto se le simuló la lesión bajo críoanestesia.

Los dos grupos, hembras y machos hemianósmicos, se obtuvieron a partir de la oclusión de 54 animales. Como ya se consignó, los animales que no mostraron oclusión completa, que tuvieron peso muy bajo (menor de 25 grs), o bien que murieron antes de las 10 semanas, fueron desechados. Con relación al peso corporal, se observó la presencia de enanismo en dos de las hembras ocluídas, mismas que también fueron desechadas.

Peso corporal

Los promedios de los pesos corporales de los cuatro grupos aparecen en la gráfica 1. No existe diferencia significativa en los pesos corporales de los grupos control macho y hembra, ni entre los experimentales, pero hay un efecto del tratamiento sobre el peso entre machos control comparados con las hembras y con los machos hemianósmicos siendo mayor en los animales control ($P < 0.05$).

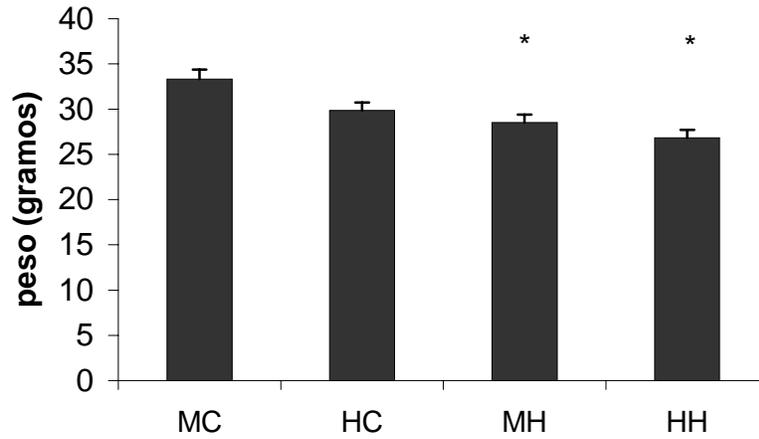
Peso de los hemisferios cerebrales

Para evaluar un posible efecto de la privación unilateral sobre el peso de los hemisferios ipsi y contralateral a la lesión, de hembras y machos se realizó un análisis de varianza, que indicó que no hubo un efecto significativo en función del tratamiento o sexo sobre el peso de los hemisferios cerebrales ni en hembras ni en machos ($p > 0.05$) (Gráf. 2). Al comparar el peso de los cerebros completos, se encontró que no existe diferencia significativa en el peso de los cerebros entre hembras y machos controles, ni hubo efecto del tratamiento sobre el peso de los encéfalos ($P > 0.05$) (Gráf. 3).

Diámetro medio sagital de la comisura anterior

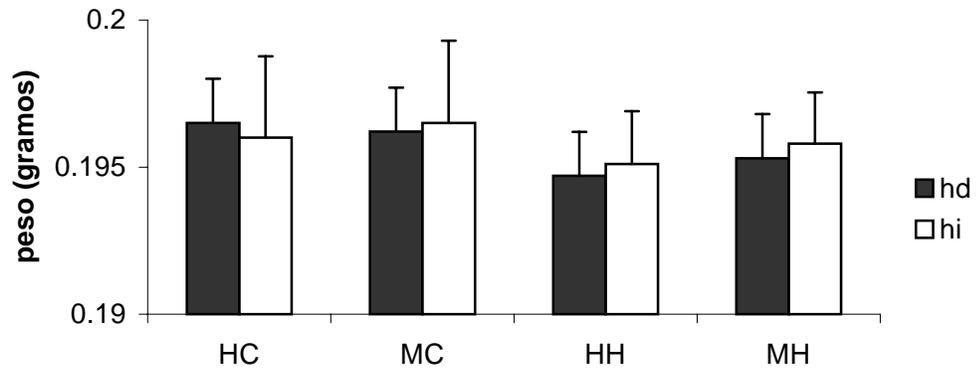
El diámetro medio sagital de la comisura anterior para los cuatro grupos se muestra en la gráfica 4. Como los datos no mostraron una distribución normal, se recurrió a una

PESO CORPORAL



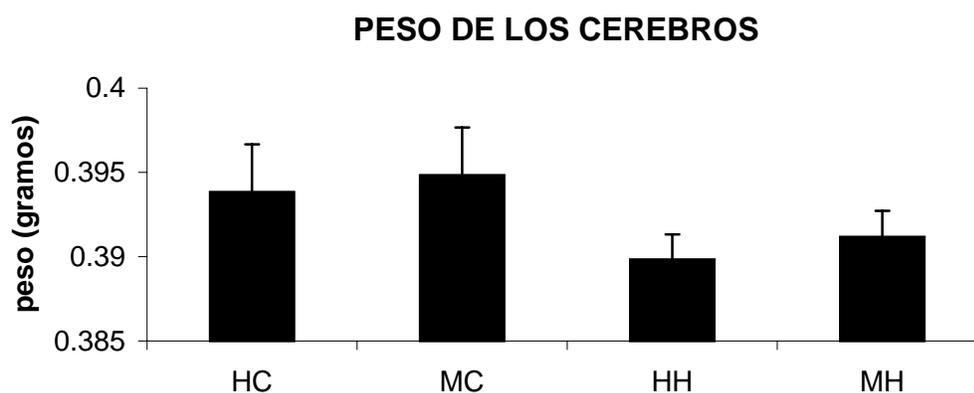
Gráf. 1. Promedio de los pesos corporales por grupos (MC= machos control; HC= hembras control; MH= machos hemianósmicos; HH= hembras hemianósmicas). Se graficaron los promedios y errores estandar. N=6 y $P < 0.05$.
*diferente de MC

PESO DE LOS HEMISFERIOS CEREBRALES



Gráf. 2. Peso de los hemisferios cerebrales por grupos (HC= hembras control; MC= machos control; HH= hembras hemianósmicas; MH= machos hemianósmicos; hd= hemisferio derecho y hi= hemisferio izquierdo). Se graficaron los promedios y error estándar. N=6.

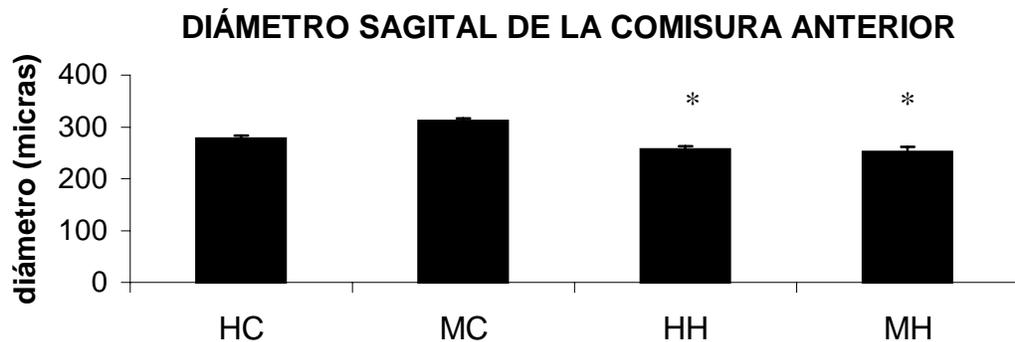
prueba no paramétrica o de rangos de Kruskal-Wallis, la que indicó que el diámetro medio sagital de los machos control es diferente significativamente al resto de los grupos ($p < 0.05$). El grupo, o grupos, que difieren se obtuvieron mediante un procedimiento de comparación múltiple (Método Student-Newman-Keuls). Esta prueba indicó que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre machos control y el resto de los grupos.



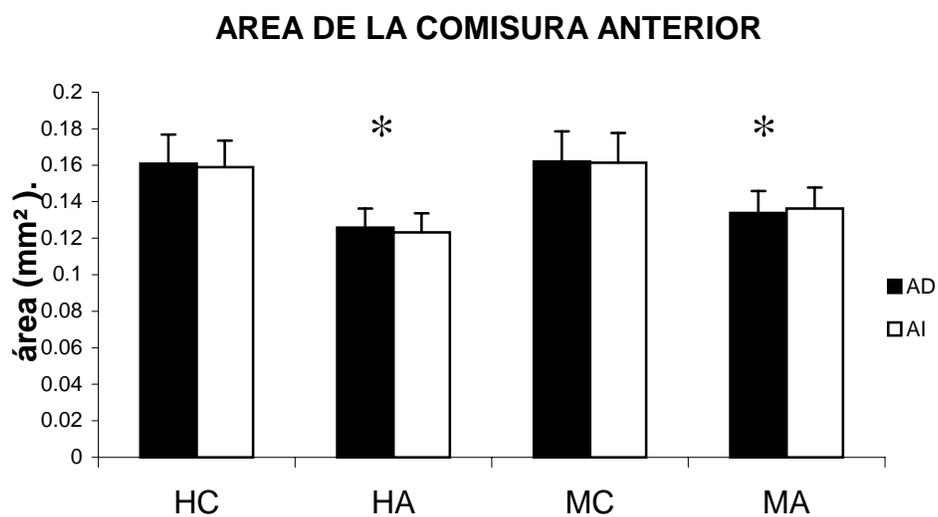
Gráf. 3. Peso de los cerebros por grupos (HC= hembras control; MC= machos control; HH= hembras hemianósmicas y MH= machos hemianósmicos). Se graficaron los promedios y el error estándar. N=6.

Área de la comisura anterior

Con los datos obtenidos de la cuantificación de las áreas, se realizó una prueba de ANOVA de tres vías (sexo X tratamiento X lado), con un factor de medidas repetidas en el factor lado. Para el área de la CA no hubo efectos de lateralidad ni del sexo, pero si del tratamiento (hemianosmia), $F(1, 20) = 31.725$, $p < 0.005$ (Gráf. 5). Posteriormente, se hizo la prueba post hoc de Tukey, la que probó que el área de la CA los machos y hembras controles es diferente de la de las hembras y machos hemianósmicos ($p < 0.05$). En la Figura 10, se muestran áreas de la CA equivalentes para cada grupo. La disminución en el área de la comisura anterior puede apreciarse en las micrografías C y D que corresponden a los grupos de hemianósmicos, en comparación con los controles.



Gráf. 4. Diámetro sagital de la comisura anterior por grupo (HC= hembras control; MC= machos control; HH=hembras hemianósmicas; MH= machos hemianósmicos). Se graficaron los promedios y los errores estándar; * es diferente de MC. $p < 0.05$. N=6.



Gráf. 5. Área promedio de la comisura anterior por hemisferio y grupo (HC = hembra control, HA = hembra hemianósmica, MC = macho control, MA = macho hemianósmico, AD = área derecha y AI = área izquierda). Se graficaron los promedios y el error estándar. $P < 0.05$. N = 6. *diferencia entre los grupos control y los hemianósmicos.

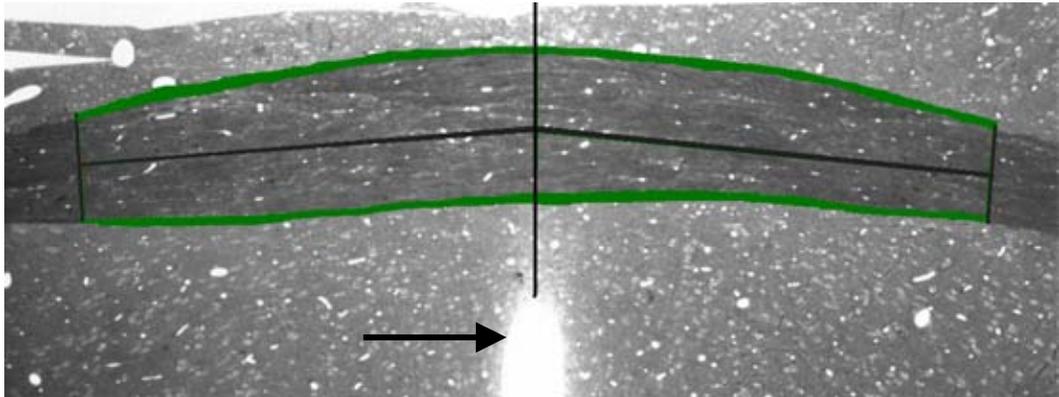


Fig. 9. Micrografía de la comisura anterior. Corte horizontal en donde se muestra el área cuantificada. El área cuantificada es la que cae dentro de una línea de 0.74 mm, que es la longitud promedio donde se unen la parte rostral y caudal de la comisura. La flecha señala el tercer ventrículo.

Densidad neuronal

En la Figura 11, se señalan algunas neuronas interfasciculares, de las que sobresalen sus núcleos prominentes y uno o varios nucléolos, también puede apreciarse sobre todo en (A), las presencia de un núcleo lobulado que es resultado de una marcada invaginación.

Los datos del número de NIFs por unidad de área fueron analizados mediante una prueba de Kruskal-Wallis, porque los datos no mostraron distribución normal. Esta prueba concluyó que la diferencia que existe en densidad entre los diferentes grupos no es significativa. Aunque el número de neuronas es mayor en los grupos controles, la reducción en el área de la comisura anterior de los experimentales, provocó una disminución del efecto (Gráf. 6).

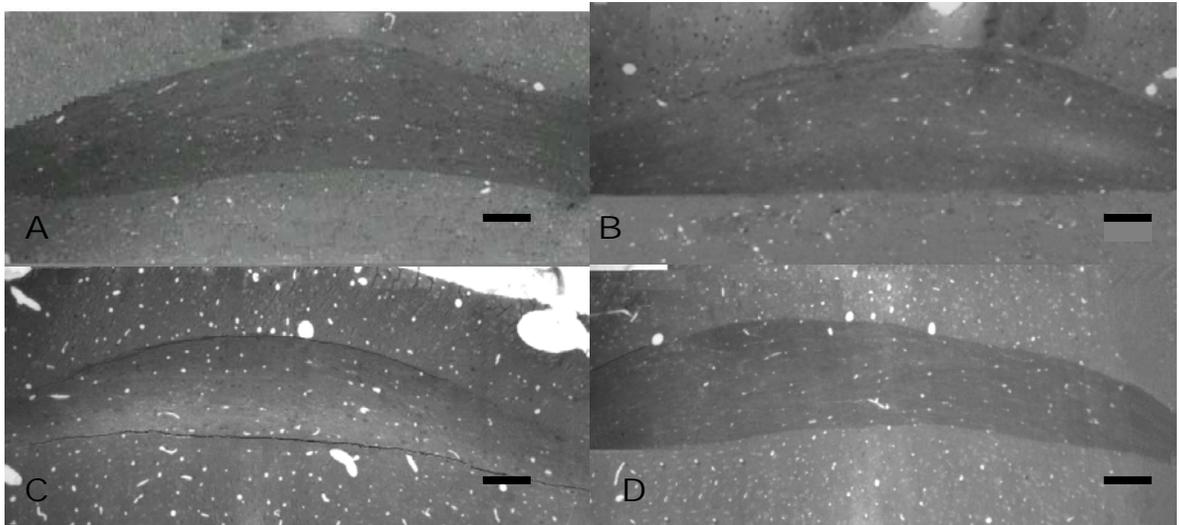
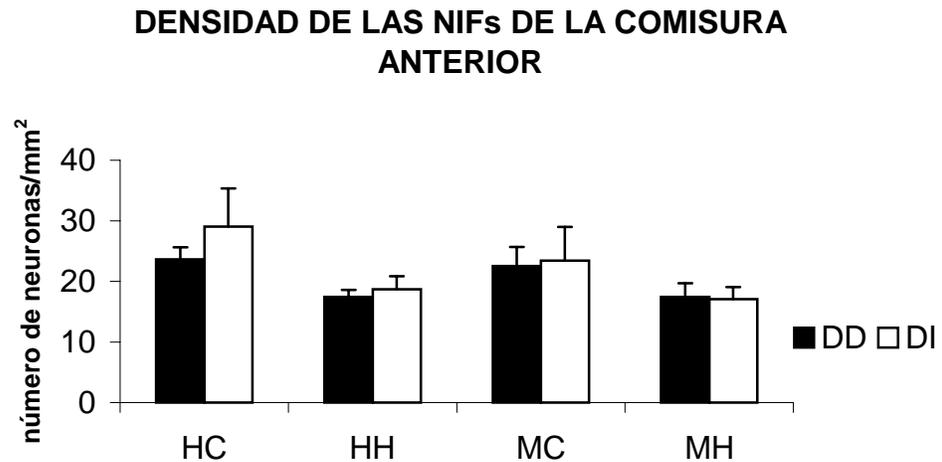


Fig. 10. Fotomicrografía de luz. Cortes coronales teñidos con azul de toluidina de la comisura anterior. El nivel fue elegido para mostrar la comisura completa en una sección rostrocaudal equivalente para cada uno de los grupos. (A): macho control; (B): hembra control; (C): macho hemianósmico y (D): hembra hemianósmica. Barra = 100 μ m. Sección de 700 nm. A, B, C y D fueron tomadas a un aumento de X 40.



Graf. 6. Densidad neuronal promedio por lado y grupo (HC = hembra control; HH = hembra hemianósmica; MC = macho control; Mh = macho hemianósmico; DD = densidad neuronal en el lado derecho de la comisura y DI = densidad neuronal en el lado izquierdo). Se graficaron los promedios y el error estándar. $P < 0.05$. $N = 6$.

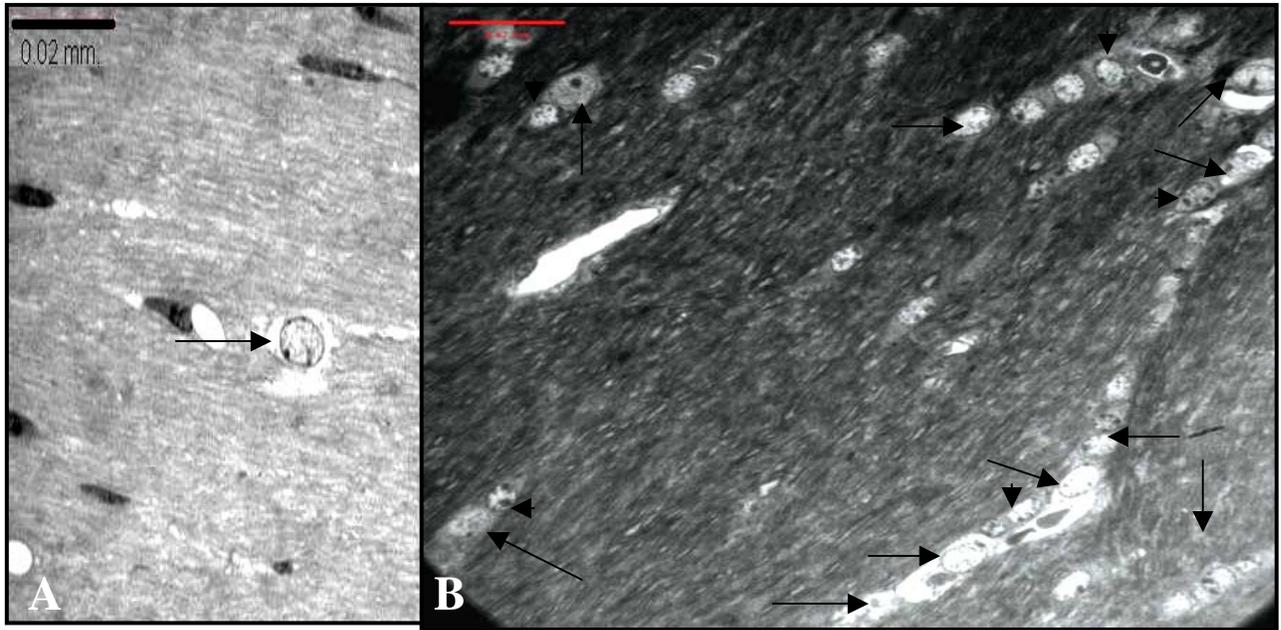


Fig. 11. Micrografías de neuronas interfasciculares de la comisura anterior marcadas con las flechas negras. (A), de un macho hemianósmico y (B), de macho control en donde la glía (cabezas de flechas), aparece intercalada con las NIFs. El segmento mide 20 micras. A y B fueron tomadas a X 100.

DISCUSIÓN

En este estudio se examinó el efecto de la privación olfatoria unilateral neonatal sobre el área de la comisura anterior (CA) y sobre la densidad numérica de las neuronas interfasciculares (NIFs), de ésta.

El primer hallazgo de interés fue el decremento en el peso corporal de los animales anósmicos con respecto a los controles, repercusión que en algunos animales fue tan marcada que obligó a excluir a algunos de éstos. En particular, se excluyeron aquellos sujetos en los que se detectó una disminución en el peso y este se redujo por debajo de los 25 gramos en promedio, para obviar un posible efecto de la disminución masiva de la masa corporal sobre el encéfalo en desarrollo, variable que, aunque reportada por otros investigadores, no fue considerada en nuestro estudio. La disminución en peso corporal ha sido observada en algunos trabajos de privación olfatoria, entre los que se encuentran Loranca y Salas, (2001) y Adamopoulos *et al.*, (1992). En el caso de los primeros, se utilizaron ratas a las que se cauterizó la narina derecha en P3 y se determinó el peso corporal de éstas y en sus respectivos controles a diferentes edades; después de someter los resultados a análisis estadístico se llegó a la conclusión de que el peso corporal disminuyó significativamente, después de los 25 días de edad en machos y después de 30 días en hembras. Lo que puede atribuirse, según estos autores, a una menor ingesta de alimentos en las etapas tempranas de vida. Adamopoulos *et al.*, (1992), experimentaron con conejos sexualmente inmaduros (de entre 55 y 60 días de edad), a los que les causaron anosmia mediante la aplicación de sulfato de zinc en la cavidad nasal y determinaron el peso corporal después de 45 días, encontrando que los animales anósmicos incrementaron en menor proporción su peso en comparación con los controles. Los mismos autores atribuyeron el menor peso corporal a una posible repercusión de la anosmia sobre los centros de saciedad o, incluso, a una posible infección local como resultado de la aplicación del sulfato de zinc y aunque estos factores pueden contribuir a esta

disminución, de acuerdo con estos autores, el principal factor es la disminución en la liberación de hormonas gonadotrópicas causada por la anosmia.

La ausencia de diferencia significativa en el peso total del encéfalo de ratones intactos de cada sexo, confirma lo observado por Gorski, *et al.*, (1980); Hines *et al.*, (1992) y por Bishop y Wahlsten, (1999) en el ratón; pero no por otros autores como: Berrebi *et al.*, (1988) y Zimmerberg y Mickus, (1990), ambos en la rata.

Por otra parte, la analogía en el peso del encéfalo o de los hemisferios por separado pueden explicarse con base en que las diferencias estructurales y bioquímicas discretas repercutieron mínimamente en las masa cerebral en sí. No obstante estos hallazgos divergen de lo documentado en otros modelos de anosmia. Así, se sabe que como resultado de la privación olfatoria, ocurren cambios morfológicos, histoquímicos y metabólicos sobre todo en el bulbo olfatorio, que dan por resultado una disminución en su volumen (Meisami, 1976; Frazier-Cierpial y Brunjes, 1989; Brunjes, 1994; Cummings y Brunjes, 1997; Loranca y Salas, 2001). Lo mismo ocurre en otras estructuras olfatorias centrales, tales como el NOA, en donde el decremento es sutil (Barbado *et al.*, 2001), la corteza olfatoria primaria (Friedman y Price, 1986) y en la mucosa olfatoria (Brunjes y Shurling, 2003), también reducen su volumen. Los resultados obtenidos por nosotros pueden conciliarse con los descritos por otros autores tanto por la existencia de alteraciones mas discretas en los sustratos involucrados como, por el efecto que tienen sobre los sustratos los diferentes procedimientos utilizados para inducir la anosmia o, por ejemplo, cambios estructurales compensatorios (como hipertrofia o conectividad reactiva) que repercutieron mínimamente en la masa cerebral en sí.

Además, el efecto que tiene la privación sobre las estructuras olfatorias primarias depende del tipo de manipulación, por ejemplo si se destruyen las células sensoriales en la mucosa con agentes tales como Tritón X100, sulfato de zinc o bromuro de berilio, daño mecánico a los axones o destrucción del blanco sináptico, el efecto es un incremento en proliferación celular (Carr y Farbman, 1992), mientras que la reducción en proliferación celular puede ser

provocada por obstrucción unilateral de la cavidad nasal (Cummings y Brunjes, 1997), como es el caso del presente estudio. Más aún, el efecto parece depender tanto de la etapa perinatal en que se efectúe la privación como de la etapa del desarrollo en que se determinan los efectos de ésta. Este efecto es interesante cuando se habla de la anosmia como modelo de plasticidad, porque podría significar que existe un período crítico en que la población celular puede incrementar para adaptarse y/o compensar el efecto negativo de la privación olfatoria, sin embargo al persistir la supresión de estímulos, posiblemente las neuronas mueren.

Los estudios morfométricos que se refieren a la existencia de un dimorfismo sexual realizados en ratas albinas, ofrecen resultados contradictorios. Por una parte diferentes autores reportan que la CA tiene mayores dimensiones en el macho en comparación con la hembra (Noonan *et al.*, 1998); mientras que Jones *et al.*, (1997), concluyeron que en la rata al menos el limbo anterior, es mayor en las hembras que en los machos. En contraste, están los trabajos de Bishop y Wahlsten (1999) en rata y ratón y Zimmerberg y Scalzi, (1989) en rata, que sugieren una ausencia de dimorfismo sexual en la CA. Esto último concuerda con nuestras observaciones en el ratón.

Con la metodología utilizada, no se detectaron diferencias significativas en el área de la CA entre hembras y machos controles. Estos hallazgos confirman lo reportado en otras especies de roedores por Zimmerberg y Scalzi, (1989) y por Larriva-Sahd *et al.*, (1998) en ratas. Nuestras observaciones en cortes coronales de CA, confirman la ausencia de dimorfismo sexual observada por estos autores y demuestran un efecto no significativo en la CA de cada lado. Por otra parte, los resultados de este estudio no concuerdan con los de Allen y Gorski, (1991) realizados en humanos, ya que estos autores sustentan que la CA es mayor en mujeres que en hombres, atribuyendo la diferencia a la influencia que las hormonas gonadales tienen sobre el número de axones de la CA. Resulta evidente que no es posible correlacionar los datos de la especie humana con los de roedores, en especial por que los primeros corresponden a

una especie microsmática en donde la función ha involucionado a lo largo del desarrollo evolutivo. Por otra parte, los roedores son especies macrosmáticas, en las que la olfacción constituye la principal modalidad quimiosensitiva (Lledo *et al.*, 2004).

La metodología utilizada en nuestro trabajo, permitió detectar diferencias significativas en el área de la CA obtenida en controles y ratones anósmicos. Bishop y Wahlsten (1999), mencionan que el tamaño del cerebro en humanos y ratas es diferente entre hembras y machos y, por lo mismo, se puede esperar también que el tamaño de las comisuras sea diferente, lo que se atribuye a la variación común en la fuente de crecimiento del cerebro.

El área de la CA, como ya se mencionó, es significativamente diferente entre los animales controles y los experimentales. Este decremento, atribuible a la privación, pudiera resultar de una disminución en el número de axones, o bien de un decremento en el diámetro de éstos. En el primer caso, se sabe que existen diferencias fundamentales en el desarrollo de las distintas comisuras encefálicas en una especie dada y de la misma CA en diferentes especies, como la rata (Guadaño-Ferraz, 1994), en el hamster (Lent y Guimaraes, 1991) y en el ratón (Sturrock, 1974). Aunque la formación de la CA entre estas especies ocurre en períodos variables, en general, la CA ya está formada al momento del nacimiento entre los roedores y continúa su desarrollo durante los primeros días posnatales. Sturrock, (1974), estudió la génesis de la CA, particularmente su limbo anterior y concluyó que la comisura ya está formada para el día E15 y que entre los días E16 y P21, ésta duplica su longitud y para P25 el área transversal ya es prácticamente la misma que para el adulto. En este mismo limbo, el proceso de mielinización, ocurre entre P11 y P32, en el ratón (Sturrock, 1974). Existen algunos estudios en donde se ha propuesto que las variaciones que pudieran ser encontradas en el área de la CA resultan del efecto organizacional de los esteroides gonadales sobre los cuerpos neuronales cuyos axones proyectan a través de la CA, ya que se ha encontrado que dichas neuronas captan y metabolizan testosterona y estrógenos (Zimmerberg y

Mickus, 1990), y se sabe que en la rata, los estrógenos tienen un efecto directo sobre la mielinización (Curry y Heim, 1966). Con estos antecedentes parece adecuado concluir que la supresión unilateral de estímulos olfatorios durante el desarrollo posnatal temprano provoca cambios hipotróficos evidenciados por una disminución en las dimensiones de la CA. Estudios futuros combinando microscopía electrónica cuantitativa permitirán establecer con precisión los sustratos anatómicos que subyacen a la hipotrofia comisural provocada por la anosmia unilateral.

Los cambios involutivos descritos en el tamaño de la CA de animales con anosmia, pueden explicarse con base a diferentes estudios que muestran que dicho procedimiento provoca alteraciones tróficas en los receptores y vías centrales del sentido del olfato. Entre las alteraciones, se encuentran el adelgazamiento de la mucosa olfatoria, debida en parte a la reducción en proliferación celular (Brunjes y Shurling, 2003), la reducción de hasta 26% del volumen del BO, así como la degeneración celular en las neuronas de las diferentes capas de éste (Meisami, 1976; Brunjes y Frazier, 1986, Frazier-Cierpial y Brunjes, 1989, Loranca y Salas, 2001; Petreanu y Alvarez-Buylla 2002). El NOA de la rata también experimenta, como se sabe, cambios volumétricos en sus partes rostral y lateral que, son las que reciben la mayor parte de las aferencias desde el BO (Barbado *et al.*, 2001); finalmente, se ha demostrado que la supresión de estímulos olfatorios, provoca degeneración transneuronal de la primera capa en la corteza olfatoria (Friedman y Price, 1986). Puesto que la CA recibe axones de los centros olfatorios de segundo y tercer orden, es razonable suponer entonces, que todas estas estructuras disminuyan su proyección a la CA resultando en la disminución observada en el área de la CA de animales hemianósmicos.

Los efectos de la privación olfatoria fueron estudiados sobre la densidad neuronal en el área ipsi y contralateral a la privación. El análisis estadístico indicó que la supresión de la actividad aferente normal, disminuye el número de NIFs, pero dado que el área de la CA también se redujo, la densidad neuronal no mostró diferencia significativa con respecto a los controles. Es decir, que el

número real de NIFs se redujo en los animales hemianósmicos. Por otra parte, no se encontró diferencia significativa entre el número de del lado ipsilateral de la comisura comparado con el contralateral, ni en hemianósmicos ni en controles. El resultado más interesante, puesto que confirma nuestra hipótesis central, fue la disminución en el número de neuronas interfasciculares en los sujetos experimentales hemianósmicos. No obstante que la densidad numérica de las NIFs no difirió entre los grupos estudiados, como ya se mencionó. La importante reducción en las dimensiones de la CA de animales con privación olfatoria, estuvo asociada a la disminución global del número de NIFs. Este hallazgo está en concordancia con numerosos estudios que demuestran que la viabilidad neuronal de los núcleos y áreas del encéfalo que reciben aferencias sensoriales depende en buena medida de la actividad e integridad de los receptores que origina a éstas. Así, se puede admitir que la disminución en el número de neuronas en los animales experimentales con respecto a los controles puede resultar en muerte neuronal. En efecto, según Sturrock (1977), la neurogénesis en la CA ocurre antes del nacimiento en el ratón, entre los días E12 y E16 y algunas conexiones ya se han establecido al momento del nacimiento, sin embargo, este proceso continúa durante los primeros días después del nacimiento. Por ello podemos suponer que el decremento en número de NIFs se deba a una reducción de aferencias funcionales provenientes de las estructuras afectadas por la privación olfatoria, pues se ha observado que los aferentes no solo permiten el funcionamiento y desarrollo de las dendritas, el tamaño celular y otras características, sino que influyen el número de neuronas que sobreviven, indicando de alguna manera que los aferentes son tan importantes como los blancos (Oppenheim, 1991). Funcionalmente, esto podría indicar una disminución en la eficiencia del procesamiento de la información que se ha propuesto que ocurre en la comisura anterior.

CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados indican que la oclusión olfatoria unilateral por las primeras 10 semanas de vida, no afecta en forma significativa el peso del hemisferio ipsilateral ni contralateral a la lesión.
2. El diámetro medio sagital de la comisura anterior es significativamente mayor en machos que en hembras control.
3. Por efecto de la privación olfatoria, el área de la CA, disminuye significativamente, lo mismo que el número de NIFs.
4. La densidad numérica de NIFs no se modificó como resultado de la hemianosmia, ya que la disminución en tamaño de la CA en los animales hemianósmicos se tradujo en un número significativamente menor de neuronas en los tejidos de estos animales.
5. La disminución en área comisural se atribuye a una posible disminución en número y/o diámetro de sus fibras.
6. Funcionalmente, la estimulación olfatoria parece ser necesaria para un desarrollo normal de la comisura, así como para la diferenciación neuronal adecuada.

ABREVIATURAS

BO: bulbo olfatorio

BOAc: bulbo olfatorio accesorio

BOP: bulbo olfatorio principal

CA: comisura anterior

CAa: comisura anterior parte anterior o rostral

CAP: comisura anterior parte posterior o caudal

CC: cuerpo calloso

NIFs: neuronas interfasciculares

NLST: núcleo del lecho de la estría terminal

NOA: núcleo olfatorio anterior

OVN: órgano vomeronasal

TOL: tracto olfatorio lateral

TuO: tubérculo olfatorio

SOA: sistema olfatorio accesorio

SOP: sistema olfatorio principal

SNC: sistema nervioso central

REFERENCIAS

Adamopoulos D. A., Kontogeorgos L., Vassilopoulos P., Kapolla N., Stathopoulos E. y Nicoupoulou S. (1992). Effects of induced peripheral anosmia on gonadal maturation in prepubertal male rabbits. *Int J Androl* **15**: 246-254.

Allen L. S. y Gorski R. A. (1991). Sexual dimorphism of the anterior commissure and massa intermedia of the human brain. *J Comp Neurol* **312**: 97-104

Allen L. S. y Gorski R. A. (1992). Sexual orientation and the size of the anterior commissure in the Human. *Brain Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7199-7202.

Barbado M. V., Briñón J. C., Weruaga E., Porteros A., Arévalo R., Aijón J. y Alonso J. R. (2001). Volumetric changes in the anterior olfactory nucleus of the rat after neonatal olfactory deprivation. *Exp Neurol* **171**: 379-390.

Berrebi A. S., Fitch R. H., Ralphe D. L., Denenberg L. O., Friederich V. L. y Denenberg V. H. (1988). Corpus callosum: Region-specific effects of sex, early experience and age. *Brain Res* **438**: 216-224.

Bishop K. M. y Wahlsten D. (1999). Sex and species differences in mouse and rat forebrain commissures depend on the method of adjusting for brain size. *Brain Res* **815**: 358-366.

Bohem N. y Aron C. (1990). Inhibitory effects of centrally and peripherally induced anosmia on mounting behavior in the female rat. *Physiol Behav* **48**: 367-370.

Brodal P. (1998). Olfaction and taste. En: *The Central Nervous System. Structure and Function*. Oxford University Press (Ed). New York, USA. pp. 297-306.

Brunjes P. C. (1985). Unilateral odor deprivation: time course of changes in laminar volume. *Brain Res Bull* **14**: 233-237.

Brunjes P. C. y Frazier-Cierpial L. L. (1986). Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Res* **396**: 1-45.

Brunjes P. C. (1994). Unilateral naris closure and olfactory system development *Brain Res Rev* **19**: 146-160.

Brunjes P. C. y Shurling D. C. (2003). Cell death in the nasal septum of normal and naris-occluded rats. *Develop. Brain Res* **146**: 25-28.

Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmaisons D, Vincent J-D, Giles G. y Lledo P-M (2001). Making scents of olfactory neurogenesis. *J Physiol* **96**: 115-122.

Carr V. M. y Farbman A. I. (1992). Ablation of the olfactory bulb upregulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in the olfactory epithelium. *Exp. Neurol* **115**: 55-159.

Condes-Lara M., Martínez-Cabrera G., Martínez-Lorenzana G. y Larriva-Sahd J. (2002). Electrophysiological evidence that a set of interfascicular cells of the rat anterior commissure are neurons. *Neurosc Lett* **323**: 121-124.

Condés-Lara M., Paz C., Rodríguez Jiménez J., Martínez-Cabrera G., Martínez-Lorenzana G. y Larriva Sahd J. (2003). Electrophysiological responses of interfascicular neurons of the rat anterior commissure to activation from the anterior olfactory nucleus, medial frontal cortex, and posterior nucleus of the amygdala. *Brain Res* **982**: 288-292.

Corotto F. S., Henegar J. R. y Maruniak J. A. (1994). Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neurol* **61**: 739-744.

Crosby E. C. y Humprey T. (1938). The accessory accessory olfactory bulb in phylogeny. *Anat Rec* **70**.

Cummings D. M. y Brunjes P. C. (1997). The effects of variable periods of functional deprivation on olfactory bulb development in rats. *Exp Neurol* **148**: 360-366.

Curry J. J. y Heim L.M. (1966). Brain myelination after neonatal administration of estradiol. *Nature* **209**: 915-916.

De Olmos J. S. e Ingram W. R. (1972). The projection field of the stria terminalis in the rat brain. An experimental study. *J Comp Neurol* **146** : 303-334.

De Olmos J. S., Hardy H. y Heimer L. (1978). The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol* **181**: 213-244.

Dessi-Fulgheri F., Dahlof L.-G., Larsson K. Lupo di Prisco C. y Tozzi S. (1980). Anosmia differently affects the reproductive hormonal pattern in sexually experienced and inexperienced male rats. *Physiol Behav* **24**: 607-611.

Ehret G. y Buckenmaier (1994). Estrogen-receptor occurrence in female mouse brain: Effects of maternal experience, ovariectomy, estrogen and anosmia. *J Physiol* **88**: 315-329.

Frazier-Cierpial L. L. y Brunjes P. C. (1989). Early postnatal differentiation of granule cell dendrites in the olfactory bulbs of normal and unilaterally odor-deprived rats. *Brain Res* **47**: 129-136.

Friedman B. y Price J. L. (1986). Age-dependent cell death in the olfactory cortex: lack of transneuronal degeneration in neonates. *J Comp Neurol* **246**: 20-31.

Gorski R. A., Harlan R. E., Jacobson C. D., Shryne J. E. y Southam A. M. (1980). Evidence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *J Comp Neurol* **193**: 529-539.

Granger E. M. y Masterton R. B. (1985). Origin of interhemispheric fibers in a callosal opossum (with a comparison to callosal origins in rat). *J Comp Neurol* **241**: 82-98.

Gross C. G., Bender D. B. y Miskin M. (1977). Contributions of the corpus callosum and the anterior commissure to visual activation of inferior temporal neurons. *Brain Res* **131**: 227-239.

Guadaño Ferraz, A., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G., Innocenti G.M. y Berbel P. (1994). The development of the anterior commissure in normal and hypothyroids rats. *Develop Brain Res* **81**: 293-308.

Hines M., Allen L. S. y Gorski K. A. (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* **579**: 321-326.

Horel J. A. y Stelzner D. J. (1981). Neocortical projections of the rat anterior commissure. *Brain Res* **220**: 1-12.

Huerta-Ocampo I. (2003). Dimorfismo sexual en la comisura anterior de la rata: Estudio morfológico y morfométrico. Instituto de Neurobiología, UNAM (tesis de grado M. en C.). pp 86.

Itaya S. K. (1987). Anterograde transsynaptic transport of WGA-HRP in rat olfactory pathways. *Res Rep* 205-214.

Jones H. E., Ruscio M. A., Keyser L. A., González C., Billarck B., Rowe R., Hancock C., Lambert K. G. y Kinsley C. H. (1997). Prenatal stress alters the size of the rostral anterior commissure in rats. *Brain Res Bull* **42**: 341-346.

Jouandet M. L. y Harstein V. (1983). Basal telencephalic origins of the anterior commissure of the rat. *Exp Brain Res* **50**: 183-192.

King C. y Hall W. G. (1990). Developmental change in unilateral olfactory habituation is mediated by anterior commissure maturation. *Behav Neurosci* **104**: 796-807.

Kölliker A. (1896). Handbuck der Gewebelehre des Menschen, 6. Aufl. Leipzig, Engelmann. 2 Bd. En: Physiology of The Nervous System. Fulton J. F. (1951). University Press, New York. p. 288.

Lamantia A. S. y Rakic P. (1990). Cytological and quantitative characteristics offFour cerebral commissures in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* **291**: 520-537.

Larriva- Sahd J, Orozco -Estévez H. y Condés-Lara M. (1998). Perinatal administration of testosterone induces hypertrophy of the commissure in adult male and female rats. *Neurosci Lett* **241** : 119-122.

Larriva-Sahd J, Condés-Lara M, Martínez-Cabrera G y Varela A. (2002) Histological and ultrastructural characterization of interfascicular neurons in the rat anterior commissure. *Brain Res* **193**: 81-91.

Lledo P-M, Gheusi G. y Vincent J-D. (2004). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev* **85**: 281-317.

Lent R. y Guimaraes R. Z. (1991). Development of paleocortical projections through the anterior commissure of hamsters adopts progressive, not regressive strategies. *J Neurobiol* **22**: 475-498.

Ling E. A. y Ahmed M. M. (1974). Neuroglia in the corpus callosum of the primate, slow loris (*Nycticebus coucang coucang*). *Tissue cell* **6**: 361-370.

Livy D. J., Schalomon P. M., Roy M., Zacharias M. C., Pimenta J, Lent R. y Wahlsten D. (1997). Increased axon number in the commissure of mice lacking a corpus callosum. *Exp Neurol* **146**: 491-501.

Loranca A. y Salas M. (2001). Social play development in pre-weaning olfactory deprived or stimulates rats. *Brain Res* **921**: 150-159.

Lohman A. H. M. (1963). The anterior olfactory lobe of guinea pig. A descriptive and experimental anatomical study. *Acta Anatómica* **53**: 9-109.

Lohman A. H. M. y Mentink G.M. (1969). The lateral olfactory tract, the anterior commissure and the cells of the olfactory bulb. *Brain Res.* **12**: 396-413.

Luskin M. B. y Price J. L. (1983). The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *J Comp Neurol* **216**: 264-291.

Maruniak J. A. (1995). Deprivation and the olfactory system. En: Handbook of Olfaction and Gustation. Doty, R. L. (Ed). Derker, USA, pp. 455-469.

McLean J. H., Darby-King A. y Bonnell W. S. (2001). Neonatal olfactory sensory deprivation decreases BDNF in the olfactory bulb of the rat *Dev Brain Res* **128**: 17-24.

Meisami E. y Timiras P. S. (1971). Early visual input and the development of the brain excitability in the rat. *Amer J Physiol* **220**: 233-238.

Meisami E. y Timiras P. S. (1974). Influence of early visual deprivation on regional activity of brain ATPases in developing rats. *J Neurochem* **22**: 725-729.

Meisami E. (1976). Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia. *Brain Res* **107**: 437-444.

Meisami E. (1991). Chemoreception. En: Handbook of Olfaction and Gustation. Doty, R. L. (Ed). Derker, USA, pp.335-382.

Meisami E. y Bhatnagar K. P. (1998). Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech* **43**: 476-499.

Noonan M., Smith M. A., Kelleherk y San Filipo M. A. (1998). Sex differences in anterior commissure size in the rat. *Brain Res Bull* **45**: 101-104.

Oppenheim R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**: 453-501.

Orona E, Rainer E. C. y Scott J. W. (1984). Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* **226**: 346-356

Pearson H. E, Labar D.R., Paine P, Cornwell N. y Aggarwal N. (1981). Transneuronal retrograde degeneration in the cat retina following neonatal ablation of visual cortex. *Brain Res* **212**: 470-475.

Petreanu L. y Alvarez-Buylla A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* **22**: 6106-6113.

Poindron P., Hernández H., Serafín N., Vázquez H. y Delgadillo J. A. (2001). Maternal selectivity suppression through peripheral anosmia affects neither overall nursing frequency and duration, nor lactation performance in ewes. *Behav Proc* **53**: 203-209.

Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick, LaMantia A. S., McNamara J. O. y Williams S. M. (2001). The chemical senses. En: Neuroscience. Sunderland, Massachusetts.

Ramón y Cajal S. (1904). Textura del Sistema Nervioso Central del Hombre y los Vertebrados. De SR Cajal Imprenta y Librería de Nicolás Moya, Madrid, España.

Scalia F. y Winans S. S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals *J. Comp Neurol* **1**: 31-55.

Shiple M. T., Mc Lean J. H. y Ennis M. (1995). Olfactory system En: Rat Nervous System. Paxinos G. (Ed). Academic Press, Australia. pp. 899-926.

Shiple M. T. y Ennis M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Neurobiology* **1**:123-176.

Skeen L. C., Due B. R. y Douglas F.E. (1986). Neonatal sensory deprivation reduces tufted cell number in mouse olfactory bulbs. *Neurosci Lett* **63**: 5-10.

Slotnick B. M. y Berman E.J. (1980). Transection of the lateral olfactory tract does not produce anosmia. *Brain Res Bull* **5**: 141-145.

Slotnick B. M. y Schoonover F.W. (1992). Olfactory pathways and the sense of smell. *Neurosci Biobehav Rev* **16**: 453-472.

Spear P. D. (1985). Neural mechanisms of compensation following neonatal cortex damage En: Synaptic Plasticity and Remodeling. Cowan W. M. (Ed), Guilford Press, New York.

Sturrock R. R. (1974). Histogenesis of the anterior limb of the mouse brain. I. A quantitative study of changes in the glial population with age. *J Anat* **117**: 17-25.

Sturrock R. R. (1977). Neurons in the mouse anterior commissure. A light microscopic, electron microscopic and autoradiographic study. *J Anatomy* **123**: 751-762.

Switzer R. C., De Olmos J. y Heimer L. (1985). En: The Rat Nervous System, Vol. I. Forebrain and Midbrain, Paxinos G. (Ed), Academic Press, Sidney. pp 1-36.

Tong L, Spear P. D., Kalil R. E. y Callahan E. C. (1982). Loss of retinal X-cells in cats with neonatal or adult visual cortex damage. *Sci* **217**: 72-75.

Van Alphen H. A. M. (1969). The anterior commissure of the rabbit. *Acta Anat* (Supl. 57), **74**: 11-112.

Warwick R. y Williams P. L. (1973). Neurology. En: Gray's Anatomy. Warwick R y Williams P. L. (Eds). 35 th ed. Longman. Great Britain pp. 930-938.

Zimmerberg B. y Scalzi L.V. (1989). Commisural size in neonatal rats: Effects of sex and prenatal alcohol exposure. *Int J Dev Neurosci* **7**: 81-86.

Zimmerberg B. y Mickus L. A. (1990). Sex differences in corpus callosum: Influence of prenatal alcohol exposure and maternal undernutrition. *Brain Res* **537**:115-122.