



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN POSNATAL EN LA MORFOLOGÍA
CELULAR DEL BULBO OLFATORIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

**M EN C MARÍA DEL CARMEN FRÍAS CASTAÑEDA
DIRECTOR DE TESIS: DR MANUEL SALAS ALVARADO**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó con el apoyo de una beca completa otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y una beca parcial de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México

“Todo nuestro conocimiento se inicia en el sentimiento”

Leonardo Da Vinci

“El destino de las naciones depende de la forma en que se nutren”

Jean Anthelm Brillat-Savarin (1755-1826)

Physiologie du Goût, ou Méditations de Gastronomie Transcendante, 1825.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mis padres, María Cristina Castañeda Mendoza y Félix Frías Pólito mis principales maestros, de quienes he aprendido y obtenido gran parte de lo que ahora soy, a quienes amo profundamente al igual que a mis hermanos María Guadalupe y Félix de Jesús quienes en cualquier circunstancia me han apoyado con su cariño y fortaleza

A los pequeños Phelep y Sophia

A todos los maestros que han participado con su enseñanza en la formación de cada una de las etapas de mi vida, formalmente y en la vida cotidiana

A mi papá, al científico Carl Sagan y a Enrique Ganem quienes con su amena forma de hacerme llegar al conocimiento me motivaron a entrar a esta aventura de la ciencia

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el *alma mater*, de los mexicanos a la cual espero retribuir por lo recibido. A la magna institución y sus defensores a quienes se les agradece el que aún se pueda acceder a ella en su carácter público y autónomo y a sus maestros e investigadores que también me han motivado en este quehacer humano

Al Instituto de Neurobiología que ha sido el puntal de mi formación, el cual me ha albergado durante gran parte de mi vida académica. Agradezco al personal académico y planta de trabajadores, compañeros estudiantes y amigos que han contribuido en mi desarrollo y aprendizaje en estas etapas

A mi tutor principal, el doctor Manuel Salas por sus enseñanzas y capacidad de guía durante gran parte de mi etapa de formación

A mis cotutores, los doctores Ismael Jiménez y León Cintra quienes han mostrado la mejor disposición para aclarar dudas, realizar importantes aportaciones y observaciones sobre mi formación y el mejoramiento de este trabajo

Al comité evaluador: las doctoras Rosalinda Guevara y Magda Giordano, a los doctores Gabriel Manjarrez y Raúl Paredes por las importantes contribuciones a la versión final de este escrito

A la licenciada María Carmen Torrero por sus enseñanzas

A la Sra Tere de Loera quien siempre estuvo atenta y con la mejor disposición para colaborar

A mis compañeras de laboratorio Mirelta Regalado, Lorena Rubio, Susana Alvarado, Jessica Rico, Karina Márquez, Adriana González, Marina Ruiz y Esther Pérez, así como a los estudiantes del servicio social Mayra y Memo que participaron con su entusiasmo

De manera particular al trabajo del personal del posgrado que siempre ha mostrado la mejor disposición para resolver las necesidades de todos los estudiantes al colaborar y aclarar dudas sobre trámites burocráticos, haciéndolos menos difíciles y complicados. En particular a la coordinadora QFB Leonor Casanova y su colaboradora Carmen Vázquez

Al personal del bioterio y en particular al MVZ Martín Servín por su labor al frente del suministro y cuidado de los animales de experimentación

A la bibliotecóloga Pilar Galarza y su equipo de colaboradores quienes han mostrado una excelente disposición para la obtención del material bibliográfico: Rafael Silva, Ignacio Caballero, Crisanta Reséndiz y Tere Palafox

Al grupo del laboratorio de imágenes por su apoyo en la obtención de las imágenes digitales y videoconferencias. A a la Ing. Nydia Hernández, Psic. Lourdes Lara y el M en C Leopoldo González. A la asesoría del personal de cómputo Omar González

Al Dr Paz y a los miembros de su laboratorio que me apoyaron en la primera etapa del proyecto

A la Dra Dorothy Pless quien corrigió el resumen en inglés a quien agradezco sus valiosos y motivantes comentarios

A mis compañeros y amigos que han sido un apoyo importante en diferentes circunstancias en el transcurso de esta etapa: a los doctores y amigos Esther García-Castells, Carlos Guzmán y Manuel Aguilar, Diego Guzmán, Gloria Avecilla, Esperanza Meléndez, Bryan Philips, Enrique Flores, Héctor Vargas, Laura Avilés, Elisa Cuéllar, Wilbert Zarco, Miriam Zamorano, Liliana Sánchez, Andrea Herrera, Alejandro Ledesma y Gustavo Warnholtz.

Dedico este trabajo a todos aquellos que trabajan por la conformación de una
PATRIA JUSTA, LIBERTARIA Y PROGRESISTA

ÍNDICE

RESUMEN.....	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.....	17
ANTECEDENTES	18
I. Efectos de la desnutrición perinatal en el SNC.....	18
II. Sistema olfatorio.....	20
Componentes del bulbo olfatorio principal.....	21
A. Poblaciones celulares y organización laminar. Características morfológicas y funcionales	21
B. Neuronas olfatorias receptoras	22
C. Neurogénesis y fisiología del bulbo olfatorio.....	26
D. Organización laminar del bulbo olfatorio principal.....	32
E. Codificación olfatoria	39
F. Vía olfatoria.	41
G. Desarrollo funcional del sistema olfatorio	45
H. Conductas guiadas olfatoriamente.....	46
III. Efecto de la malnutrición/desnutrición y otros factores epigenéticos en el sistema olfatorio.....	48
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
HIPÓTESIS	50
OBJETIVO GENERAL.....	50
OBJETIVOS PARTICULARES	51
MATERIALES Y MÉTODOS	51
I. Animales.....	51
A. Evaluación del desarrollo físico.....	52

II. Alimentación	52
III. Condiciones de mantenimiento	53
IV. Histología	54
A. Morfometría del BO y sus capas	55
B. Morfometría de los GOs	55
C. Morfología de las CM	57
D. Pruebas conductuales de discriminación olfatoria	59
V. Análisis estadístico.....	61
RESULTADOS	62
I. Valoración física de los animales	62
A. Peso corporal	62
B. Peso cerebral	64
C. Apertura de los meatos auditivos externos	65
D. Apertura palpebral	66
II. Valoración histológica.....	66
A. Morfometría del bulbo olfatorio, BO	66
Área	66
B. Capas celulares. Índice de relación del área del BO y del área de las capas celulares que lo componen.	69
a. Capa plexiforme externa, CPE	69
b. Capa de las células mitrales, CCM.....	70
c. Capa de las células granulares, CCG.....	71
C. Morfometría de los glomérulos olfatorios, GOs.....	72
a. Número de GOs en el BO completo	72
b. Número de GOs en las regiones del BO	72

c. Área y longitud mayor de los GOs en el BO completo.....	75
d. Área de los GOs por regiones	77
D. Morfometría de las Células Mitrals, CM	78
a. Longitud mayor del soma	78
b. Perímetro y área del soma	79
c. Orden dendrítico	81
d. Longitud dendrítica	85
E. Pruebas conductuales de discriminación olfatoria	88
DISCUSIÓN.....	90
Valoración física de los animales	90
Área del BO	93
Capas celulares.....	93
Número de los GOs.....	95
Evaluación de los GOs por regiones	96
Longitud mayor y área de los GOs	98
Células mitrales	100
Valoración conductual	106
CONCLUSIONES.....	108
PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO	110
APÉNDICE	131
Somatometría	132
Longitud corporal.....	132
Longitud de la ulna	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del cráneo de una rata en el que se muestra el bulbo olfatorio principal.....	22
Figura 2. Fotomicrografía de barrido del epitelio olfatorio	23
Figura 3. Mecanismo de transducción de la señal olfatoria en vertebrados.....	24
Figura 4. Esquema de las NORs del epitelio olfatorio que proyectan a los GOs en el BO, A.....	25
Figura 5. La generación de los diferentes tipos celulares que conforman el BO se origina principalmente de la zona subependimal (ZSE).....	26
Figura 7. Cronograma de la formación del bulbo olfatorio.....	31
Figura 8. Corte transversal del bulbo olfatorio principal (BO) de la rata.	32
Figura 9. Cortes transversales y longitudinal del BO.....	34
Figura 10. Fotomicrografía que muestra el volumen de un bulbo olfatorio con glomérulos olfatorios	35
Figura 11. Cronograma de la participación de las principales estructuras celulares que conforman el glomérulo olfatorio en etapa posnatal.....	36
Figura 12. Esquema de la organización de los tipos celulares del BO.....	38
Figura 13. Vía resumida que muestra la entrada del estímulo olfatorio en el sistema olfatorio principal y accesorio.	41
Figura 14. Bulbo y cintillas olfatorias que muestran las relaciones de las neuronas olfatorias primarias y los receptores de la mucosa nasal.	42
Figura 15. Esquema de conexiones intrabulbares.....	43
Figura 16. Vías de relevo de la información olfatoria.....	44
Figura 17. Regiones del sistema olfatorio en el cerebro de rata.....	45
Cuadro 1. Escala de valores relativos empleada para evaluar la apertura de meatos auditivos y párpados.....	52
Cuadro 2. Distribución del número de animales de acuerdo a la condición nutricia, edad y tratamiento histológico.....	53

Cuadro 3. Número de glomérulos evaluados de acuerdo con la condición nutricia durante el desarrollo.....	56
Figura 18. Regionalización del BO en cuadrantes.....	56
Figura 19. Esquema de una neurona que muestra el método de Sholl.....	58
Cuadro 4. Número de células mitrales evaluadas en el BO.	58
Figura 20. Caja de prueba utilizada para evaluar la discriminación olfatoria.....	60
Figura 21. Fotomicrografía de un corte de uno de los BO.....	62
Gráfica 1. Comparación del peso corporal entre los grupos	63
Figura 22. Diferencias físicas entre animales control (C) y desnutridos (D)	63
Gráfica 2. Peso cerebral de animales estudiados de acuerdo con su condición nutricia,64	
Cuadro 4. Relación alométrica entre el peso corporal y cerebral en las diferentes edades.....	65
Gráfica 3. Apertura de los meatos auditivos externos	65
Gráfica 4. Apertura palpebral del grupo.....	66
Figura 23. Fotomicrografías de uno de los bulbos olfatorios de cada grupo en las edades estudiadas	68
Gráfica 7. El día siete y veintiún posnatales son los que muestran las mayores diferencias entre los grupos	70
Figura 24. Cortes del BO que muestran las capas radiales	71
Gráfica 8. Índice de relación del área del BO con la CCG.....	72
Gráfica 9. Número de glomérulos olfatorios por región en el BO	74
Gráfica 10. Área de los GOs.....	76
Gráfica 11. Longitud mayor de los GOs.	77
Gráfica 12. Área de los GOs por región	76
Gráfica 13. Perímetro del soma de las células mitrales.	79
Gráfica 14. Área del soma de las células mitrales.....	80
Figura 25. Fotomicrografías de bulbos olfatorios tratados con la técnica de Golgi-Cox	80

Gráfica 15. Orden dendrítico de las células mitrales a los siete días	81
Figura 26. Dibujos en cámara lúcida de células mitrales de ratas a los siete días de edad	82
Gráfica 16. Órdenes dendríticos a los catorce días posnatales.....	82
Figura 27. Dibujos en cámara lúcida de células mitrales de ratas a los catorce días de edad	83
Gráfica 17. Órdenes dendríticos a los veintiún días de edad.	84
Figura 28. Dibujos en cámara lúcida de células mitrales de ratas a los veintiún días de edad	85
Gráfica 18. Longitud dendrítica de las CM a los siete días.....	86
Gráfica 19. Longitud dendrítica de las CM a los catorce días posnatales	86
Gráfica 20. Longitud de las dendritas a los veintiún días	87
Figura 29. Fotomicrografías de CM a los veintiún días posnatales	88
Gráfica 21. Latencia de llegada al aserrín del nido materno.....	89
Gráfica 22. Permanencia sobre el aserrín del nido de la madre.	89
Gráfica 23. Frecuencia de acercamiento al aserrín del nido de la madre.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

BO-Bulbo olfatorio

CGI-Células granulares internas

CGL-Capa glomerular

CM- Células mitrales

CCM- Capa de las células mitrales

CP-Células en penacho

CPE- Capa plexiforme externa

CPI- Capa plexiforme interna

DA-Dopamina

GABA-Ácido gama-amino-butírico

GOs-Glomérulos olfatorios

NT-Neurotransmisor

NORs-Neuronas olfatorias receptoras

SNC- Sistema nervioso central

ZSV-Zona subventricular

RESUMEN

Las alteraciones celulares del SNC son evidencia de la desnutrición pero estos efectos no están ampliamente documentados en el bulbo olfatorio (BO). En este trabajo se evaluó la morfometría de las capas, los glomérulos olfatorios (unidades funcionales del sistema olfatorio) y las células mitrales que constituyen al BO en ratas desnutridas posnatalmente por la ligadura de los conductos galactóforos de las madres. La desnutrición se verificó al obtener el peso corporal y cerebral de los animales el día de sacrificio (7, 14 y 21 días posnatal). Se extrajeron los cerebros y tiñeron con las técnicas de Nissl y Golgi-Cox. Los resultados mostraron una menor ganancia del peso corporal y cerebral en el grupo desnutrido. El área del BO en el grupo desnutrido fue menor en comparación al grupo control. Los glomérulos olfatorios no mostraron diferencia numérica entre los grupos aunque fue menor la longitud y el área de estas estructuras en la región medial del BO del grupo desnutrido respecto al grupo control. Las capas analizadas: *capa plexiforme externa*, compuesta principalmente por las prolongaciones dendríticas de células mitrales; la *capa de las células mitrales*, con preponderancia de los somas de este tipo celular y la *capa de las células granulares* mostraron una disminución del área en el grupo desnutrido a diferencia del grupo control en el día 21 posnatal, edad en la cual se considera que la población celular ha alcanzado el estado de madurez funcional. La longitud y complejidad de las dendritas de las células mitrales en las tres edades disminuyó en el grupo desnutrido respecto al grupo de los animales control. Los resultados indicaron que aún cuando algunas de las células del BO se formaron gestacionalmente, los procesos dendríticos y algunas de las estructuras que dependen de su conformación no habían concluido su desarrollo posnatal durante la etapa de observación, siendo afectadas por la desnutrición. Estos efectos observados en el BO podrían tener repercusiones funcionales importantes para la sobrevivencia de las crías en la etapa posnatal debido a que el olfato constituye uno de los sentidos indispensables para que el recién nacido responda adecuadamente al cuidado materno. Durante la adultez estas alteraciones podrían tener efectos funcionales, debido a que la desnutrición incidió en una etapa crítica del desarrollo.

ABSTRACT

Cell alterations of the CNS are evidence of undernourishment, but these effects are still not widely documented in the olfactory bulb (OB). In this work the morphometry of its layers, olfactory glomeruli (functional units of olfactory system), and the mitral cells that constitute it were evaluated postnatally in rats undernourished by ligating the galactophors ducts of their dams. Undernourishment was verified by body and brain weights of the animals on the day of sacrifice (7, 14, and 21 days postnatal). The brains were extracted and dyed with Nissl and Golgi–Cox techniques. The results showed a lower gain of body and brain weight in the undernourished group. The area of the OB in the undernourished group was smaller than in the control. The olfactory glomeruli did not showed difference in their number, but the length and area was smaller in these structures in the media region of the OB in the undernourished group. The layers analyzed were: *plexiform external layer*, mainly composed of dendritical prolongations of the mitral cells; *mitral cell layer*, composed of the soma of this kind of cell, and the *granule cell layer*, all of them showed a diminished area in the undernourished group compared to the control group on postnatal day 21, the age at which the cell population is considered to have reached functional maturity. At all three ages, the mitral cell dendrites were shorter and less complex in the undernourished group than in the control group. These results indicated that even when some type of cells of OB were formed during gestation, their dentritical processes and other structures that depend on their conformation still have not developed fully and were affected by the undernourishment. These effects observed in the OB would have important functional repercussions for the survival of the offspring just after birth since olfaction constitutes one of the main senses, and it is indispensable for adequate newborn responses to maternal care. The late development of some OB structures also could have long-term effects because undernourishment was applied during critical periods of development.

INTRODUCCIÓN

La desnutrición se considera como un desequilibrio de los nutrientes indispensables para la sobrevivencia del individuo y es una de las patologías que afecta a gran parte de la población mundial y nacional. A nivel mundial cerca de 11.5 millones de niños menores de 5 años presentan desnutrición, de los cuales, un poco más del 50% se encuentra en riesgo de morir por enfermedades infecciosas asociadas a deficiencias funcionales que les impide sobrevivir. En México la proporción de 1.4 millones de niños desnutridos presentan un porcentaje similar de muerte por causas asociadas (UNICEF, 2006). Asimismo, se estima que alrededor de 20 millones de niños menores de 5 años padece distintos grados de desnutrición. Esta población se ubica tanto en zonas rurales como en zonas urbanas, siendo las primeras, las más afectadas; sin embargo, la constante migración del campo a la ciudad por diferentes razones va igualando esta situación en la periferia de las grandes ciudades. La malnutrición, considerada como el desequilibrio en alguno de los nutrientes esenciales en la dieta, también es un problema de salud pública asociada al sobrepeso y obesidad. La población más susceptible a esta situación es la que se encuentra en las comunidades urbanas. Se ha encontrado cierta similitud entre los efectos debidos a la malnutrición y la desnutrición como una reducción de la talla y el peso, así como en procesos metabólicos, de ahí que ambos coincidan en una desnutrición generalizada. En este trabajo se considerará como carencia generalizada de una dieta equilibrada a la desnutrición y a la carencia nutricional de uno o más de los componentes de la dieta equilibrada, malnutrición. Desde décadas pasadas se conocen en el ser humano y otras especies altriciales algunos efectos en el metabolismo y la funcionalidad de varios sistemas del organismo debido a la desnutrición temprana. De acuerdo con estudios realizados en la rata se han encontrado efectos extensos por la desnutrición, capaces de provocar hipotrofia neural, aunque todavía quedan por conocer sus repercusiones en sistemas específicos como los sensoriales, los cuales permiten la sobrevivencia de la cría cuando ésta aún depende del cuidado materno. En el sistema nervioso central (SNC), la evidencia muestra que algunos efectos de la desnutrición son difíciles de revertir cuando se producen en periodos críticos del desarrollo como en la etapa perinatal cuando concurren diversos procesos citogenéticos, llegando a afectar la morfología y el funcionamiento neuronal. En este trabajo se evalúa el efecto de la desnutrición neonatal en el sistema olfatorio, sistema indispensable en la sobrevivencia

posnatal y en el establecimiento del vínculo madre-cría para la discriminación de la ingesta de alimento y el inicio de los procesos de socialización temprana. En particular, se estudió la morfología de los componentes neuronales y de los glomérulos que conforman el BO de la rata en desarrollo.

ANTECEDENTES

I. Efectos de la desnutrición perinatal en el SNC

La nutrición puede ser considerada como el equilibrio entre la cantidad y la calidad de los carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y microelementos que ingiere un individuo para que se lleve a cabo una actividad biológica y fisiológica adecuada para la sobrevivencia del sujeto (Morgane, 1993). En el ser humano, la desnutrición calórico-proteica es un problema común y una causa importante de morbi-mortalidad en países pobres y subdesarrollados tanto directa como indirectamente. El efecto negativo del desequilibrio de esta ingesta empobrecida del alimento varía con la duración de esta privación y la etapa en el desarrollo en la cual incide.

Por efecto de la desnutrición se ha observado un retardo en el desarrollo del hipotálamo del feto (Trindade *et al.*, 1995). Metabólicamente, hay evidencia de aumento de la fosforilación de varias proteínas en edad temprana y disminución en edades tardías, principalmente en los residuos de tirosina, que conforman las proteínas de la membrana sináptica y la biosíntesis de lípidos (Singh y Shankar, 1999). Existe además evidencia de que la ingesta deficiente de proteínas es capaz de disminuir la cantidad y actividad de los niveles de las enzimas Na⁺, K⁺-ATPasa y ATPasa total lo cual incide en el aumento del estrés oxidativo de ciertas áreas del cerebro (Calderón-Guzmán *et al.*, 2002). Otro tipo de alteraciones se han encontrado en el SNC de animales de laboratorio por efecto de la desnutrición perinatal en la citoarquitectura y función del tejido nervioso de la rata tales como el adelgazamiento del grosor de la corteza, retraso de la migración neuronal y glial; reducción del número de neuronas, del grosor y el número de espinas de áreas sensoriales de la neocorteza, así como de la amígdala, cerebelo, hipocampo, claustrum, núcleo supraquiasmático y tallo cerebral. Se ha encontrado además un déficit total del DNA en las neuronas del cerebro y del cerebelo (Bass *et al.*, 1970; Neville y Chase, 1971;

Escobar y Salas, 1993; García-Ruiz *et al.*, 1993; Cintra *et al.*, 1994; Escobar y Salas, 1995; Del Ángel-Meza *et al.*, 2001). Funcionalmente, hay evidencia de que las modificaciones morfológicas originan a su vez cambios en la capacidad del tejido nervioso para generar actividad eléctrica, obteniéndose una reducción de la frecuencia de la actividad eléctrica espontánea en el área somestésica, auditiva y visual de la corteza cerebral, produciéndose un alargamiento de la latencia de los componentes primarios en los potenciales provocados por la aplicación de estímulos sensoriales en distintos sistemas (Mourek *et al.*, 1967; Callison y Spencer, 1968; Salas y Cintra, 1973, Salas y Cintra, 1975; Alvarado, 2003). Entre los trastornos conductuales a largo plazo asociados a la desnutrición durante la lactancia, se observan deficiencias en las actividades motoras como son: el nado, el autoaseo, la deambulación y el enderezamiento del cuerpo (Altman *et al.*, 1970; Salas, 1972; Salas *et al.*, 1991; Gramsbergen y Westerga, 1992). Estas alteraciones están relacionadas con la disminución de la velocidad de conducción y la excitabilidad de las señales transmitidas a estructuras cortico-subcorticales que planean y ejecutan el movimiento a lo largo de la vía piramidal (Gramsbergen y Westerga, 1992). Esta vía controla el movimiento del tronco, las extremidades superiores, los ojos, la región de la cara y de las extremidades inferiores (Quirck *et al.*, 1995). Conductas más complejas como los mecanismos homeostáticos y circadianos que controlan el sueño, así como factores sociales como el juego y el cuidado materno, se ven modificadas, lo cual sugiere un daño a la red de estructuras neurales involucradas en procesos motivacionales y perceptuales debidos a la restricción del alimento (Mc Guire *et al.*, 1995; Loranca *et al.*, 1999; Regalado *et al.*, 1999, Cintra *et al.*, 2002; Valadares y de Sousa-Almeida, 2005).

El desarrollo físico como el peso corporal en animales desnutridos prenatal y posnatalmente se ve disminuído en un 20 al 60% respecto a los animales controles (Pérez-Torrero *et al.*, 2001; Barragán-Mejía *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2004; Frías *et al.*, 2006). En animales malnutridos el peso corporal promedio y de los bulbos olfatorios disminuye un 76% y 28%, respectivamente (Math y Davrainville, 1980). Por otra parte el peso del cerebro disminuye por efecto de la desnutrición entre un 6 y 10% del peso fresco en animales a los 30 y 60 días de edad (Pérez Torrero *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004).

Estudios concernientes al desarrollo de la musculatura en los animales desnutridos prenatalmente muestran una reducción de las fibras musculares lumbricales y del soleo

debido a la deficiencia en la formación de miotúbulos secundarios, lo cual se corrige parcialmente con una rehabilitación nutricia sin que el déficit se normalice completamente, aunque el déficit persiste en el volumen de la musculatura y las alteraciones en la activación eléctrica del nervio sural capaces de modificar su actividad funcional (Wilson et al., 1988; Segura et al., 2001; Segura et al., 2004).

Por otra parte se ha observado una relación del estado nutricional con la longevidad aunque no es muy clara. Hay trabajos recientes que muestran de manera paradójica que la restricción alimentaria posnatal podría asociarse con el alargamiento de la longevidad y la reducción de enfermedades relacionadas con el proceso de envejecimiento. Lo anterior sugiere que este fenómeno podría deberse a una menor producción de radicales libres, derivada del metabolismo de la ingesta de alimento por lo que una ingesta adecuada de alimento incrementa estos productos de desecho. Sin embargo, estos datos son controversiales ya que otros estudios muestran una disminución de la longevidad por restricción alimentaria durante la vida intrauterina, efecto que se ha asociado a un aumento de la presión sanguínea sistólica de asociada a la deficiencia del metabolismo del lactato en el músculo cardíaco y el flujo sanguíneo, de manera permanente (Lundell et al., 1996; Roseboom *et al.*, 2001; Sayer et al., 2002). Sin embargo, no cabe duda que la desnutrición es responsable de la alta mortalidad en etapa perinatal con una menor esperanza de vida derivada de deficiencias inmunológicas producto de alteraciones del sistema neuro-inmunoendócrino. Estos resultados muestran que el periodo de desarrollo en el cual incide la restricción alimentaria es relevante y su estudio nos permite comprender mejor los mecanismos que subyacen a estas alteraciones.

II. Sistema olfatorio

En la rata, el sistema olfatorio es importante en varias funciones vitales, tales como la discriminación de los alimentos, reproducción, regulación neuroendócrina, establecimiento del vínculo entre la madre con su cría; así como el disparo de las respuestas emocionales, la agresión y el reconocimiento de sus congéneres y el reconocimiento de los depredadores y las presas. Es un canal sensorial indispensable para la conducta de succión, aprendizaje, memoria y de las capacidades cognoscitivas

más elaboradas asociadas a estímulos olfatorios (Rudy y Cheatele, 1977; Almli *et al.*, 1985; Shipley *et al.*, 1995; Herz, 2002).

En el sistema olfatorio existen varios mecanismos que subyacen al proceso de identificación de una amplia variedad de olores. Estos mecanismos se producen desde la entrada de la molécula odorífera a nivel periférico en los receptores olfatorios hasta el procesamiento de la señal codificada hacia el BO y la corteza, pasando por los diferentes niveles de procesamiento subcortical y cortical en los cuales la señal cual se integra, cuyo conocimiento y análisis resultan de gran interés científico.

Componentes del bulbo olfatorio principal

A. Poblaciones celulares y organización laminar. Características morfológicas y funcionales

El BO se localiza en la porción anterior del encéfalo. Se caracteriza por derivar del rinencéfalo, porción del cerebro filogenéticamente más antigua en los vertebrados (Romer y Parsons, 1981; Márquez-Orozco, 1991). En mamíferos la criba del hueso etmoidal forma el techo de la cavidad nasal sitio donde se ubica el epitelio olfatorio en donde se adhieren las moléculas odoríferas. Los huesos de la cavidad nasal o cornetes aseguran una turbulencia de la columna de aire, permitiendo a las moléculas volátiles alcanzar el epitelio olfatorio. Este epitelio está cubierto de mucosidad, en la cual protruden los receptores olfatorios localizados en las porciones apicales de las dendritas de la célula bipolar o neurona olfatoria receptora. Sus axones son proyectados hacia el BO en donde se establece la primera sinapsis y se forma lo que se denomina nervio olfatorio o primer par craneal. El procesamiento de las señales en el sistema olfatorio accesorio, requiere que éstas lleguen a los receptores vomeronasales ubicados en la región palatina del órgano vomeronasal para después ser proyectadas hacia el bulbo olfatorio accesorio el cual se localiza en la porción posterior del bulbo olfatorio. Posteriormente la señal es enviada al complejo amigdalino y a las regiones corticales (Butler y Hodos, 1996). Figura 1.

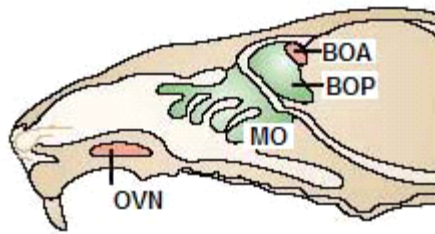


Figura 1. Esquema del cráneo de una rata en el que se muestra el bulbo **olfatorio** principal (BOP), el bulbo olfatorio accesorio (BOA), el epitelio de la mucosa olfatoria (MO) y el órgano vomeronasal (OVN). Modificado de Mombaerts, 2004.

B. Neuronas olfatorias receptoras

Las neuronas olfatorias receptoras (NORs) son células bipolares, las cuales constituyen el primer paso en la recepción olfativa, reciben el estímulo procedente de odorantes volátiles y lo transmiten eléctricamente por medio de su axón hacia el BOP. Estas neuronas se encuentran embebidas en la mucosa o neuroepitelio olfatorio, la cual se ubica en la bóveda nasal en la región de la placa cribiforme y la pared media de los cornetes superiores. En los vertebrados el epitelio olfatorio contiene tres tipos celulares: las neuronas sensoriales bipolares, las células de apoyo o sostén y las células basales. La información aferente de este neuroepitelio es llevada hacia los BO por medio del nervio olfatorio. La estimulación de los receptores olfatorios se produce cuando las moléculas aéreas entran a la cavidad nasal, donde son sujetas a turbulencias de aire. Una vez que las partículas volátiles son llevadas por el aire y alcanzan el epitelio olfatorio o mucosa olfatoria, estas pasan a través de la capa del moco que cubre el epitelio. Las macromoléculas odorantes en el moco permiten la mezcla de olores para unirse a los receptores. Las NORs yacen en el epitelio columnar pseudoestratificado el cual descansa sobre una lámina vascular propia. Los receptores olfatorios son neuronas bipolares cuyos cuerpos celulares se ubican en los dos tercios basales del epitelio desde donde extienden sus dendritas apicales hacia la superficie epitelial. Las células basales del epitelio son células troncales asociadas al reemplazamiento de las NORs las cuales poseen la característica de tener un promedio de vida corta y ser reemplazadas continuamente durante toda la vida del individuo (Farbman, 1990). Su vida media es de 30 a 60 días en la rata, pudiéndose prolongar en condiciones ambientales favorables (Farbman, 1990; Smith, 1999). Por lo general, aquellas NORs que muestran núcleos cercanos a la membrana basal son las más jóvenes, mientras las que poseen núcleos más cercanos a la superficie

apical del epitelio son las más maduras. La punta periférica de la dendrita de la NOR se engrosa ligeramente para formar lo que se conoce como botón olfatorio. Desde el botón olfatorio algunos cilios se extienden hacia la capa de la mucosa. Estudios previos muestran que la porción apical de los cilios es el sitio de transducción quimiosensorial. Figura 2.

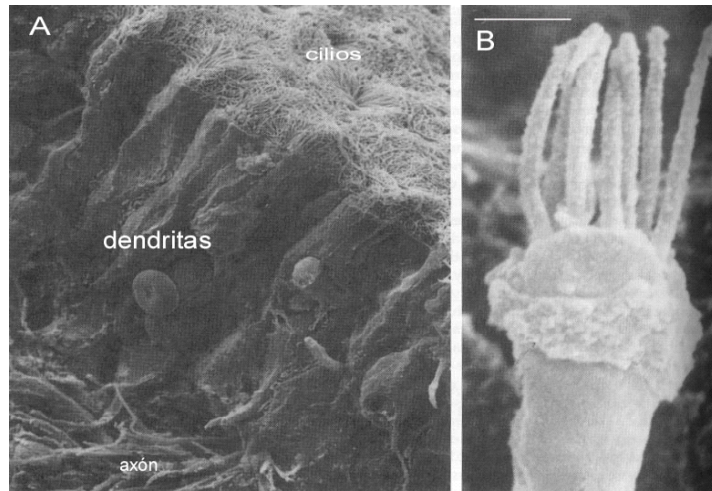


Figura 2. Fotomicrografía de barrido del epitelio olfatorio, izquierda, A. A la derecha se muestra con detalle de un botón dendrítico distal de una neurona olfatoria receptora (NOR) con cilios, B. Los receptores a los cuales se unen las moléculas olorosas se localizan en la porción apical de éstos. Calibración 0.5 μ M (Modificado de Morrison y Costanzo, 1990 en Zigmond, 1999).

La transducción de la señal de los receptores de la mucosa olfativa hacia el BO, se lleva a cabo por la captación de moléculas odorizantes que hacen contacto con los receptores transmembranales 7TMr las cuales son proteínas localizadas en la porción apical de los cilios de las neuronas receptoras olfatorias. Estas proteínas se acoplan a proteínas G que activan ya sea la adenil ciclasa, AC para generar adenosín monofosfato cíclico, AMPc o fosfolipasa C, PLC, para generar fosfitidil inositol 3, IP3. Estos segundos mensajeros abren canales que permiten la entrada de calcio o sodio dentro del cilio. Esta entrada de iones depolariza la membrana lo cual permite modular los niveles de calcio intracelular que producen la generación de potenciales de acción que son conducidos a través de los axones de las neuronas receptoras olfativas hasta el BO (Shibley *et al.* 1995). Figura 3.

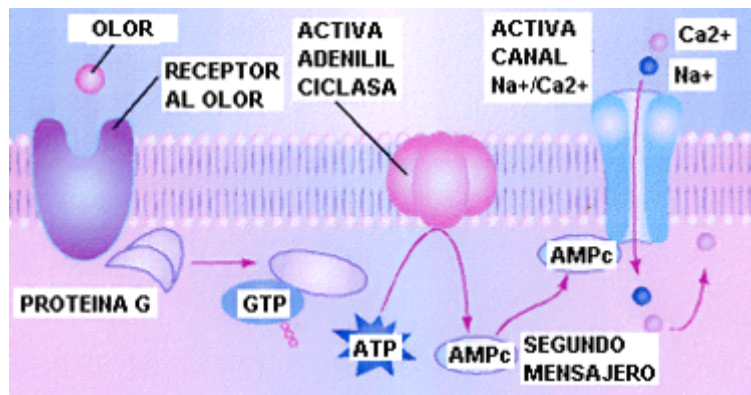


Figura 3. Mecanismo de transducción de la señal olfatoria en vertebrados. La molécula olorosa se une al receptor localizado en el cilio de la NOR activándose así la proteína G capaz de inducir la formación de segundos mensajeros como la adenilil ciclasa, los cuales a su vez promueven la formación de IP₃, el cual es inductor de la apertura de canales iónicos. La apertura de estos canales permite la entrada de calcio o sodio intracelular por el aumento de los niveles de AMPc modificándose así la polaridad de la membrana celular. Tomado de Mombaerts, 2001.

Boeck (en Smith y Shepherd, 2003) clasificó las NORs en especializadas y generalizadas. Las primeras se distinguen por responder de manera restringida a feromonas, mientras que las generalizadas responden a un amplio intervalo de moléculas tales como los alcoholes o los ésteres asociados a diferentes tipos de alimentos y objetos en el medio ambiente. Algunas NORs se encuentran en categorías intermedias las cuales responden ampliamente a diferentes tipos de moléculas. Los vertebrados poseen NORs generalizadas las cuales poseen la capacidad de detectar feromonas relacionadas con la conducta sexual y el cuidado materno, lo cual podría sugerir que las NORs especializadas pudieron acoplarse a las feromonas que ya existían en este grupo. Por otra parte las diferentes densidades de receptores para determinada molécula odorífera refleja las afinidades que existen entre ellos en las diferentes NORs y su ligando (Smith y Shepherd, 2003). Recientemente se ha encontrado otro grupo de receptores quimiosensoriales localizados en el epitelio olfatorio que se han asociado a la detección de señales sociales como el estrés o feromonas de la orina denominados receptores-asociados a aminas-traza (TAARs) lo cual viene a revolucionar aún más los precedentes sobre la detección de las feromonas en un sitio que no corresponde exclusivamente al sistema vomeronasal (Liberles y Buck, 2006).

Se han realizado experimentos para mapear la activación de los receptores olfatorios sensibles a odorantes (receptores 7-transmembranales, 7TM) a partir de la clonación y amplificación de la familia multigen que codifica para las proteínas de estos

receptores que se expresan fenotípicamente en una disposición en bandas (3-4) rostro-caudalmente en la mucosa olfatoria, diseño con el cual se ha observado una organización topográfica de las subfamilias de genes que codifican para las proteínas formadoras de los receptores olfatorios en el epitelio (Buck y Axel, 1991). La evidencia muestra que los axones de las NORs expresan el mismo gen receptor que converge en uno o más glomérulos del BO con sitios de convergencia similares en respuesta al odorante, Figura 4.

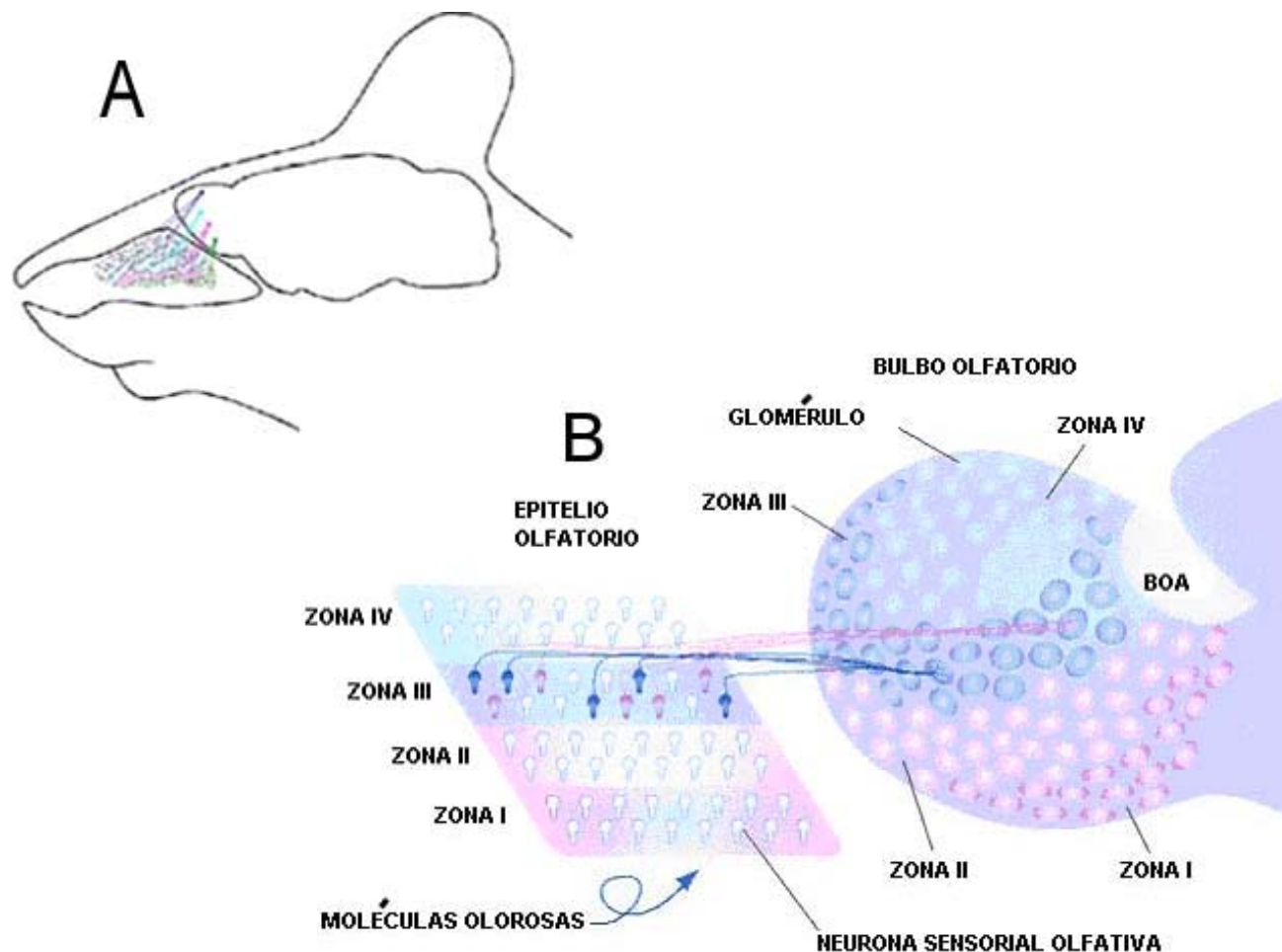


Figura 4. Esquema de las NORs del epitelio olfatorio que proyectan a los GOs en el BO, A. Cara medial del BO derecho en el cual se muestran los patrones de conexión entre el epitelio olfatorio y el BO, B. La mucosa olfatoria de los mamíferos puede ser subdividida en cuatro zonas de igual superficie. Cada NOR, al parecer representa una proteína receptora específica. Los cuerpos celulares de las NORs se restringen a una zona. Los axones convergen hacia uno o varios glomérulos en cada una de las dos mitades de los bulbos. Las zonas epiteliales corresponden a dominios equivalentes del bulbo, aunque los límites precisos del dominio bulbar permanecen sin definir. Los glomérulos para un cierto receptor olfatorio no ocupan posiciones estereotipadas en el bulbo, sino que exhiben permutaciones locales. Modificado de Mombaerts (2001) y Buck (2004).

Acerca de la participación de los neurotransmisores locales en el neuroepitelio olfatorio, están el glutamato, el óxido nítrico y la carnosina, los cuales depolarizan la membrana de las NORs. Entre las funciones asociadas a la carnosina se ha encontrado la

liberación de calcio en sinaptosomas asociado con la presencia de enzimas de síntesis y degradación de las NORs (Burd *et al.*, 1982). En cuanto al óxido nítrico (ON), se presume que participa en el proceso de la transducción de la señal, aunque todavía son necesarios resultados contundentes (Breer y Shepherd, 1993; Riesgo-Escovar, 1995).

C. Neurogénesis y fisiología del bulbo olfatorio

En el prosencéfalo de los mamíferos, la mayoría de las neuronas se originan de células que proliferan en la zona subventricular (ZSV) la cual cubre los ventrículos laterales. En esta región, la neurogénesis continúa hasta el estado adulto. La mayoría de las células generadas en esta región son precursores neuronales con progenie que migra rostralmente a lo largo de una vía conocida como el “flujo migratorio rostral” antes de alcanzar el BO donde se diferencian. En el BO la neurogénesis se produce por la migración celular a gran distancia a través del flujo migratorio y se completa tras el proceso de apoptosis o muerte celular programada (Rocheffort *et al.*, 2002). Figura 5.

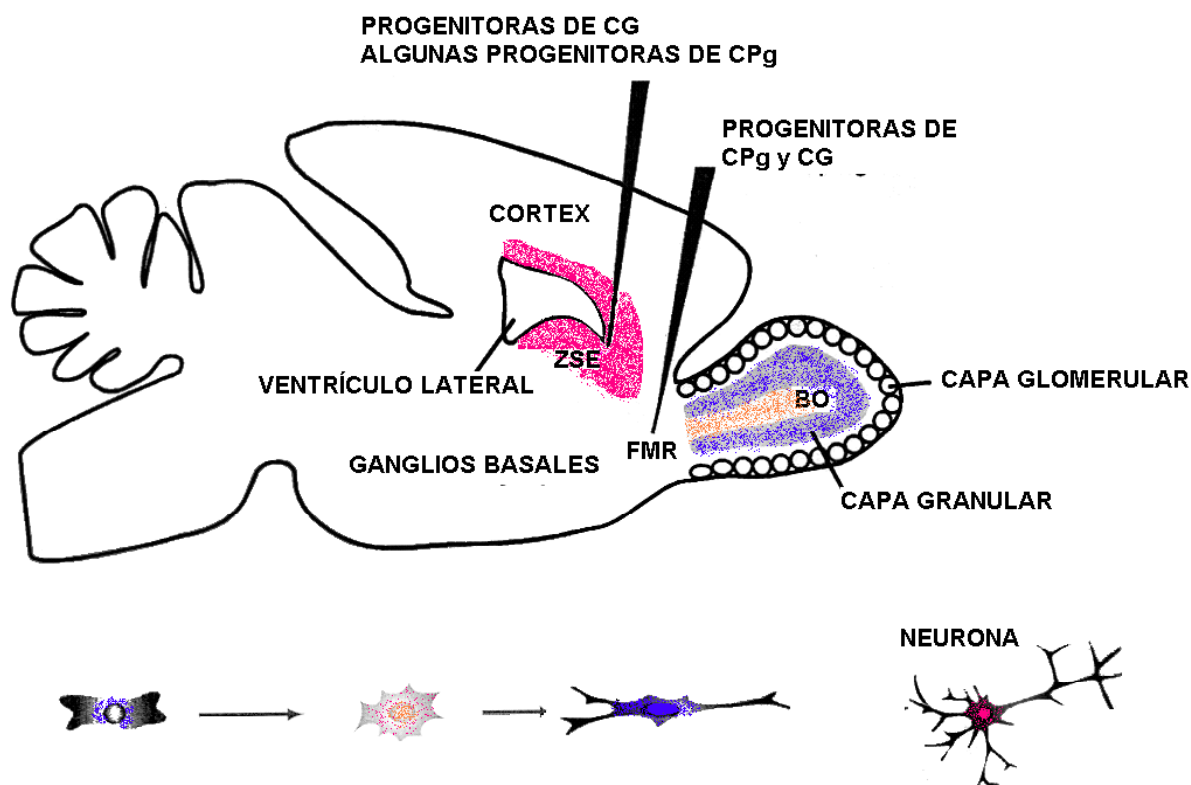


Figura 5. La generación de los diferentes tipos celulares que conforman el BO se origina principalmente de la zona subependimial (ZSE), aunque evidencia reciente muestra que las células periglomerulares (CPg) se originan básicamente del flujo migratorio rostral (FMR) y es heterocrónica a sus interneuronas homólogas, las células granulares (CG). Modificado de Guillemot y Parras, 2005.

En el humano, el desarrollo de la parte anteroventral de las vesículas telencefálicas durante la sexta semana de gestación forman los bulbos olfatorios a manera de dos evaginaciones huecas, las cuales forman paredes bien desarrolladas que pierden la luz hacia el tercer mes de gestación. En la etapa temprana se induce la formación de plácodas nasales, de donde se originan las NORs, así como las células epiteliales de sostén (Márquez-Orozco, 1991). Las NORs del epitelio olfatorio se derivan de las plácodas ectodérmicas craneales cuyos axones crecen hacia el prosencéfalo rostral los cuales van acompañados por una masa de células que migran (Burd y Tolbert, 2000). En los vertebrados como en los invertebrados, las células gliales participan en la formación de los GOs, los cuales son las unidades funcionales del sistema olfatorio. Las células gliales se presentan como células envainantes especializadas que migran hacia el cerebro a lo largo de los axones olfatorios penetrando la capa glomerular prospectiva para formar cubiertas o cápsulas parciales alrededor de lo que serán los glomérulos durante el desarrollo temprano, además la evidencia muestra que potencialmente estas células con un bajo grado de diferenciación pueden formar futuras neuronas (Valverde *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 1999 y Álvarez-Buylla, no publicado).

Debido a la naturaleza plástica del BO, así como a su capacidad de regeneración y neurogénesis se ha generado un gran interés sobre el estudio de la formación de un sistema de guía topográfico en el cual participan mecanismos moleculares que inciden en las neuronas en desarrollo que se originan de la zona subventricular del prosencéfalo y se dirigen hacia el BO (Conover *et al.*, 2000). Las células mitrales (CM) y las células en penacho (CP), se originan prenatalmente en tanto que la producción y la proliferación de las interneuronas que modulan la información entre estas neuronas, como es el caso de las interneuronas granulares o yuxtglomerulares se produce posnatalmente, (Altman, 1969; Kishi, 1987; Wu *et al.*, 1999). Liu y Rao (2003) han mostrado que en el BO se produce una actividad capaz de atraer las células precursoras neuronales la cual está presente en todas las capas del BO, excepto en la capa granular. Esta actividad y respuesta neuronal persiste desde los estadios embriogénicos hasta la edad adulta. Estos autores también observaron que la remoción del BO rostral puede reducir significativamente la migración neuronal proveniente de la ZSV hacia el BO. Estos resultados muestran que la continua migración de neuronas de la ZSV hacia la corteza del BO se asocia a la capacidad plástica de proliferación celular en las etapas tardías, lo cual

revela además la existencia de moléculas quimio-atrayentes que actúan como guías en la migración y desarrollo neuronal en el SNC.

Además de lo antes expuesto, durante el desarrollo del BO los receptores al olor también participan en la guía axonal hacia sitios topográficos específicos. Tanto los receptores al olor como los factores neurotróficos, pueden actuar como guías de los axones a sus dianas durante el desarrollo o la regeneración. Las NORs primarias que expresan la misma proteína receptora al olor proyectan a sitios topográficamente fijos del BO (Bailey, 1999; Tsim et al., 2004).

En el BO se ha propuesto la existencia de neuronas postsinápticas capaces de expresar moléculas guía, necesarias para dirigir los axones olfatorios primarios hacia su blanco. Royal y colaboradores (2002) observaron que ciertas deleciones o mutaciones en algunos receptores a odorantes, produce que los axones de las neuronas que lo expresan, puedan ubicarse en la capa del nervio olfatorio, en lugar de converger hacia GOs específicos. Así tras una ablación química del BO ratones transgénicos carecen de una proporción normal de células mitrales (CM), células en penacho (CP) o células periglomerulares (Pg), modificándose la dirección de los axones hacia GOs que se dirigen una posición específica del BO. Esto muestra que a pesar de la disminución en el número de las células de segundo orden, la señal se envía adecuadamente entre los axones de las NORs hacia los GOs y aunque se produce una desorganización de estos tipos celulares en el BO, no se afecta el blanco topográfico de los axones olfatorios primarios. Estos resultados aportan la evidencia de que la dirección diana del axón en el BO es independiente de la posición del soma de la CM, lo cual indica que otras células pudieran proveer moléculas guías apropiadas, tal como sucede con otros sistemas sensoriales.

La neurogénesis y el pico de proliferación de los principales tipos celulares del BO varía temporalmente. Según la especie se producen desde la gestación (G) hasta el periodo posnatal (P). En la rata, las CM se originan a partir del día G12 cuyo pico máximo de proliferación se produce en el día G15 y continúa hasta el día G21. Las CP de la capa externa se originan en el día G12, proliferan del día G17 al G19 decayendo del día G20 al P2. Las CP de la capa interna se originan en el día G20.

En lo que se refiere a las células granulares una proporción de alrededor del 24% del total ya está presente al nacimiento (G21) y continúan proliferando posnatalmente. Su tasa de neurogénesis comienza a decaer a partir del día 20 al 30P, manteniéndose hasta etapas del adulto (P180).

La formación de los GOs se origina desde el día G19-20, etapa en que se les denominan protoglómérulos. Su desarrollo continúa posnatalmente cuando se van añadiendo los distintos componentes celulares. El máximo desarrollo de los GOs se produce a partir del día P2, en el día P8 se ha formado casi el 90% del total de los GOs y en el día 14 el 100% de la población celular ya se completado. El desarrollo de los GOs continúa y se considera que la conformación celular y funcional de los GOs, al igual que la presencia de los NTs en el día P24 es similar a la del adulto.

En lo que se refiere a la densidad neuronal, la presencia de CM y granulares en el BO es muy alta, respecto a las CP (Altman, 1969; Shipley, 1995; Malun y Brunjes, 1996; Bailey *et al.*, 1999). Figura 6.

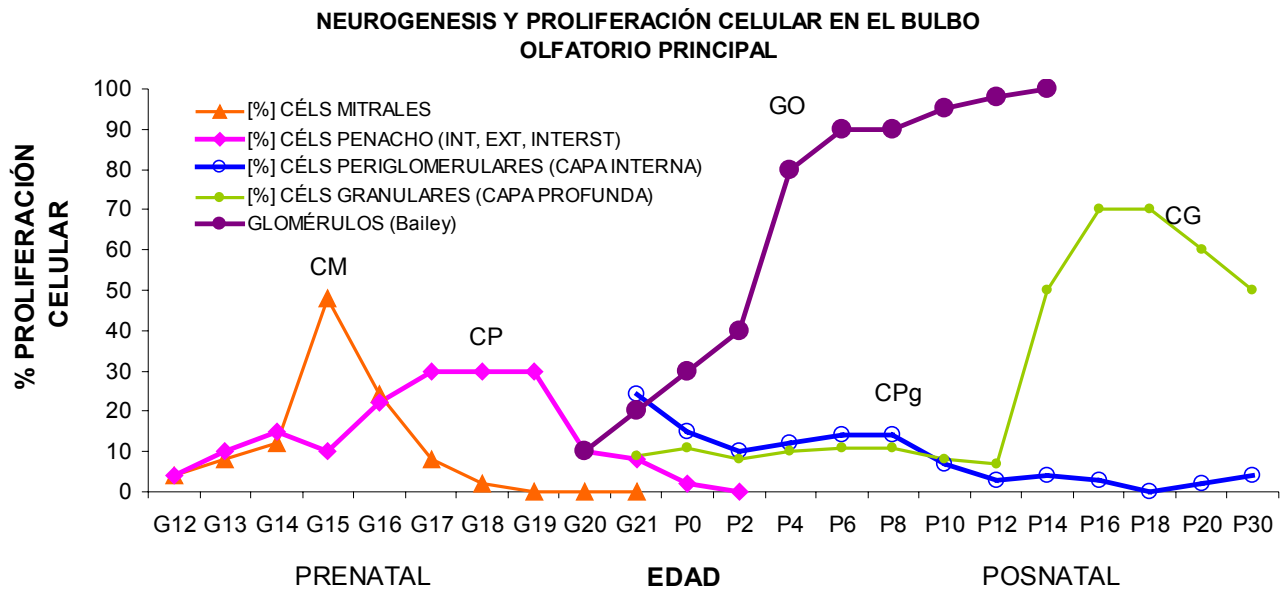


Figura 6. Neurogénesis y proliferación de los principales componentes celulares del BO. Las macroneuronas se originan en la etapa gestacional, mientras que las microneuronas como las células granulares y periglomerulares se originan y proliferan hasta la etapa posnatal (P). El origen de los protoglómérulos están representados en los días 19 y 20 de la gestación, su proliferación y desarrollo continúa en etapa posnatal. Gráfica basada en los datos tomados de Bayer, 1983 y Bailey *et al.*, 1999, Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002.

De manera resumida a continuación se presentan algunos de los eventos iniciales en el desarrollo del BO de la rata.

En el día G11-14 se produce la inducción del BO el cual se caracteriza por la llegada de los axones de las NORs y las células de Schwann al telencéfalo rostral. Una subpoblación de estos axones tempranos penetran profundamente a la zona subventricular (Santacana *et al.*, 1992). La llegada de estos axones “pioneros” induce en las neuronas que proliferan, un cambio en la cinética del ciclo celular y en la tasa de diferenciación de las células precursoras formadoras del BO. Estos axones constituyen una población transitoria presente en el estadio inicial del desarrollo del BO (G13 al 14) y se observan después del día G15-16 (Gong y Shipley, 1995). En el día G14, el BO se observa como una pequeña evaginación del telencéfalo rostral, con un ligero engrosamiento de la capa del manto. En el día G15 al 16 se produce la evaginación del BO (Gong y Shipley, 1995). En G16 se observa ya la forma característica del bulbo. En G17 al 18 se forma la capa de las fibras nerviosas. Los axones de las NORs encapsulan la mayor parte del bulbo. En el día G18 ya se observa una organización laminar distintiva de las capas celulares del BO. En el bulbo rostral, los axones de las NORs y los procesos de la glía radial se interdigitan para formar los protoglomerulos que consisten de glomerulos axonales y glomerulos gliales de modo que en el día G19 al 20 los protoglomerulos ya se han formado. Hacia el día del nacimiento (G21 al P1) las células periglomerulares migran a la periferia de los GOs reclutándose.

En el periodo gestacional las CM ya se han formado pero aún no contribuyen a la formación del BO. En el día P4 al P5 se produce la entrada de la dendrita apical de las CM para formar parte del glomerulo, restringiéndose solamente a uno (Bailey *et al.*, 1999). Durante este periodo las células granulares continúan su proliferación hasta etapas avanzadas del desarrollo, lo cual ha llevado a sugerir que estas células se producen continuamente durante la vida del individuo. Figura 7.

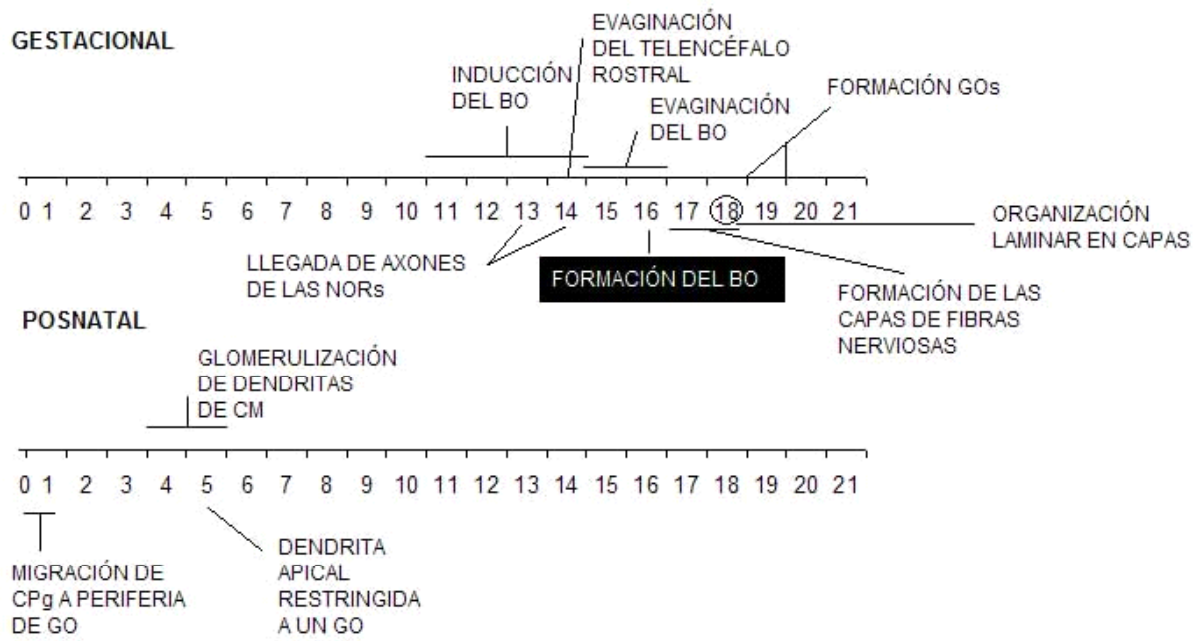


Figura 7. Cronograma de la formación del bulbo olfatorio durante la gestación (G) y el periodo posnatal (P). Basado en datos de Santacana *et al.*, 1992, Gong y Shipley, 1995 y Bailey *et al.* 1999.

El BO y sus vías asociadas constituyen parte de un sistema sensorial altamente conservado en la evolución de los vertebrados. El BO ha sido reconocido por su alta capacidad de sinaptogénesis y neurogénesis en la etapa adulta, característica que lo convierte en un modelo de estudio interesante desde el punto de vista de la plasticidad neuronal (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Kornack y Rakic, 2001; Rakic 2002; Carleton *et al.*, 2003).

Las observaciones sobre las células troncales o células multipotenciales en el BO embrionario, aportan conocimiento sobre los factores que intervienen en la proliferación y diferenciación de las neuronas y de la glía durante el desarrollo y la etapa adulta, así se sabe que durante la embriogénesis tardía, las neuronas originadas *de novo* son agregadas al BO a partir de células troncales localizadas en la ZSV del prosencéfalo (Vicario-Abejon *et al.*, 2003).

Finalmente en lo que se refiere a factores epigenéticos que influyen en el desarrollo de la población neuronal del BO, se encuentra el factor ambiental. Hay la evidencia de que la exposición a un ambiente enriquecido con olores desde el primer día de nacimiento en la rata, potencialmente puede favorecer la proliferación celular y aumentar el número de

neuronas en la capa plexiforme externa y periglomerular en ratones adultos. Este efecto de un ambiente estimulante pudiera asociarse a un mejoramiento del desempeño de la memoria olfativa de los animales (Harvey y Cowley, 1984; Panhuber y Laing, 1987; Rochefort *et al.*, 2002).

D. Organización laminar del bulbo olfatorio principal

Existen diferentes tipos celulares que componen el BO, tales como las células periglomerulares (Pg) con tres tipos de células yuxtglomerulares, las cuales conforman la cubierta glomerular en conjunto con las células de axón corto; las células en penacho externas y medias, las células de van Gehuchten, las CM, las células granulares, las células de Blanes, las células horizontales de Cajal, de Golgi, así como algunas células en proliferación indiferenciadas.

A continuación se mencionan las características más notables de los tipos celulares más estudiados cuya población predomina en las capas que constituyen el BO.

El BO principal está constituido básicamente por 5 capas de células tal y como se muestra en la Figura 8.

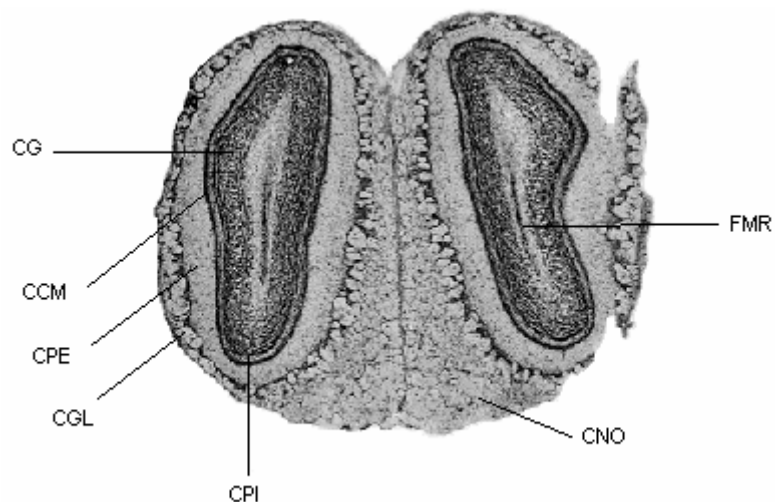


Figura 8. Corte transversal del bulbo olfatorio principal (BO) de la rata. Capa del nervio olfatorio (CNO), capa glomerular (CGL), capa plexiforme externa (CPE), capa de las células mitrales (CCM), capa plexiforme interna (CPI), capa de las células granulares (CG) y flujo migratorio rostral (FMR). Modificado de Paxinos y Watson (1986).

1. Capa glomerular (CGL). Es la capa adyacente interna respecto al nervio olfatorio en el BO, Figura 8, 9 y 10. Los glomérulos olfatorios (GOs) son el sitio inicial de la integración sináptica en el sistema olfatorio después de que la molécula ha alcanzado los receptores y se ha realizado el procesamiento de la transducción de la señal. La capa es conspicua y se caracteriza porque los axones primarios de las NORs, hacen sinapsis con las dendritas apicales de las CM y CP formando un denso neurópilo dendrítico. En la formación del GO se ha calculado que existen algunos millones de axones de las NORs que convergen en cada uno de los glomérulos existentes. Estos a su vez llegan a contactar las dendritas de las células mitrales cuya dendrita apical entra a un solo glomérulo, la cual se ramifica en su interior. Se calcula que 25 células mitrales pueden proyectar a un solo glomérulo y que hay además, la presencia de células yuxtglomerulares y gliales en la periferia y el centro del neurópilo (Shipley, 1995). Los GOs están circundados por células Pg, las cuales son interneuronas o células inhibitorias, las cuales morfológicamente le confieren al glomérulo la forma esférica característica y funcionalmente regulan la transmisión de la información proveniente del nervio olfatorio a las células mitrales y en penacho (Shipley *et al.* 1995; Shipley y Ennis, 1996).

Formación glomerular. La formación de los glomérulos olfatorios depende de factores periféricos, tales como la participación de células receptoras primarias o células de Schwann del nervio olfatorio, así como la glía radial y los astrocitos. La glía radial que forma los protoglomérulos migra hacia el centro del neurópilo. Los glomérulos delineados por las células gliales son formados en el neurópilo. Para el caso de la palomilla *Manduca sexta* en la etapa adulta se forma un límite de glía en las capas múltiples alrededor del axón, la cual presenta una gran proporción de dendritas en cada glomérulo: “Antes de la llegada de los axones receptores, el neurópilo asociado a las células gliales forman algunos cuerpos celulares de borde grueso que circunscriben la esfera existente del neurópilo. Como un receptor, los axones entran, la glía prolifera y extiende sus procesos entre los protoglomérulos que se forman *de-novo* para migrar hacia el centro del neurópilo. Eventualmente, los bordes llegan a ser más gruesos y complejos, alcanzando las bases del nuevo glomérulo” (Oland y Tolbert, 1996).

En lo que se refiere al número de GOs que conforman esta capa en el BO, en la rata se ha estimado un valor aproximado entre 1825 y 3000 (Abercrombie, 1946; Allison,

1953; Meisami y Safari, 1981), mientras que sus dimensiones se han estimado en 68 μm (10-12 semanas), 71-77 μm (Meisami y Safari, 1981; Pomeroy et al., 1990; Bailey et al., 1999) o hasta las 80 y 160 micras de diámetro en la rata (Shipley y Ennis, 1995). Por el momento no se ha establecido una diferencia morfológica entre los glomérulos que conforman el BO y el BOA, pero al parecer los correspondientes al BOA son de menores dimensiones. En cuanto a la densidad glomerular, se sabe que la formación de glomérulos se produce inicialmente de la porción más rostral a la distal. Así se muestra una diferencia en la densidad rostro-caudal, con una densidad menor en la porción media del BO la cual aumenta en la porción lateral rostral y disminuye hacia la región ventral medial y dorsal (Royet 1988; Bailey, 1999). Figura 9.

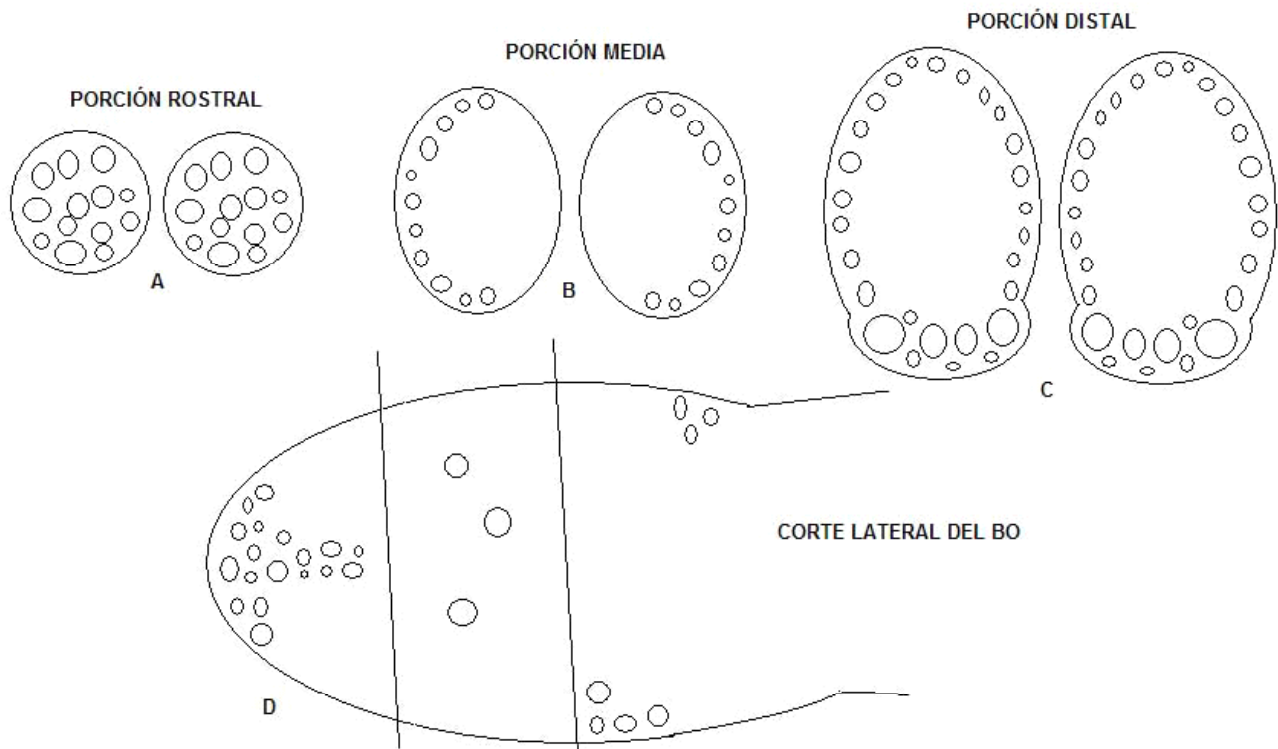


Figura 9. Cortes transversales y longitudinal del BO. Se muestra el gradiente de densidad de los glomérulos olfatorios en los distintos cortes. En A) se observa una mayor densidad de GOs en toda la superficie; en B) se muestran en mayor concentración los GOs en la región lateral. C) corte que muestra una preponderancia de GOs en la región ventral y medial. D, muestra la totalidad del BO y la distribución de los GOs en la vista longitudinal (reconstrucción basada en observaciones de Royet et al., 1988 y Bailey et al., 1999).

Estudios de microscopía electrónica en la rata en estadio embrionario y posnatal temprano muestran la penetración de las células envainantes de la capa del nervio olfatorio (G11-14) en la que se presume será la capa glomerular, iniciándose así la formación de los glomérulos (Valverde 1992; Bailey et al., 1999). Las células envainantes

forman paredes que circundan a las regiones de alta densidad sináptica. La glía radial alcanza la que será la capa glomerular. Se ramifica profusamente para formar un plexo, el cual contribuye a la delimitación del glomérulo individual a partir del día 19 gestacional (Bailey *et al.*, 1989; Valverde *et al.*, 1992). Los procesos de los astrocitos individuales se restringen exclusivamente a un solo glomérulo al igual que los procesos multidendríticos de las CM, de las CP y las yuxtglomerulares los cuales contribuyen a la formación de un glomérulo maduro único (Bailey y Shipley *et al.*, 1993).

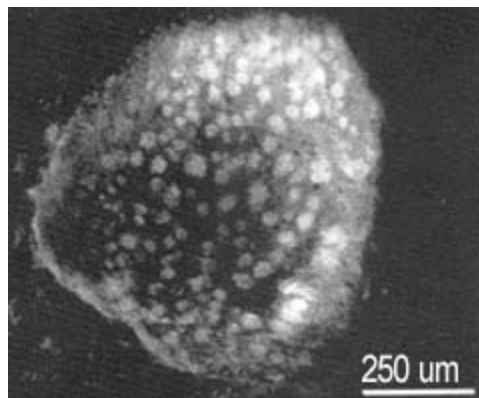


Figura 10. Fotomicrografía que muestra el volumen de un bulbo olfatorio con glomérulos olfatorios (GOs) en color blanco. La barra de calibración representa 250 μ M. Modificada de Purves (1994).

La glía tiene función de apoyo, aunque existen cada vez más evidencias de su participación en el proceso de señalización, regeneración, así como en su capacidad para expresar moléculas promotoras e inhibidoras del crecimiento axonal (Liesi *et al.*, 1983; Butt, 2004). Durante el desarrollo en ratones transgénicos se ha observado la formación de protglomérulos olfatorios con la presencia única de glía y NORs, independientemente de la presencia de CM y CP (Bailey *et al.*, 1999). Existe además evidencia de la formación de GOs en ausencia de los axones de CM en ratones mutantes y la participación tardía de estas células (Hill *et al.*, 1991; Royal *et al.*, 2002). En cuanto a la formación del glomérulo olfatorio se sabe que los axones de las CM convergen típicamente a dos glomérulos fijos topográficamente en cada BO lo cual funcionalmente explica la formación de un mapa intrabulbar (Royal *et al.*, 2002). En etapa posnatal los glomérulos continúan su desarrollo y las estructuras que se van agregando para su conformación son las siguientes en el día P0, las NORs establecen contacto con el BO y las células Pg llegan a formar parte del BO. Del día P3-5 las CM se organizan dentro del BO, primero tangencialmente y posteriormente de manera radial para conformar la capa de las CM. En el día P4 la

dendrita apical de la CM es proyectada hacia el GO para comprometerse con él. En el día P7 las NORs hacen contacto con el GO. En el día P14 las CM y las NORs ya han establecido contacto dentro del GO, constituyendo así una etapa crítica. Se considera que para esta etapa los GOs ya poseen la estructura física y neuroquímica similar a los de un organismo adulto. Sin embargo, la evidencia muestra que la actividad eléctrica del BO similar a la de un organismo adulto se presenta hasta el día P24, lo cual probablemente se debe al proceso de maduración de las células granulares que continúan proliferando en esta etapa. (Salas *et al.*, 1969; Shipley, 1995; Malun y Brunjes, 1996; Bailey *et al.*, 1999).
 Figura 11.

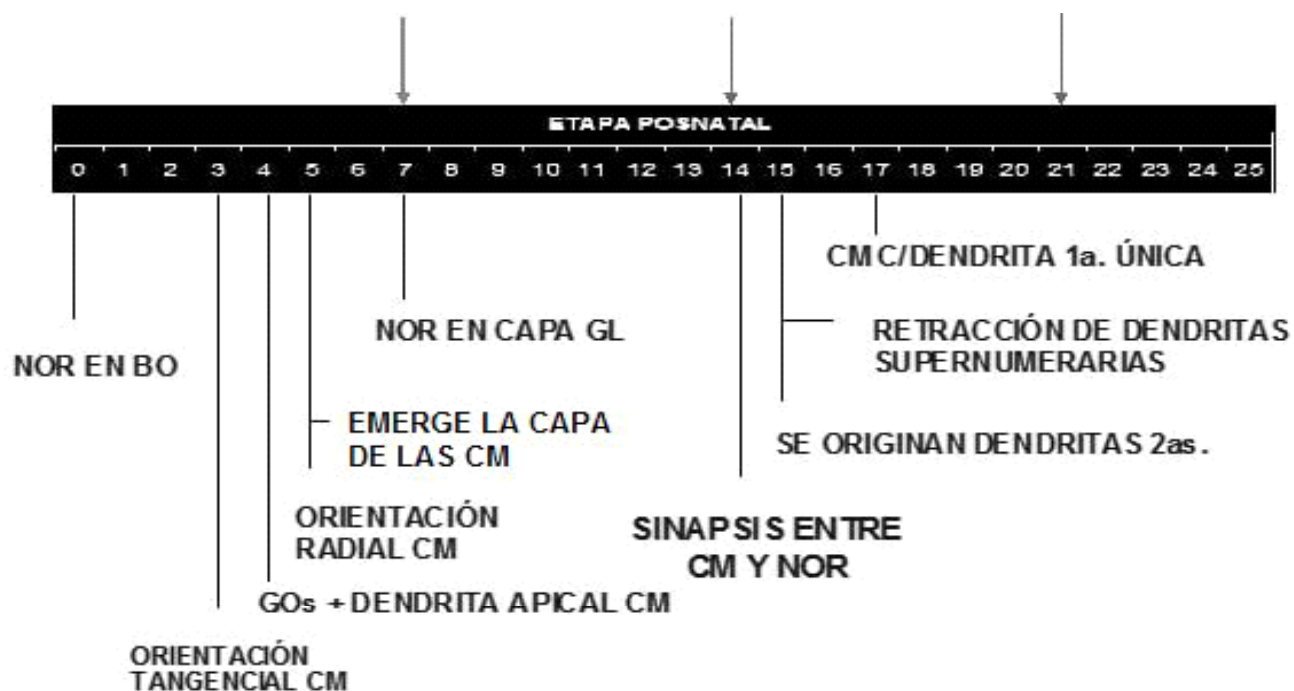


Figura 11. Cronograma de la participación de las principales estructuras celulares que conforman el glomérulo olfatorio en etapa posnatal. Cuadro basado en descripciones realizadas por Malun y Brunjes, 1996.

En el GO converge la información transducida proveniente de las NORs para ser procesada y por las neuronas de segundo orden, CM y CP y ser modulada por las interneuronas, las CG y las CPg, estas últimas circundantes del GO, señal que es enviada a relevos de integración superiores (Kosaka y Kosaka, 2005). En los mamíferos, los axones de las NORs convergen para formar los glomérulos en el BO creando un mapa simétrico de los bulbos, el cual refleja la presencia de un circuito intrabulbar, el cual está mediado por CP externas. Estas células reciben información proveniente de un glomérulo en un lado del bulbo, desde el cual proyecta los axones que terminan específicamente por

debajo de los glomérulos isofuncionales en el bulbo opuesto, para formar un mapa intrabulbar (Marks y Belluscio, 2005 SFN).

Entre algunos de los NT involucrados en la actividad del conjunto glomerular de la capa que la constituyen, en especies como el hámster o el cobayo están la metionina-encefalina (met-ENK), el ácido gama-amino butírico (GABA), el GABA+sustancia P (SP), dopamina (DA) y el neuropéptido Y (NPY) (Burd y Tolbert en Finger et al., 2000).

Se ha observado la activación diferencial de conjuntos glomerulares en algunas regiones del BO, en respuesta a estímulos químicos simples. Estos patrones de activación podrían indicar una organización diferencial del sustrato anatómico en forma de un mapa glomerular en respuesta a factores intrínsecos del BO y a sus componentes, tales como el umbral de respuesta a parámetros de estimulación olfatoria y el gradiente de concentración. Así, una activación a estímulos derivados de grupos funcionales químicos muy relacionados entre sí, sugiere una discriminación olfatoria altamente especializada que se produce desde una región periférica en la superficie del BO (Royet *et al.*, 1988 y Uchida, *et al.*, 2000).

2. Capa plexiforme externa (CPE). Esta capa está adosada internamente a la capa glomerular. Muestra una baja densidad celular con un denso neurópilo (Figura 7). Los principales elementos celulares que la conforman son las prolongaciones dendríticas de las células mitrales y somas de las células en penacho exteriores (10-15 μ m), células en penacho medias (15-18 μ m) y células granulares. También están presentes las células de van Gehuchten (12-17 μ m) las cuales son células que se caracterizan por tener dos o más dendritas primarias gruesas que yacen en esta capa. Estas células poseen dendritas secundarias que corren tangencialmente a la CPE. Estas células forman sinapsis recíprocas con las dendritas apicales de células granulares (CG). Las CP medias y profundas, por su ubicación en la capa, tienen proyecciones hacia el nervio olfatorio al igual que las CM, por lo que funcionalmente pueden ser consideradas parte de las células eferentes del BO. El aspartato (ASP) es el NT por excelencia empleado por las células en penacho, aunque también participan el glutamato (GLU), la colecistoquinina (CCK), la sustancia P (SP), el factor liberador de corticotrofina (CRF), el polipéptido intestinal

vasoactivo (VIP), así como el ácido gama-amino-butírico (GABA) en sinergia con la parvoalbúmina (Shipley *et al.*, 1995, Chen y Shepherd, 1997). Figura 8 y 12.

3. Capa de las células mitrales (CCM). Esta capa contiene una gran densidad de somas de CM y una menor densidad de CG granulares arregladas en una monocapa. Esta capa se adhiere internamente a la CPE. El tamaño del soma de las células oscila entre las 25 y las 35 μm (Shipley y Ennis, 1996). Las CM son una de las poblaciones neuronales más importantes ya que participan en la transmisión y procesamiento de la información olfatoria proveniente de la vía periférica hacia regiones centrales. El GLU, ASP, factor de liberación de la corticotrofina (CRF), el n-acetil-aspartil-glutamato (NAG) y la calretinina, una proteína de unión al calcio, son algunos de los NT conocidos que participan en la sinapsis del nervio olfatorio y las CM (Shipley *et al.*, 1995, Chen y Shepherd, 1997). Figura 8 y 12.

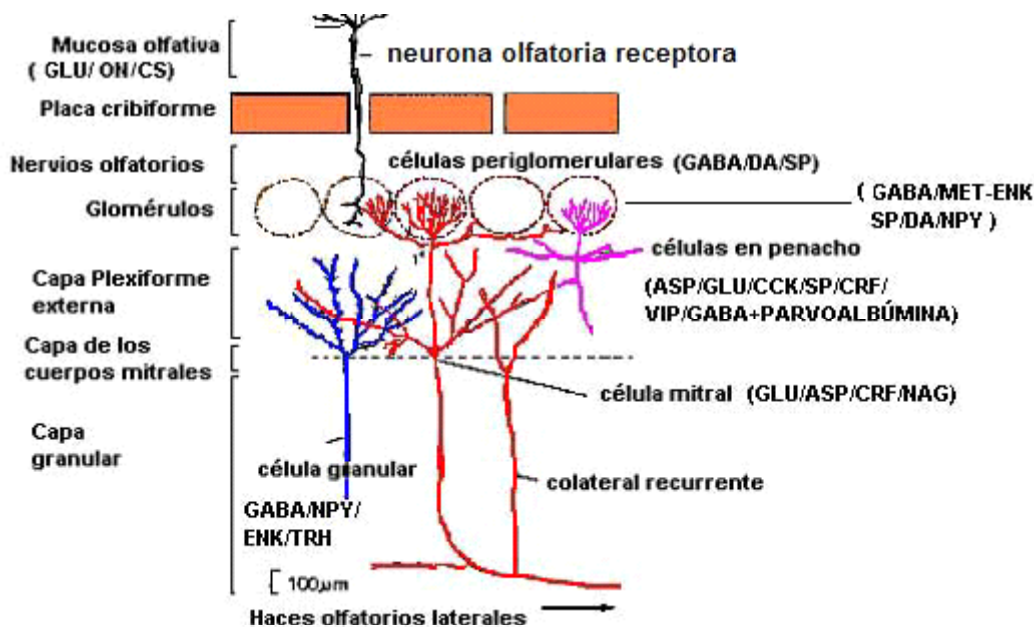


Figura 12. Esquema de la organización de los tipos celulares del BO. Las neuronas olfatorias receptoras hacen contacto con las dendritas de las células mitrales y las células en penacho formando así los glomérulos olfatorios. La estructura de las células mitrales está ricamente arborizada con dendritas primarias, secundarias y axones colaterales recurrentes. Las células periglomerulares y las células granulares son interneuronas inhibitorias. Las primeras limitan los GOs. El BO se divide de acuerdo con la distribución de estos elementos. Esta figura representa algunas de las capas más representativas presentes en el BO (Adaptado de Shepherd, 1972). El significado de las abreviaturas de los NTs relacionados con la función de las células del BO se menciona en el texto. La participación del óxido nítrico (ON) se muestra en el apartado de las NORs. Figura modificada de Shepherd, 1972; Shipley *et al.*, 1995 y Chen y Shepherd, 1997.

4. Capa plexiforme interna (CPI). Está compuesta de axones de las CM y CP, dendritas de la CG que participan como interneuronas inhibitorias de las CM y CP. Esta capa es la que ocupa una menor área en el BO. También están presentes las células de Blanes (16-23 μm) y las células horizontales de Cajal, así como algunos axones que se originan del núcleo del rafe que producen serotonina (5-HT), del locus coeruleus (NA) y del núcleo de la banda diagonal (ACh). Hay además células que contienen colecistoquinina (CCK). Figura 8 y 12.

5. Capa de las células granulares (CCG). Como su nombre lo indica la presencia de este tipo celular es preponderante, cuyas dimensiones oscilan entre las 8 y las 10 μm . Se observan, además células de Blanes y células de Golgi (12-22 μm); las CG y Pg son interneuronas inhibitorias capaces de modular la actividad de las CM y CP. Las CG carecen de axones y sus dendritas basales se ramifican en esta capa, se activan por NT inhibitorios tales como el GABA, la metionina-encefalina (MET-ENK), el neuropéptido Y (NPY), la somatostatina, la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y la calretinina. La actividad de las CPg está mediada por GABA, DA y SP (Shepherd, 1972; Shipley *et al.*, 1995; Chen y Shepherd, 1997). Las dendritas de las CM y CP hacen sinapsis con las dendritas de las CG, las cuales corresponden inhibitoriamente con las dendritas de esos tipos celulares. La mayoría de las CG contienen GABA, el cual es un NT inhibitor de las CM y en penacho (Shipley y Ennis, 1996). Figura 8 y 12.

E. Codificación olfatoria

En cuanto al procesamiento de la señal odorífera a nivel de las NORs en el epitelio olfatorio, se sabe que las células individualmente son sensibles a un subconjunto de estímulos, y dependiendo del tipo de receptores expresados poseen una selectividad hacia estímulos químicos particulares. Las NORs exhiben diferentes umbrales a un odorante en particular y pueden activarse o no en función de la concentración pudiendo estimular otras neuronas, de ahí que la concentración del odorante sea relevante en la activación de cierto número de GOs.

Como en otros sistemas sensoriales, el arreglo topográfico de las NORs que expresan diferentes receptores a moléculas se conoce como *codificación espacial*, aunque en este sistema aún no está bien definido, como en el caso del sistema visual. La codificación de la información olfatoria involucra variables temporales y espaciales que son importantes en la codificación de la información sensorial (Lledó *et al.*, 2005). La acción de olfatear, por otro lado es un evento periódico que produce trenes de potenciales de acción y actividad sincrónica en poblaciones neuronales combinadas temporalmente, capaces de conformar una *codificación temporal* (Purves *et al.*, 2004)

En cuanto a la función del sistema olfatorio y con base en la anatomía del nervio olfatorio se han sugerido dos modelos de codificación olfatoria en los cuales participan los GOs como las unidades funcionales del sistema olfatorio según Le Gros (En Shipley y Ennis, 1996).

El primero propone que cada glomérulo recibe fibras específicas con información de algún odorante con una “cualidad” particular. La implicación y contraposición a este modelo es que el volumen del BO requerido para representar todos los “olores” debería ser proporcional al número de los diferentes tipos de receptores olfatorios presentes en el epitelio olfatorio lo cual implicaría que el BO tendría que representar un volumen de superficie muy grande para poder representar todos los posibles olores. Este modelo como parte la hipótesis de la correspondencia de un receptor a una neurona todavía sigue en discusión sin que hasta el momento existan pruebas contundentes al respecto (Mombaerts, 2004).

El segundo modelo propone que cada glomérulo recibe información de diferentes tipos de receptores. La distribución aleatoria de las fibras individuales podría resultar en una amplia variedad de tipos de fibras dentro del glomérulo de modo que cada glomérulo codifica varios odorantes posibles. En este caso sólo una pequeña proporción del BO podría ser capaz de representar a una gran variedad de moléculas odorantes.

Recientemente el modelo que se acepta es que los odorantes, generalmente activan un conjunto de diferentes tipos de receptores, produciéndose un patrón organizado de activación de los glomérulos distribuidos a lo largo de la superficie del BO, de tal modo

que los diferentes odorantes activan diferentes combinaciones de glomérulos y la identidad de cada código odorante posee un componente combinatorial crítico. Estos patrones de actividad dependen de la identidad de los glomérulos activos considerados en una función temporal. Este mapa “odorífico” dinámico pudiera ajustarse con interacciones sinápticas dentro del glomérulo entre las neuronas que lo componen y los glomérulos adyacentes, o entre las neuronas y las capas subglomerulares una vez que la información olfatoria aferente es transferida a neuronas de orden superior, por ejemplo, durante el aprendizaje. Como resultado, tanto la distribución espacial y la estructura temporal de la actividad neuronal dan lugar a estudios prospectivos como una entidad del procesamiento del mismo código (Lledó *et al.*, 2005).

F. Vía olfatoria.

La información olfatoria llega por dos vías descritas hasta ahora, una proveniente del sistema olfatorio principal y otra del sistema olfatorio accesorio, éste último sistema ha sido asociado más a la codificación de feromonas, aunque existe cada vez más evidencia anatómica y funcional que sugiere que ambos se encuentran altamente relacionados (Meredith, 2001). Estudios de resonancia magnética funcional en ratón muestran que tanto el sistema olfatorio accesorio como el principal pueden responder a compuestos volátiles aunque con diferente selectividad, lo cual sugiere una mayor integración de ambas vías olfatorias respecto a lo que convencionalmente se ha considerado (Xu *et al.*, 2005). Figura 13.

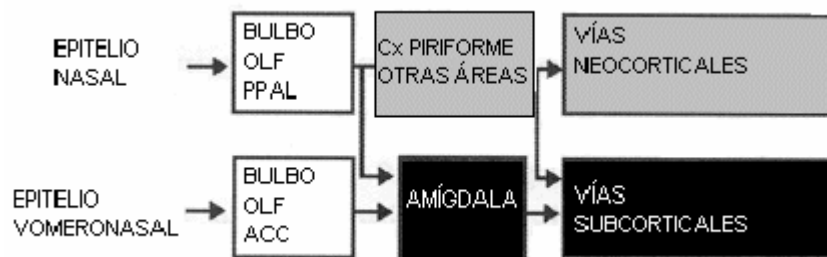


Figura 13. Vía resumida que muestra la entrada del estímulo olfatorio en el sistema olfatorio principal y accesorio. En el epitelio olfatorio la señal es detectada y enviada al BO, proyectándose la señal a la corteza piriforme, complejo amigdalóide y corteza entorrinal para posteriormente pasar a vías neocorticales. Modificado de Christensen y White, 2000.

El procesamiento de la señal olfatoria abarca varios niveles. El primario involucra la mucosa olfatoria y el BO. En el procesamiento primario la entrada de la señal olfatoria se

lleva a cabo a partir de la recepción de las moléculas olorosas en los receptores de la mucosa olfatoria. Los axones primarios hacen sinapsis con las prolongaciones dendríticas de las CM y las CP formando así los GOs los cuales son las principales aferentes del BO. Los axones de estas neuronas se proyectan hacia el nervio olfatorio y de ahí pasan a formar parte de la comisura anterior para enviar la información al BO contralateral. Figura 14 y 15.

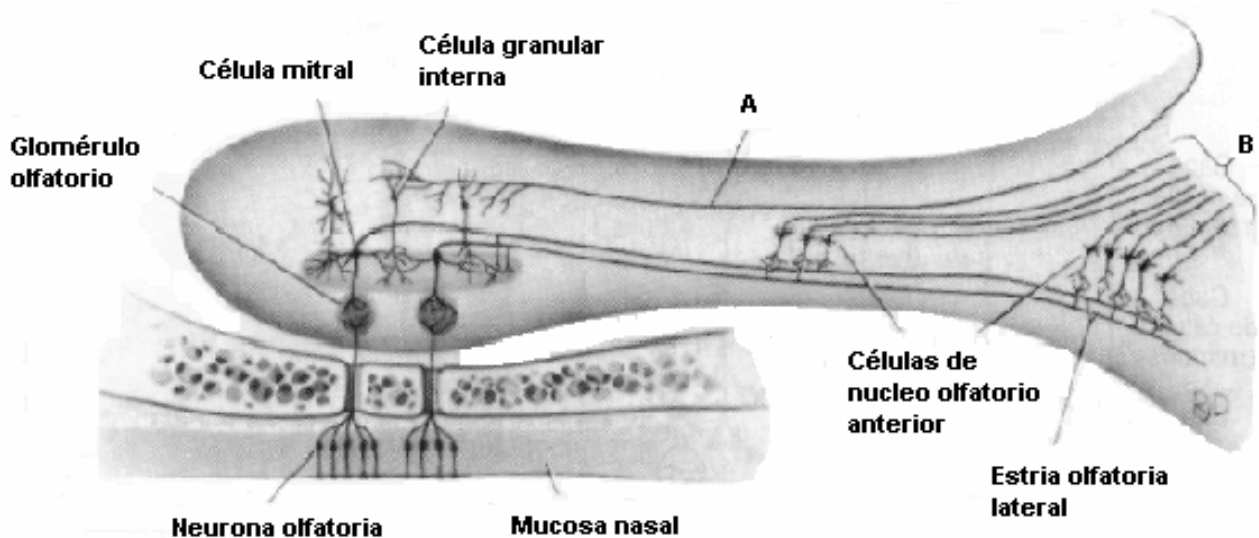


Figura 14. Bulbo y cintillas olfatorias que muestran las relaciones de las neuronas olfatorias primarias y los receptores de la mucosa nasal. Las células del núcleo olfatorio anterior forman grupos dispersos caudales del BO. A, fibras del núcleo olfatorio anterior de proyección periférica. B, fibras del núcleo olfatorio anterior de proyección central. (Modificado de Cajal, 1911 en Carpenter, 1991).

El circuito conecta al BO y al núcleo olfatorio anterior con sus homólogos contralaterales. Las CM reciben impulsos y son transmitidos a través de sus axones a la capa fibrilar, donde las sinapsis producidas se establecen con las dendritas apicales de las células del núcleo olfatorio anterior cuyos axones cruzan al hemisferio opuesto, vía la comisura anterior, pars bulbaris, entran al núcleo olfatorio anterior contralateral y hacen sinapsis, también con las CG del BO contralateral. Figura 15.

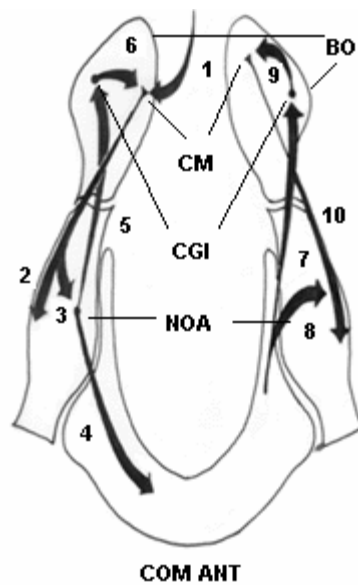


Figura 15. Esquema de conexiones intrabulbares. Las células mitrales envían los impulsos olfatorios (1) al núcleo olfatorio anterior homolateral, NOA (2, 3). De ahí los impulsos son transmitidos a las células granulares internas (CGI) (5) provenientes del BO izquierdo (4, 7) a las CGI en el BO derecho contralateral. Las CGI, en el BO izquierdo cierran este circuito (6) el cual es dirigido hacia las células mitrales (CM) del BO contralateral derecho (9). Modificado de Valverde *et al.*, 1965.

El centro secundario del olfato o perceptual, codifica la información olfatoria relevante para la identificación perceptual del odorante o el olor propiamente dicho y ocupa una mayor parte de la circunvolución parahipocampal. La información relevada del área primaria a las áreas olfatorias secundarias de la corteza olfatoria y regiones subcorticales son provistas de conexiones centrífugas que regresan al bulbo olfatorio principal. De ahí, la señal se envía a la corteza piriforme, considerada como la principal región de discriminación olfatoria, para posteriormente relevar la información al núcleo cortical de la amígdala y el área entorrinal, la cual es proyectada al hipocampo. Figuras 16 y 17.

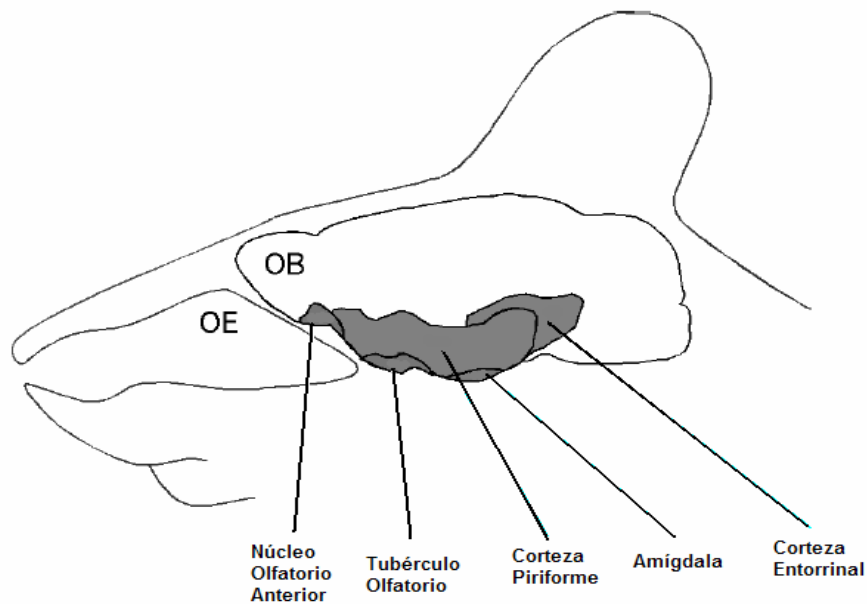


Figura 16. Vías de relevancia de la información olfatoria. El BO proyecta la información olfatoria al núcleo olfatorio anterior, tubérculo olfatorio, corteza piriforme, núcleo cortical de la amígdala y corteza entorrinal. Modificado de Buck, 2004.

Los centros nerviosos que participan en la percepción olfatoria incluyen un número de áreas corticales, tales como la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, el núcleo cortical de la amígdala, el núcleo olfatorio anterior, porciones del hipocampo, corteza entorrinal lateral y de la ínsula. El tubérculo olfatorio y la corteza piriforme proyectan a otras regiones corticales olfatorias y al núcleo medial dorsal del tálamo. Estas regiones, corticales y talámicas juntas están involucradas en la percepción consciente de los olores. El núcleo cortical de la amígdala y el área entorrinal son componentes del sistema límbico que participan en el procesamiento afectivo de los olores (Dodd y Castellucci, 1991). Figuras 13 y 16.

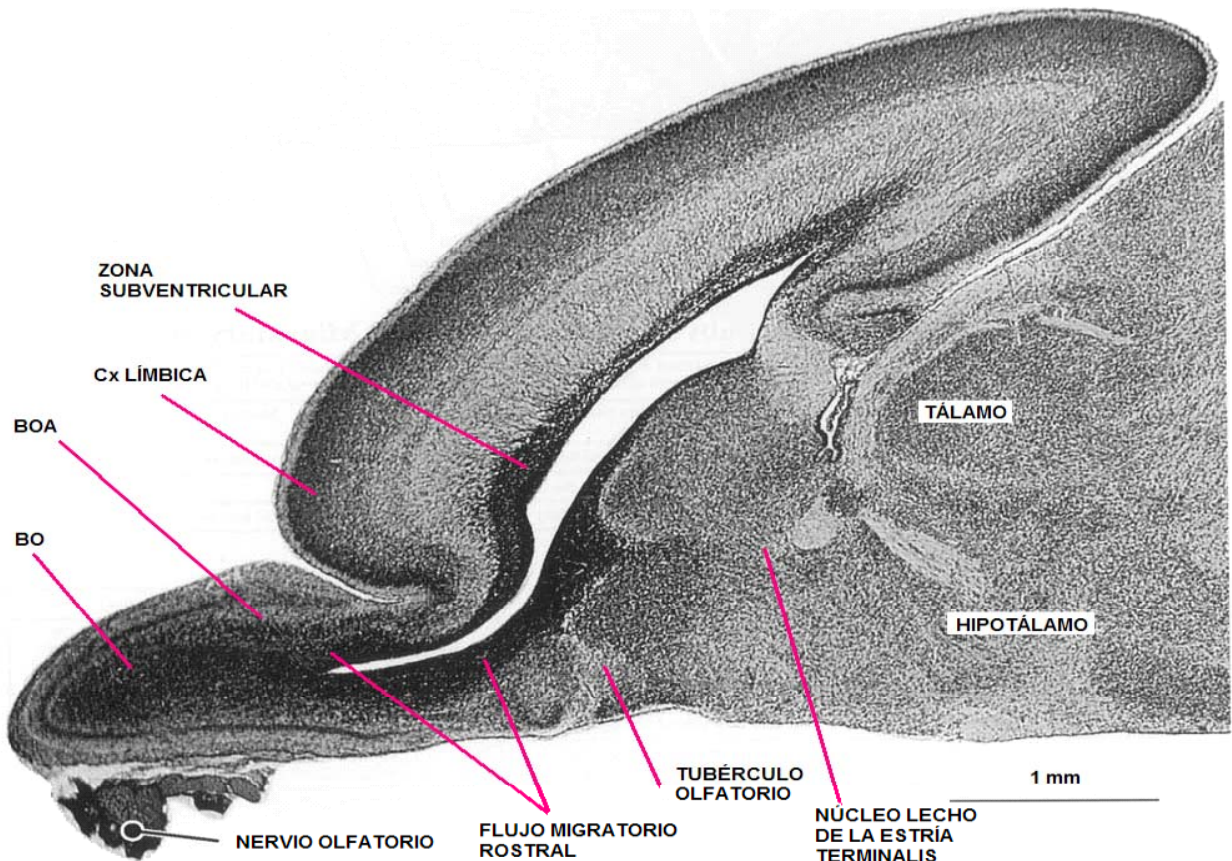


Figura 17. Regiones del sistema olfatorio en el cerebro de rata. Bulbo olfatorio (BO), bulbo olfatorio accesorio (BOA), corteza límbica (Cx límbica), tubérculo olfatorio, núcleo lecho de la estría terminalis, tálamo. Modificado de Bayer y Altman en Paxinos, 2004.

G. Desarrollo funcional del sistema olfatorio

Con relación a la ontogenia funcional, Salas y colaboradores (1969) valoraron la actividad eléctrica del BO en la rata neonatal (4 a 12 días) comparándola con la actividad de la corteza visual, al demostrar un cambio en la frecuencia de disparo promedio de ambas cortezas. Asimismo, se observó que la actividad incrementó en paralelo, aunque la actividad del BO se mantuvo por encima de la obtenida en la corteza visual. La actividad eléctrica del BO semejante a la del estado adulto se observó hasta los 24 días posnatales, aunque se obtuvo un incremento de la actividad a partir del día 12 posnatal. Las diferencias en la frecuencia promedio entre el BO y la corteza visual en un periodo de 12 a 30 días llegó a oscilar de 4 a 12 ciclos por segundo lo cual indicó que los intervalos de frecuencia en el BO son más rápidos que en la corteza visual. Se sabe que mientras el BO es eléctricamente quiescente en la primera semana posnatal, es capaz de tener un cierto grado de función olfatoria, cuyo desempeño para discriminar más finamente mejora con el

desarrollo. Este es un aspecto de interés, dado que anatómicamente algunos de sus componentes no están plenamente maduros. Asimismo hay evidencia conductual acerca de la función olfatoria en edades tempranas antes de que el bulbo haya madurado anatómicamente. Estudios con marcaje de la proteína de expresión temprana, c-Fos, muestran activación neuronal en la capa glomerular desde el nacimiento cuyo patrón de actividad permanece sin cambio hasta las primeras 3 semanas de vida de la rata (Guthrie y Gall, 2003). Se ha encontrado un correlato funcional con el morfológico en la actividad eléctrica medida en función del tiempo de disparo en el electro-olfatograma, llegándose a encontrar que en la rata coincide con la primera expresión de la proteína marcadora olfatoria (PMO) en las NORs, proteína que actúa como indicador de la madurez de estas neuronas (Allen y Akesson, 1985).

En el humano y en la rata existe evidencia de que el sistema olfatorio conjuntamente con el sentido del gusto, es funcional *in utero*. Una característica de los animales altriciales macrosmáticos como lo son los roedores, es la aguda capacidad olfatoria a señales odoríficas relevantes en la edad temprana, asociadas a la dieta y los olores con los cuales está familiarizada la hembra. Esto le permite a la cría localizar y succionar los pezones de la madre, inmediatamente después del nacimiento aunque no se encuentre madura visual y auditivamente (Smotherman, 1982; Pedersen *et al.*, 1983; Schaal *et al.*, 1998; Winberg y Porter, 1998; Guthrie y Gall, 2003).

H. Conductas guiadas olfatoriamente

El sistema olfatorio en mamíferos como se ha reiterado, constituye un sentido indispensable para la supervivencia, principalmente durante la etapa de lactancia, de ahí que la conducta que la cría y la madre desempeñan durante esta etapa determina en parte el éxito de la supervivencia. La conducta con sus componentes heredados y aprendidos poseen una complejidad superpuesta a estos componentes tales como el aprendizaje derivado de la experiencia y la motivación. A continuación se mencionan algunas características de estos aspectos relacionados con la capacidad olfatoria.

Percepción

La percepción de un objeto es un fenómeno básico de los sistemas sensoriales que puede ser manejado por sistemas de “cableado” innato que ha evolucionado para reconocer estímulos altamente específicos o puede ser manejado por la experiencia con base en la memoria. Esta última forma de manejar el estímulo puede incluir tendencias innatas para discernir algún tipo de objeto respecto a otro, aunque en general, este tipo de percepción basada en la memoria puede aumentar significativamente la amplitud y la flexibilidad de las habilidades perceptuales. La percepción del objeto frecuentemente es multimodal y sintética lo cual ha llegado a ser considerada como una ventaja adaptativa para el procesamiento del estímulo, pudiendo proveer una rápida identificación y reconocimiento del objeto y su discriminación de objetos similares al suprimir la percepción de las características de los componentes. Esta percepción sintética de los componentes aumenta la identificación de los objetos familiares de los estímulos de fondo lo cual facilita una constancia perceptual como algo que no cambia a pesar de la entrada de otros estímulos espacio-temporales (Wilson y Stevenson, 2006).

Motivación

De la literatura se sabe que entre las variables motivacionales que afectan las reacciones hedónicas a los olores se encuentran aquellas relacionadas con el hambre y la saciedad, en respuesta a aromas relacionados con el alimento pero no así con aromas no relacionados con los mismos, así como aquellas relacionadas con la excitación sexual, en animales maduros, que pueden aumentar la aceptación de algunos olores corporales considerados como menos placenteros, como en el caso humano. Así algunos estudios han mostrado que algunos aromas relacionados con alimentos después de la alimentación, no resultan ser tan placenteros, lo cual podría estar mediado por la presencia de alimento en el intestino, en tanto que el olor de atractivo sexual se relaciona con la excitación que lleva a un cambio en la forma en que los olores son hedónicamente evaluados. En ambos casos se asume que los aspectos cualitativos de la sensación olfatoria permanecen sin cambio mientras que el componente hedónico se modifica (Wilson y Stevenson, 2006).

Experiencia

Por otra parte la experiencia es un factor de ajuste a la codificación olfatoria, pudiendo mejorarla o modificarla de modo que las características familiares sean más precisas o codificables. También se considera que la experiencia podría ajustar la codificación al olor a través de la síntesis de la concurrencia de las características de los objetos olorosos y posteriormente a la integración olfatoria permitiendo que la representación de estos olores sea más fácilmente discriminada de otros patrones de olor similares. La percepción sintética de los objetos pudiera construirse además de las características volátiles submoleculares y moleculares múltiples de componentes multimodales o ser influenciados por interacciones intermodales (Wilson y Stevenson, 2006).

III. Efecto de la malnutrición/desnutrición y otros factores epigenéticos en el sistema olfatorio

El modelo de malnutrición por deficiencia de caseína (8%) en la dieta produce alteraciones morfológicas en el desarrollo del BO de la rata tales como una menor tasa de migración, decremento transitorio en el volumen de la capa y reducción del número de dendritas de las células granulares (Almli et al., 1985). Del mismo modo una modificación en el número de CGs puede ser derivado de la malnutrición debido a alteraciones en la tasa de muerte celular, proliferación, migración y maduración, los cuales son factores que participan en el mantenimiento del número de las células granulares (Kaplan *et al.*, 1985; Tolley y Bedi, 1994). La desnutrición por incremento de la camada y malnutrición adicional de la madre (8% caseína) llega a incrementar la actividad de las CM, lo cual probablemente pudiera deberse a una disminución en la capacidad de inhibición de las CG. Estas alteraciones debidas a la desnutrición podrían modificar los niveles de NTs y la capacidad de respuesta en las células inhibitorias, que le pudiera causar cambios paralelos en la actividad sináptica y en las respuestas de estimulación (Math y Davrainville, 1980). Electrofisiológicamente se ha observado que la desnutrición modifica la maduración funcional de las CM al incrementar la actividad fásica tras la estimulación y reducir la inhibición post-sináptica, lo cual sugiere que la participación inhibitoria de las CG probablemente se ve disminuída (Math y Davrainville, 1980). El empleo de un paradigma

experimental por oclusión de la nariz y desnutrición muestra la reducción de la presencia de vesículas sinápticas en las células del BO (Torrero *et al.*, 2001).

Otros factores epigenéticos influyen sobre la morfología de las estructuras que conforman el BO, así por ejemplo, un cambio mecánico como la oclusión de nariz no modifica la morfometría de los GOs ni el número o diámetro, en tanto que un estímulo químico como la exposición al ozono en concomitancia con la desnutrición durante el desarrollo disminuye su número y talla (Meisami-Safari, 1981; Frías *et al.*, 2004). Finalmente en ratones knock-out del gen que codifica para la proteína formadora de canales de potasio Kv 1.3 se observa un aumento del número de los GOs con un correlato funcional en el incremento de la agudeza olfatoria (Fadool, 2004)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema olfatorio es importante porque le confiere al individuo la capacidad de sobrevivencia debido a que es un sistema sensorial a distancia que participa en la discriminación y selección del alimento, reconocimiento entre congéneres, afinidad reproductiva y la relación madre-cría en las especies altriciales como la rata.

Desde el punto de vista fisiológico y de desarrollo se añade el creciente interés de conocer los mecanismos que participan en el funcionamiento del sistema olfatorio a nivel periférico, de integración central y cognoscitivo, ya que su déficit funcional se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas y desnutrición, sin embargo, existe poca información respecto a los efectos de la desnutrición en la morfología celular y la organización funcional del sistema olfatorio.

El BO es una estructura que forma parte del sistema olfatorio es susceptible a la desnutrición como factor epigenético capaz de incidir en el desarrollo cerebral. Por ello y con base en los antecedentes observados en otras estructuras del SNC, se podría esperar que los componentes y agregados celulares que constituyen el BO se modificarán cuando aún no ha madurado posnatalmente (periodos críticos) mostrando efectos tales como una disminución del número de neuronas, retraso de la migración y una alteración de la organización estructural. Por ello en este trabajo es de interés evaluar las posibles

alteraciones producidas en el BO derivadas de la desnutrición posnatal de la rata en desarrollo, en los complejos celulares del BO, la organización laminar, los GOs, la unidad funcional del sistema olfatorio y las células mitrales, las cuales son neuronas de segundo orden y uno de los principales tipos celulares que lo constituyen.

HIPÓTESIS

Dado que la desnutrición neonatal altera gran parte de la organización estructural del SNC se plantean las siguientes hipótesis:

1. Si la desnutrición altera la organización de BO se podría esperar que el área de las capas del BO disminuya como se ha observado en las láminas de la corteza en otros trabajos.
2. Si los GOs en condiciones de nutrición adecuada muestran una densidad diferencial en el BO, entonces por efecto de la desnutrición pudieran retrasar su desarrollo en diferentes regiones del BO pudiendo desfasarse y mostrar un menor número y tamaño de GOs.
3. Si hay tipos celulares que se modifican en sus procesos dendríticos, entonces podría esperarse que las CM que conforman los GOs y el BO tengan una reducción del soma, de su complejidad y de su longitud dendrítica.
4. Si la reducción del peso es un efecto característico de la desnutrición entonces se podría esperar que estos animales muestren una reducción de al menos un 10% tanto en el cuerpo como en el cerebro y un retraso de la maduración de los canales auditivos y visuales, acorde con estudios previos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la desnutrición posnatal del BO a los 7, 14 y 21 días en la rata desnutrida posnatalmente por la ligadura de los conductos galactóforos de la madre.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la efectividad de la carencia nutricia en el desarrollo físico de los animales al comparar el peso corporal, el peso cerebral y la maduración de la apertura de los meatos auditivos externos y de los párpados.

Determinar el área de la región media del BO para evaluar el impacto de la desnutrición neonatal.

Evaluar el efecto de la carencia nutricia en la organización de las capas del BO al obtener un índice de relación proporcional entre el área del BO y el área de sus principales capas constitutivas: capa plexiforme externa, capa de las células mitrales y capa de las células granulares.

Conocer la influencia de la desnutrición neonatal en la organización de los GOs al obtener y comparar su número, parámetros de longitud mayor, área y perímetro en diferentes regiones del BO.

Determinar el impacto de la desnutrición neonatal en las CM al comparar los parámetros del área y perímetro del soma, así como la complejidad de los órdenes dendríticos y longitud dendrítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Animales

En este estudio se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) del bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro. Los experimentos se realizaron bajo las normas del Comité de Bioética del mismo Instituto de acuerdo con los *Lineamientos para el Cuidado y Uso de Mamíferos en Neurociencia e Investigación Conductual* (National Research Council, 2003). Las edades estudiadas fueron 7, 14 y 21 días. Las crías utilizadas para el estudio se obtuvieron de hembras de tres meses de edad (250-300g) una vez que parieron.

En el primer día de edad posnatal las camadas se mezclaron y se ajustaron a 8 crías, de las cuales cuatro fueron hembras y cuatro machos que fueron utilizados para el presente estudio. Se seleccionaron 8 machos de cada una de las tres edades y se separaron en dos condiciones: control, C (n = 24) y desnutrido, D (n = 24) para la técnica de Nissl y el mismo número de animales para la técnica de Golgi-Cox. Véase Cuadro 2.

A. Evaluación del desarrollo físico

Con el propósito de evaluar el desarrollo físico, los animales se pesaron y midieron a los 7, 14 y 21 días de edad, esto es, el día del sacrificio. El número de la muestra para la los datos del peso corporal y cerebral fue de n=8, para cada edad, en dos condiciones nutricias, con una N = 24 para cada grupo. Con el fin de establecer la relación alométrica entre el peso corporal y el peso cerebral se obtuvo el valor de la diferencia entre el peso cerebral y el peso corporal, comparándose con una t de student.

$$\text{RELACIÓN ALOMÉTRICA} = \frac{\text{PESO CEREBRAL}}{\text{PESO CORPORAL}}$$

Se evaluaron, además, la apertura palpebral y de los meatos auditivos externos a partir del día 8 al 16 posnatal en ambos grupos, en una muestra de n = 11 para el grupo C y para el grupo D, respectivamente. Para ello se asignaron escalas de medición nominal de acuerdo con la siguiente escala. Cuadro 1.

Cuadro 1. Escala de valores relativos empleada para evaluar la apertura de meatos auditivos y párpados.

0	Párpados o meatos auditivos externos completamente cerrados
1	Un tercio de los párpados o meatos abiertos
2	Mitad de la estructura abierta
3	Estructura completamente abierta

II. Alimentación

La nutrición de las madres fue de una dieta balanceada administrada *ad libitum* (Lab Science®) con un contenido de proteína del 21%, también con libre acceso al agua. El grupo de las crías control (C) permaneció 12 h con la madre y 12 h con una madre nodriza lactante que fue una hembra que parió el mismo día que la madre o con un día de

diferencia. Las crías del grupo control tuvieron acceso a la leche de ambas hembras las 24 h del día. A una hembra madre se le realizó una cirugía simulada sin ligársele los conductos galactóforos. El grupo de los crías desnutridas (D) permaneció con su propia madre durante 12 h, la cual fue sometida a la ligadura de los doce conductos galactóforos, posteriormente esta hembra fue intercambiada por una hembra nodriza también lactante durante las 12 h restantes del día la cual les proporcionó la alimentación durante 12h ya fuera durante el día o la noche según fuera la alternancia. Este procedimiento de alternancia de las hembras se realizó diariamente del día 1 al 21 de edad o hasta el día que la cría fuera sacrificada para su estudio. La ligadura de la madre se realizó a una de un par de hembras que parieron el mismo día o máximo con 1 día de diferencia. La cirugía se realizó bajo anestesia general en el día 2 posnatal de las crías, ligando los conductos galactóforos con hilo quirúrgico subcutáneo permitiendo la succión de las crías después de su recuperación. La desnutrición por ligadura de los conductos galactóforos e intercambio de las hembras se realizó con el fin de evitar la carencia de estímulos sensoriales provenientes de la hembra (Salas *et al.*, 1984).

Cuadro 2. Distribución del número de animales de acuerdo a la condición nutricia, edad y tratamiento histológico.

Grupo Control (C) N = 48	Grupo Desnutrido (D) N = 48
n = 24 cerebros de machos para la técnica de Nissl distribuidos en tres edades	n=24 cerebros de machos para la técnica de Nissl distribuidos en tres edades
7 días n = 8	7 días n = 8
14 días n = 8	14 días n = 8
21 días n = 8	21 días n = 8
n=24 cerebros de machos para la técnica de Golgi-Cox distribuidos en tres edades	n=24 cerebros de machos procesados para la técnica de Golgi-Cox distribuidos en tres edades
7 días n = 8	7 días n = 8
14 días n = 8	14 días n = 8
21 días n = 8	21 días n = 8

III. Condiciones de mantenimiento

Los animales se mantuvieron en condiciones controladas con un ciclo de luz/oscuridad 12:12, (luz 8:00 am) y una temperatura controlada de 25°C ± 1°C.

IV. Histología

Con el propósito de evaluar la morfología de las células del BO se utilizaron las técnicas de Nissl y de Golgi-Cox¹. Para ello se eligieron los cortes con células completas y mejor impregnadas. Los cortes fueron seriados. Los tejidos tratados con la tinción de Nissl o violeta de cresilo provinieron de animales sacrificados a los 7, 14 y 21 días de edad (n = 8 para cada edad). La n fue de 24 para cada grupo como se aprecia en el Cuadro 2. Los animales se anestesiaron con éter y se perfundieron por la vía del ventrículo izquierdo del corazón con solución salina y paraformaldehído al 4%, 0.1M (JT Baker ®), Los animales fueron decapitados y se les removió el cerebro y pesó. Los cerebros se colocaron por separado y se mantuvieron en paraformaldehído de la misma concentración durante 1 semana. Posteriormente el BO se cortó en secciones coronales de 30 μ m seriadamente.

La técnica de Golgi-Cox es una técnica por impregnación de sales que permite observar el soma neuronal, el axón y el árbol dendrítico (Ramón-Moliner, 1970). Esta técnica se realizó en animales de 7, 14 y 21 días de edad, con una n = 8 para cada edad, N = 24 para el grupo C y N = 24 para el grupo D. Los animales fueron anestesiados con éter (JT Baker®) y posteriormente fueron decapitados. Los cerebros se removieron inmediatamente, se pesaron y se cortaron en bloques transversales para su mejor impregnación, quedando inmersos en la solución de Golgi-Cox. Cinco semanas después, los bloques fueron deshidratados y embebidos en proceloidina diluída al 35% con isopropil (Fluka). Posteriormente, se cortaron en secciones transversales de 120-140 μ m.

La medición del área del BO completo, las capas del BO y los GOs, esto es el tejido teñido con Nissl se obtuvo por medio de un microscopio Nikon Eclipse E-600 de contraste de fases y fluorescencia (Scanalytics de iMac) y un sistema de análisis de imágenes (IP Lab v3.6) de Macintosh. La amplificación al microscopio se hizo con un objetivo de 4X para el BO y las capas, mientras que para la evaluación de los GOs se utilizó un aumento de 10X. La medición de los parámetros de las CM se realizó con un microscopio de luz y fluorescencia *Leica Diastar, modelo 420*. Ambos microscopios se calibraron con una reglilla Leica de 1mm. La amplificación de las CM fue de 40x

A. Morfometría del BO y sus capas

El área del BO se obtuvo de la región media del BO la cual fue elegida porque mostró los componentes indispensables de las variables a medir como las capas características del BO y los GOs. Los cortes elegidos fueron aquellos mejor teñidos y conservados de la porción media del BO, a una distancia entre las $1450 \pm 150 \mu\text{m}$ de la porción rostral a distal del BO. Con este mismo material teñido con la técnica de Nissl se evaluó el área de las tres capas celulares del BO: 1) capa plexiforme externa, CPE, 2) capa de las células mitrales, CCM y capa de las células granulares, CCG. El número de BO evaluados fue de 8. Posteriormente se obtuvo el índice de relación entre el área del BO y el área respectiva de cada capa. El índice se obtuvo asignando el valor de 100% al área total del BO, el cual se multiplicó por el valor del área de la capa a evaluar (fuera esta CPE, CCM o CCG), cuyo resultado se dividió entre el valor del área del BO. El índice fue producto de una regla de tres, v. gr.

$$\frac{\text{ÁREA CPE, CCM O CCG} \times 100}{\text{ÁREA DEL BO}}$$

B. Morfometría de los GOs

Se obtuvo el número, perímetro, área y longitud mayor de los glomérulos por cuadrantes o regiones: región dorsal medial (DM), región dorsal lateral (DL), región ventral medial (VM) y región ventral lateral (VL). El número se evaluó en el corte completo y el área, perímetro y longitud se evaluó en tres GOs de cada cuadrante, independientemente de su tamaño como se muestra en la Figura 18. El interés de evaluar los GOs por regiones en el BO se realizó con el fin de encontrar alguna posible diferencia debido al desarrollo diferencial de glomérulos por zonas como lo muestran estudios anatómicos y funcionales previos (Royet *et al.*, 1988; Bailey *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 2000). La cuantificación del número de GOs, se realizó en 8 BO. Para la evaluación del área, perímetro y longitud mayor, el número de glomérulos evaluados para cada grupo fue de $n = 96$ en 8 BO y cuatro regiones de cada uno, como se indica en el Cuadro 3.

¹ El método de las técnicas se describen en el apéndice del escrito.

Cuadro 3. Número de glomérulos evaluados de acuerdo con la condición nutricia durante el desarrollo (edad). DM = región dorsal medial, DL = región dorsal lateral. VM = región ventral medial, VL = región ventral lateral. Se evaluaron 96 GOs para cada región.

GRUPO	EDAD	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS
		DM-DL-VM-VL	DM-DL-VM-VL	DM-DL-VM-VL
Control		3 GOs x 4 regiones =12	3 GOs x 4 regiones =12	3 GOs x 4 regiones =12
		12 GOs x 8 BO= 96 GOs	12 GOs x 8 BO= 96 GOs	12 GOs x 8 BO= 96 GOs
Desnutrido		3 GOs x 4 regiones =12	3 GOs x 4 regiones =12	3 GOs x 4 regiones =12
		12 GOs x 8 BO= 96 GOs	12 GOs x 8 BO= 96 GOs	12 GOs x 8 BO= 96 GOs

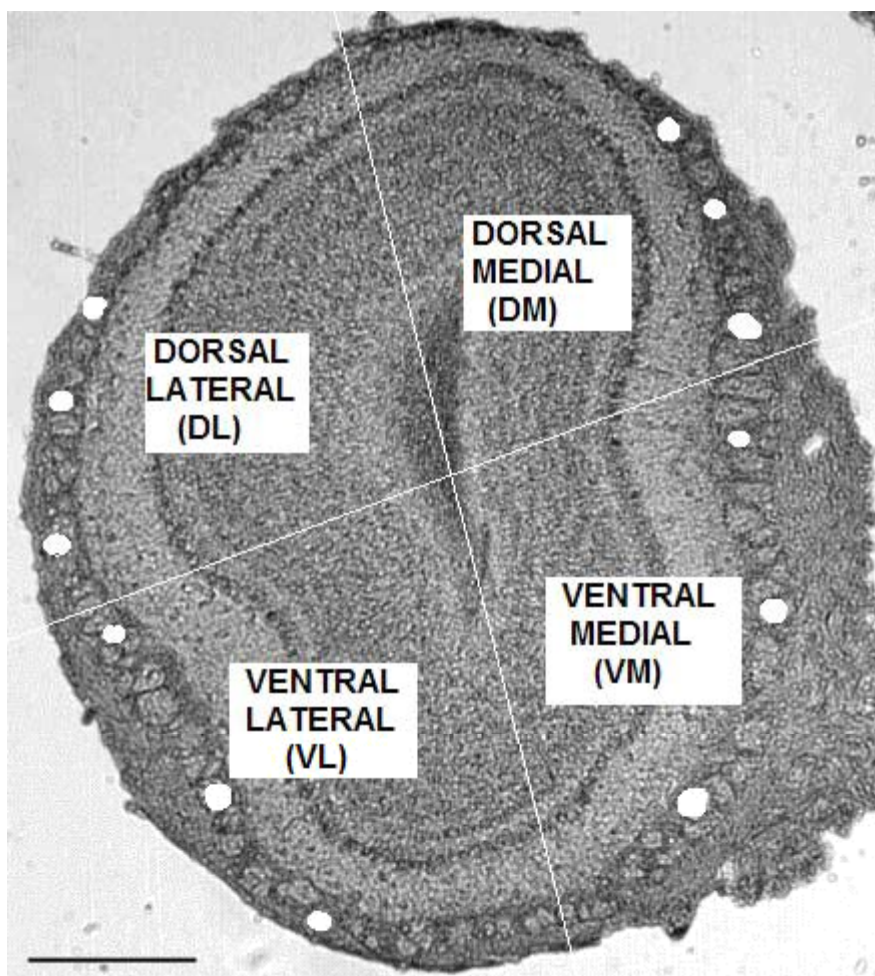


Figura 18. Regionalización del BO en cuadrantes: Dorsal Medial (DM), Dorsal Lateral (DL), Ventral Medial (VM) y Ventral Lateral (VL). Se muestra uno de los bulbos olfatorios de una rata control de 14 días de edad. Los círculos abiertos representan la ubicación de los glomérulos olfatorios que se eligieron para su evaluación y el número de GOs evaluados, tres para cada cuadrante por laminilla observada. El aumento es de 4X. La barra de calibración indica 1 mm.

C. Morfología de las CM

La evaluación de los parámetros morfométricos de las CM se efectuaron en cerebros tratados con la técnica de Golgi-Cox. Los parámetros que se evaluaron fueron el área, longitud mayor del soma, complejidad del orden dendrítico y la longitud de las prolongaciones dendríticas por el método de Sholl (1953). Estos dos últimos parámetros se obtuvieron con ayuda de un analizador de imágenes (Perception Analysis System por Interfase Humano-Computadora, Cambridge, Reino Unido), en donde se ubicó el soma de la célula al centro de los círculos concéntricos, los cuales poseen una separación equidistante de 40 μm . La amplificación al microscopio se hizo con un objetivo de 40X. La Figura 19 muestra un esquema de una célula en donde los números ordinales indican el orden dendrítico o complejidad de ramificación dendrítica (1o, 2o, 3o, 4o y 5o), siendo mayor la complejidad en relación al número, así el primer orden fue el más cercano al soma y aumentó conforme se alejó del mismo. La longitud dendrítica se obtuvo al contar las intersecciones de las dendritas con los círculos, a cada círculo le correspondió un valor de cierta longitud, esto es: a) 40 μm , b) 80 μm , c) 120 μm , d) 160, e) 200 μm , f) 240 μm y g) 320 μm .

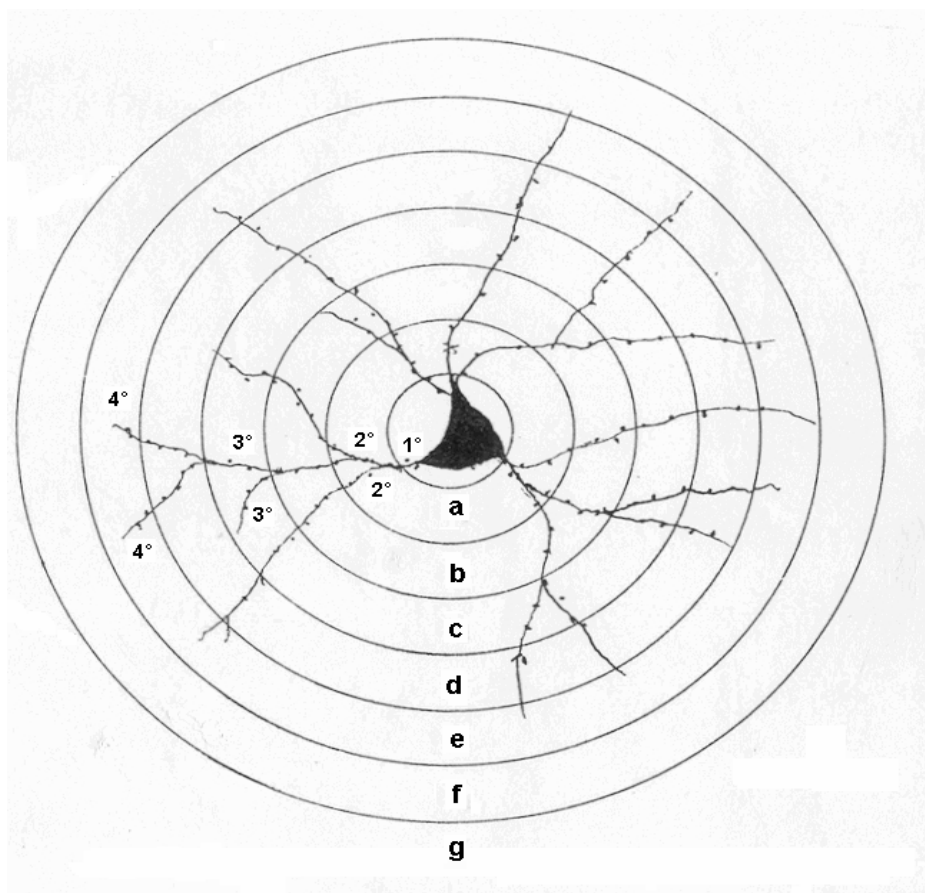


Figura 19. Esquema de una neurona que muestra el método de Sholl para evaluar los órdenes dendríticos o complejidad de las ramas y su longitud.

En el Cuadro 4 se muestra la distribución del número de CM para cada edad y grupo.

Cuadro 4. Número de células mitrales evaluadas en el BO.

EDAD	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS
GRUPO	Células mitrales	Células mitrales	Células mitrales
Control	n = 20	n = 20	n = 20
Desnutrido	n = 20	n = 20	n = 20

Inicialmente se tenía contemplado evaluar los parámetros morfométricos de las células en penacho y de las células granulares. Las CP no se evaluaron debido a que se observó un número muy reducido de las células teñidas por la técnica de Golgi-Cox ya que esta técnica tiñe alrededor de un 4% del total de células, lo cual impide obtener una muestra significativa, aunque la ventaja es que muestra células con gran densidad. En lo que se refiere a las células granulares teñidas por esta técnica, no se evaluaron debido a

que en esta etapa del desarrollo mostraron una apariencia alargada aún indefinida probablemente debido a su relativa inmadurez a los 7 y 14 días posnatales y los artefactos de la técnica.

D. Pruebas conductuales de discriminación olfatoria

Con el propósito de complementar los resultados presentados se realizaron pruebas conductuales. Las cuales se efectuaron en grupos independientes, con una $n= 8$ para cada edad en cada grupo.

Con el fin de valorar el desempeño olfatorio de los animales sometidos a desnutrición se realizó una prueba de discriminación a un olor relevante como lo es el aserrín del nido de la madre. La prueba se llevó a cabo a los 7, 14 y 21 días de edad en animales de ambos sexos de cada uno de los grupos experimentales. El dispositivo de prueba fue una caja de madera con las siguientes dimensiones: 35.7 largo x 26.3 ancho y 7cm de profundidad forrada de plástico en las paredes internas, a la cual se le colocó aserrín proveniente del nido materno reciente en un lado y aserrín limpio en el otro, ambos lados contaron con una cantidad aproximada de (15g) sobre un área de 15 x 15cm que ocupó el lado derecho e izquierdo de la caja, respectivamente. Durante la exposición olfatoria de cada sujeto, se cambió el orden aleatoriamente. Los montones de aserrín contrapuestos entre sí estuvieron separados por una pared de cartoncillo de 1cm de grosor, con una longitud de 14.5cm y una altura de 7cm. La distancia de separación entre los dos tipos de aserrín fue de aproximadamente 10 cm. Sobre la caja conteniendo el aserrín, se colocó una malla de plástico extendida sobre cuya superficie pudieron deambular las crías con el fin de que pudieran oler el aserrín sin tener acceso directo al mismo. La prueba se realizó de manera individual para cada animal: la cría fue colocada en un área intermedia neutra bajo la cual no había aserrín, en posición contraria a la ubicación del mismo (Figura 20). Las variables a evaluar fueron latencia de aproximación al aserrín proveniente del nido de la madre, duración de permanencia sobre este aserrín y sobre el aserrín limpio, así como frecuencia de orientación hacia ambos tipos de aserrín. El aserrín del nido de la madre siempre fue fresco del día de la prueba y se tomó de la caja a la cual pertenecía la cría. Después de que cada cría desempeñó la prueba, se

limpió la superficie de la malla con el fin de eliminar el olor de la misma con agua y alcohol 50%/50%. La prueba se filmó durante 5 min.

Se consideró como la **latencia de aproximación al aserrín del nido de la madre** al tiempo que le tomó a la cría desplazarse de la zona neutra hasta el lugar por encima del aserrín con el olor del nido de la madre.

La **duración sobre el aserrín del nido de la madre** fue considerada como el tiempo transcurrido en que la cría ubicó las extremidades anteriores, la cabeza, o el cuerpo completo sobre la malla por encima del aserrín del nido de la madre y permaneció sobre él. Se sumaron las duraciones de los distintos episodios de permanencia.

La **duración sobre el aserrín limpio** se obtuvo del tiempo transcurrido sobre este aserrín. Los criterios fueron los mismos que para la permanencia de la cría sobre el aserrín del nido de la madre.

Frecuencia de orientación. Se refiere al número de veces que la cría adoptó una posición frontal hacia el aserrín elegido, ya fuera el aserrín limpio o el aserrín del nido de la madre, a una distancia aproximada de 2 cm al aserrín en el plano horizontal.

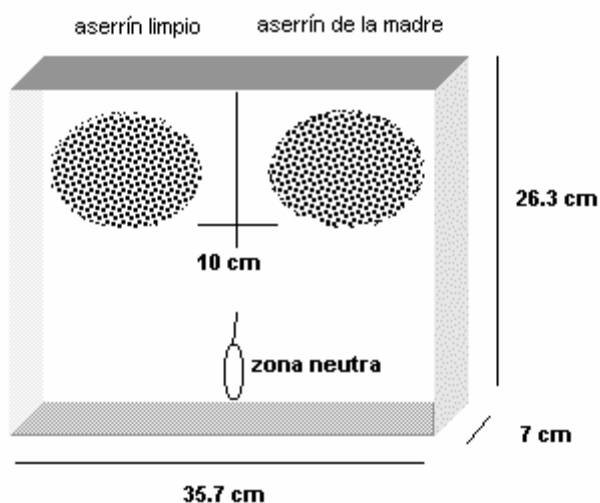


Figura 20. Caja de prueba utilizada para evaluar la discriminación olfatoria de las ratas C y D a los 7, 14 y 21 días de edad.

V. Análisis estadístico

Para todos los datos obtenidos se practicó una prueba de Kolmogorov-Smirnov de una muestra, con el fin de verificar si los datos mostraban una distribución normal y así determinar el empleo de una prueba paramétrica o no paramétrica.

Los valores de peso corporal y peso cerebral de las crías se compararon al utilizar un ANOVA de 2 vías: dos condiciones nutrimentales, control (C) y desnutridos (D) x 3 edades (7, 14 y 21 días posnatales). Los valores obtenidos de la apertura palpebral y de los meatos auditivos se analizaron con estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis y una prueba *post hoc* de U de Mann-Whitney para determinar las diferencias entre los grupos.

Los valores obtenidos de la cuantificación y medición de los glomérulos olfatorios del BO se analizaron con una ANOVA de 3 vías: dos condiciones nutrimentales (C y D) x 3 edades (7, 14 y 21 días posnatales), x 4 parámetros (número, área y longitud mayor, parámetros que se analizaron por cuadrantes: 1) porción dorsal medial, DM, 2) porción dorsal lateral, DL, 3) porción ventral medial, VM y 4) porción ventral lateral, VL.

Las comparaciones entre los índices de área de las CM respecto al BO se obtuvieron por medio de un ANOVA de 3 vías: dos condiciones nutrimentales (C y D) X 3 edades x 3 parámetros (índice de área de la CPE, CCM o CCG). Como prueba *post hoc* se utilizó la prueba de Tukey con un valor de significación $\alpha < 0.05$. Figura 21.

Los parámetros obtenidos del soma, axón y dendritas de las CM se analizaron por medio de un ANOVA, de 3 vías: dos condiciones nutrimentales (C y D) x 3 edades (7, 14 y 21 días posnatales) x 3 parámetros (área, perímetro, orden dendrítico y longitud mayor del soma). El nivel mínimo de significación asignado fue de un valor $\alpha < 0.05$. Se empleó la prueba *post hoc* de Tukey para valorar las diferencias significativas entre los grupos. La valoración estadística se realizó con el programa Systat, versión 7.0.

Los resultados obtenidos de las pruebas conductuales también se analizaron por medio de una prueba de ANOVA, de 3 vías, dos condiciones nutricias (C y D) x 3 edades (7, 14, y 21 días) x 6 diferentes tipos de conductas de orientación (latencia de acercamiento al aserrín del nido de la madre, latencia de acercamiento al aserrín limpio, duración de permanencia sobre el aserrín del nido materno, duración de permanencia sobre el aserrín limpio, frecuencia de orientación al aserrín del nido de la madre, frecuencia de orientación al aserrín limpio).

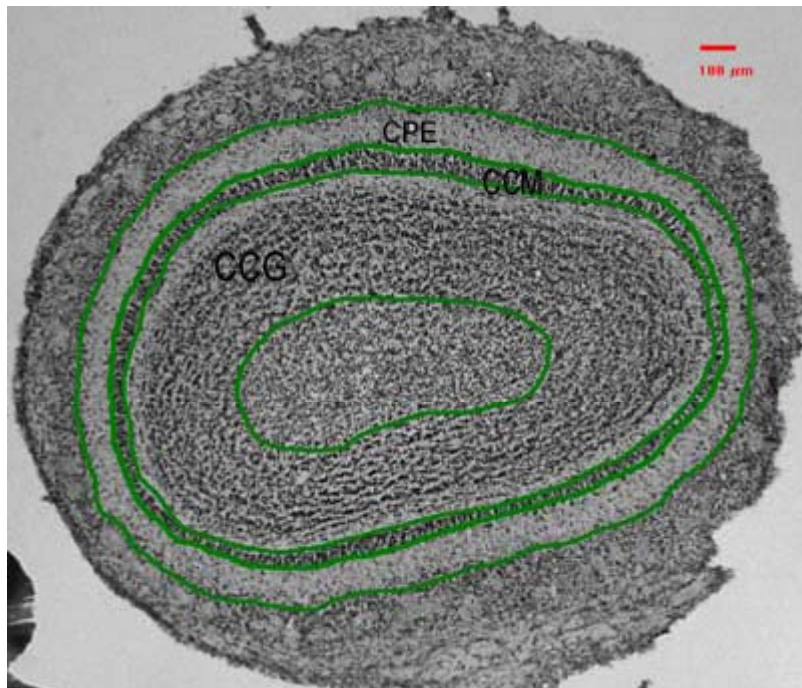


Figura 21. Fotomicrografía de un corte de uno de los BO en el cual se muestra la delimitación del área de las capas plexiforme externa (CPE), de las células mitrales (CCM), y de las células granulares (CCG). La barra de calibración equivale a 100 μm .

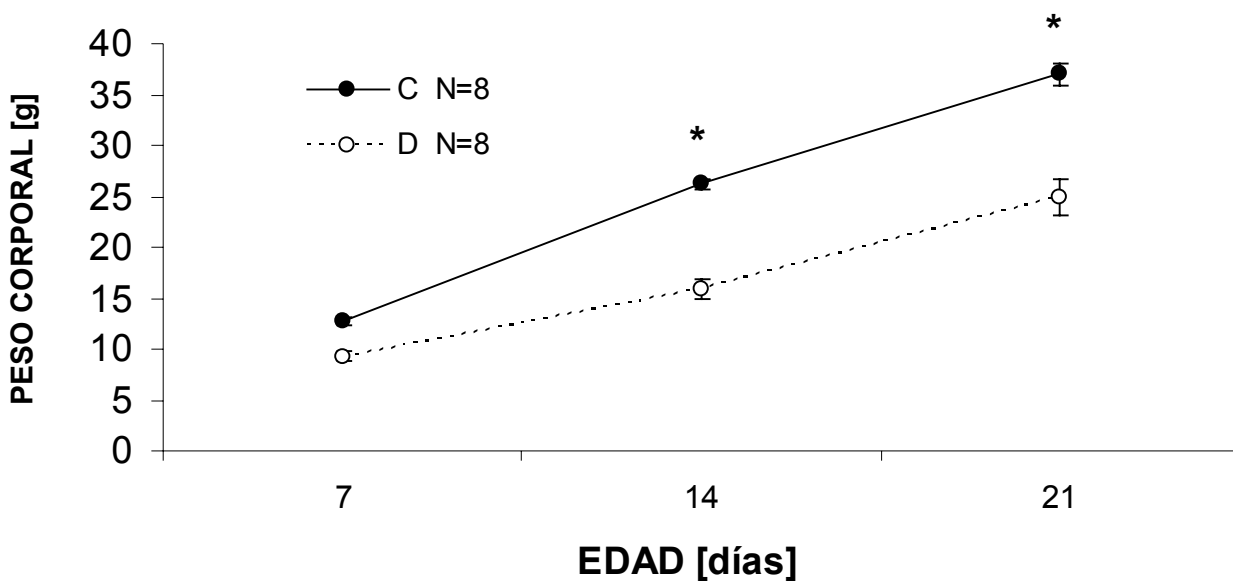
RESULTADOS

I. Valoración física de los animales

A. Peso corporal

Se compararon los pesos de las crías del grupo control (C), $n = 8$ y desnutrido (D), $n = 8$ durante la lactancia, a las edades de 7, 14 y 21 días, observándose una menor ganancia del peso en el grupo desnutrido, $F(1,14) = 126.26$, $p < 0.0001$, el cual fue afectado por la edad, $F(2,28) = 205.99$, $p < 0.0001$, con una interacción significativa entre la condición nutricia y la edad, $F(2, 28) = 10.94$, $p < 0.0001$. Las comparaciones *post hoc* mostraron una menor ganancia del peso, $p < 0.01$ en el grupo D a partir del día 7 hasta el

día 21 posnatal. La ganancia del peso en el grupo D fue aproximadamente del 35 al 40% menor respecto al grupo C para esta muestra, tal como se observa en la Gráfica 1. Figura 22.



Gráfica 1. Comparación del peso corporal entre los grupos control (C) y desnutrido (D). La prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias entre las medias \pm Error Estándar de la Media (EEM) de ambos grupos. Nivel de significancia, * $p < 0.01$, $n = 8$ animales para cada grupo.

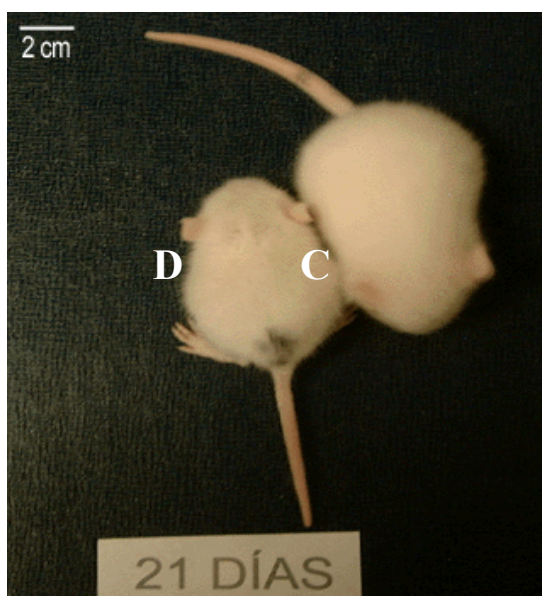
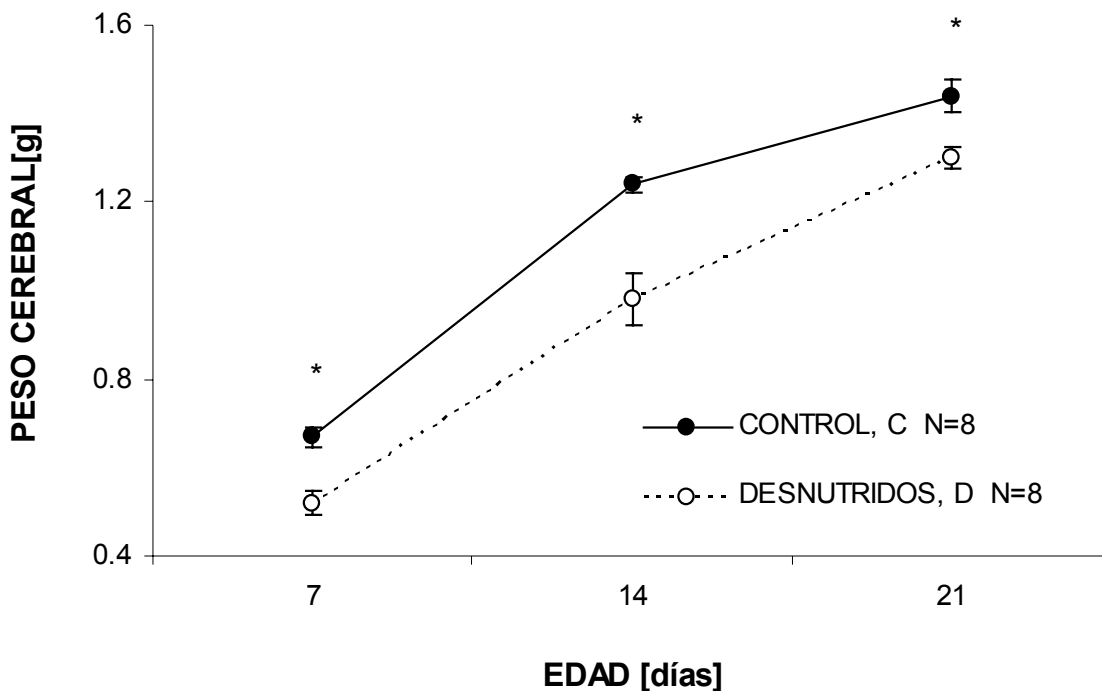


Figura 22. Diferencias físicas entre animales control (C) y desnutridos (D) a los veintiún días de edad. Calibración 2 cm.

B. Peso cerebral

Se comparó el peso cerebral fresco del grupo D respecto al grupo C, encontrándose diferencias significativas debidas a la desnutrición $F(1,14) = 50.08$, $p < 0.0001$, la cual fue modificada por efecto de la edad, $F(2,28) = 174.36$, $p < 0.0001$, sin encontrarse diferencias en la interacción entre ambos factores. La prueba *post hoc* mostró diferencias a los 7, 14 y 21 días ($p < 0.01$) en una muestra de $N = 24$ para cada grupo, $n = 8$ por edad. El déficit de peso cerebral en las tres edades fue de aproximadamente un 15 al 25% respecto al grupo C para esta muestra. Los resultados se muestran en la Gráfica 2.



Gráfica 2. Peso cerebral de animales estudiados de acuerdo con su condición nutricia, C=grupo control, D=grupo desnutrido. * Diferencias significativas entre las medias \pm EEM de ambos grupos. Se realizó una prueba *post hoc* de Tukey para comparar las diferencias, $p < 0.01$. El número de cerebros pesados fue de $N = 24$ para cada grupo, con una $n = 8$ para cada edad.

Se observó que la disminución del peso corporal en términos proporcionales en las edades más maduras fue mayor respecto a la disminución del peso cerebral en las mismas edades, por ello se realizó un análisis de la relación alométrica entre ambas variables, obteniéndose la diferencia del valor del peso cerebral respecto al valor del peso corporal. Estas relaciones se compararon con una prueba de t de student, la cual mostró

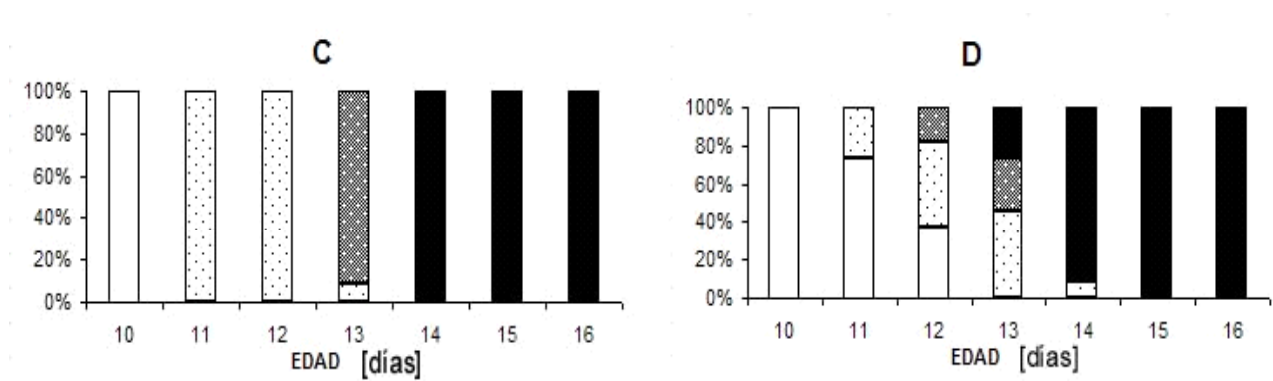
diferencias significativas ($p < 0.05$), indicando que efectivamente la relación de disminución de peso no fue igual entre ambas variables.

Cuadro 4. Relación alométrica entre el peso corporal y cerebral en las diferentes edades.

GRUPO	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS
CONTROL	0.051	0.047	0.038
DESNUTRIDO	0.057	0.061	0.052

C. Apertura de los meatos auditivos externos

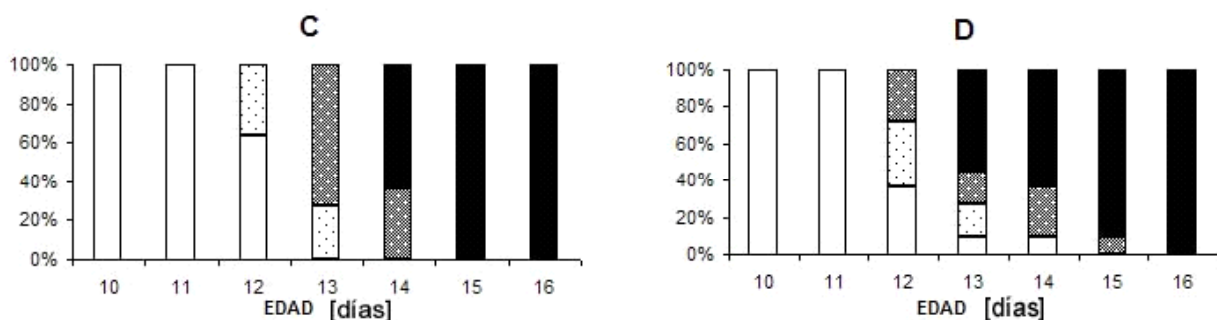
El número de animales evaluados para estas variables fue de $n = 11$ para cada grupo, C y D. La apertura de los meatos auditivos en el grupo C inició el día 11 posnatal $U = 33.17$, $p < 0.001$ en un 60% de los animales, mientras que en el grupo D sólo un 10% mostró la apertura de los meatos auditivos. Fue notable observar que la apertura en las crías desnutridas, se produjo, de manera súbita o errática con un menor porcentaje de apertura en estadíos intermedios, mientras que en el grupo C la apertura fue de manera gradual, así en el día 12 siguieron mostrando esa diferencia $U = 14.63$, $p < 0.01$, en el día 13, $U = 17.65$, $p < 0.01$. En tanto que la apertura total de los meatos auditivos externos en el grupo C se produjo en el día 14 posnatal, mientras que el grupo D mostró un atraso de un día (15 posnatal), $U = 18.02$, $p < 0.001$. Los resultados se muestran en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Apertura de los meatos auditivos externos en el grupo C=control y D=desnutrido. □ indica que no ha ocurrido la apertura de la estructura, ◻ indica un tercio de la estructura abierta, ◼ indica la mitad de la estructura abierta y ■ muestra la total apertura de la estructura. Nótese, que la apertura de los meatos auditivos externos en el grupo desnutrido se retrasó respecto al grupo control desde el día once hasta el día catorce posnatal, $N=11$ para cada grupo.

D. Apertura palpebral

La apertura palpebral del grupo C se inició en el día 12, en un porcentaje de alrededor del 20%, al igual que el grupo D con cerca de un 30% de los animales y un 25% con la mitad de la estructura abierta lo cual indica que el grupo D se adelantó en el desarrollo de esta estructura, mostrando con esto una diferencia entre ambos grupos $U = 11.30$ ($p < 0.05$), la cual se mantuvo el día 13, $U = 16.07$, $p < 0.01$, pero fue hacia el día 14 que el grupo C ya mostraba más de la mitad del párpado abierto, en tanto que el grupo D mostró un retraso. El día 15 se dio la completa apertura de los ojos en el grupo C, mientras que en D se retrasó la apertura hasta el día siguiente en el día 16 posparto, originando con esto una diferencia entre los grupos $U = 9.0$, $p < 0.05$. Al igual que en la apertura de los meatos auditivos externos, la apertura palpebral se produjo de manera errática en el grupo D y aunque por momentos se adelantó, esta apertura fue lánguida. La Gráfica 4 muestra las diferencias de la apertura entre los grupos en términos porcentuales.



Gráfica 4. Apertura palpebral del grupo C = control y D = desnutrido. El índice de colores para las barras, es igual al de la gráfica 3. La apertura de los párpados en el grupo D se adelantó a los doce y trece días posnatales, mientras que la apertura total de los párpados se atrasó por un día, el día dieciséis posparto. La $N = 11$ para cada grupo.

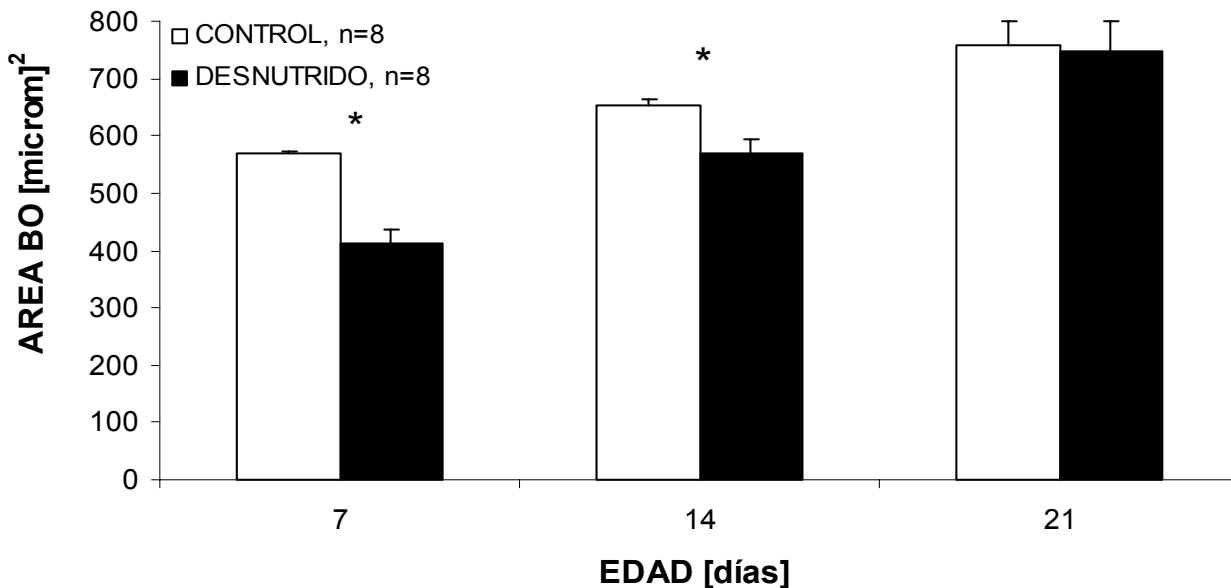
II. Valoración histológica

A. Morfometría del bulbo olfatorio, BO

Área

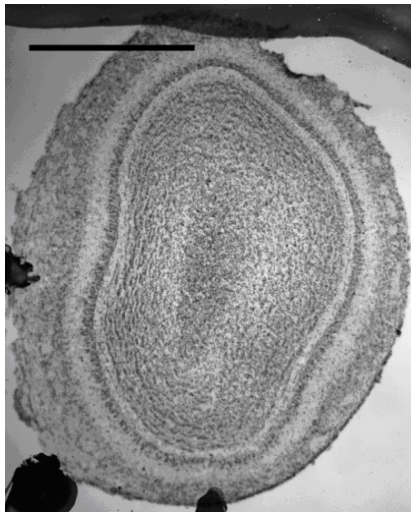
Se obtuvieron los valores del área y perímetro del BO, pero dada su alta correlación ($A7$ vs $P7$, 0.9, $A14$ vs $P14$, 0.85 y $A21$ vs $P21$, 0.9) únicamente se muestran los valores del área en ambos grupos en las tres edades estudiadas. Como se mostró en un apartado anterior, la desnutrición incidió en el peso del cerebro, por lo que es de esperar que

influyera en el desarrollo del bulbo olfatorio. Se encontraron diferencias entre los grupos por efecto de la condición nutricia, $F(1,14) = 8.69$, $p < 0.01$, la edad $F(2,28) = 41.52$, $p < 0.001$ sin interacción entre ambos factores. La prueba *post hoc* mostró que en los días 7 y 14 de edad disminuyó significativamente ($p < 0.01$) el área del BO en el grupo D, mientras que a los 21 días posnatales no se encontraron estas diferencias entre los grupos. Gráfica 5.

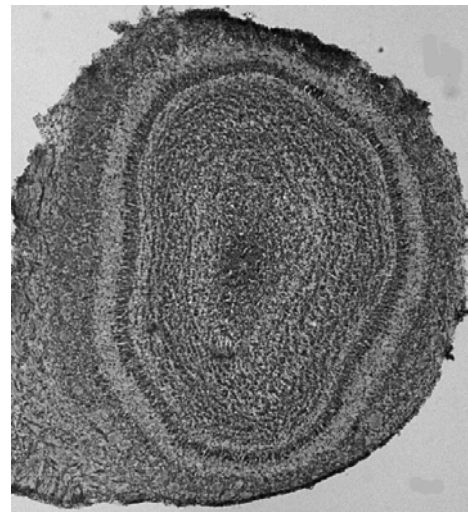


Gráfica 5. Área del bulbo olfatorio. Se encontraron diferencias significativas a los siete y catorce días posnatales * $p < 0.01$.

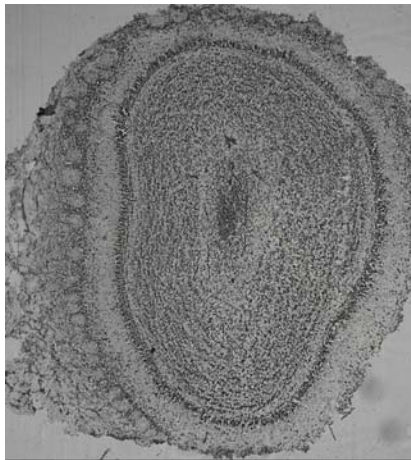
En la figura 23 se muestran fotomicrografías de cortes coronales del BO en los grupos C y D en las tres edades.



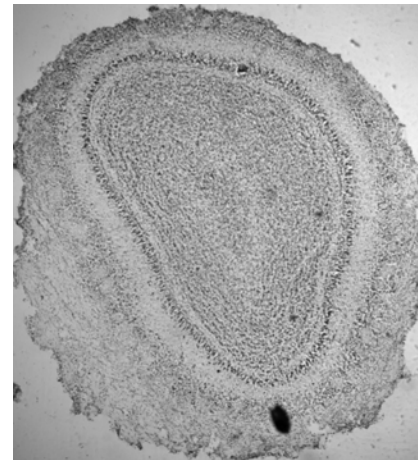
7D CONTROL



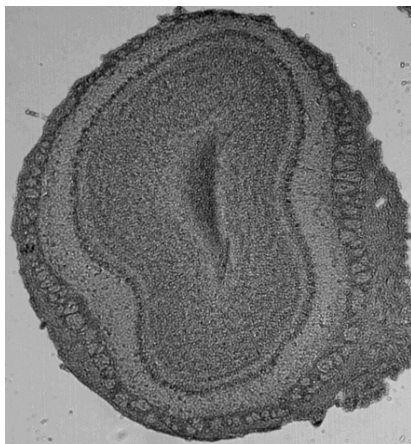
7D DESNUTRIDO



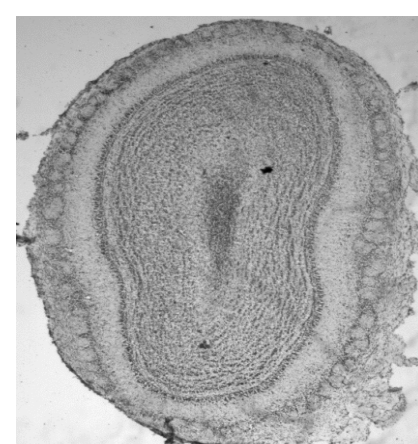
14D CONTROL



14D DESNUTRIDO



21 D CONTROL



21D DESNUTRIDO

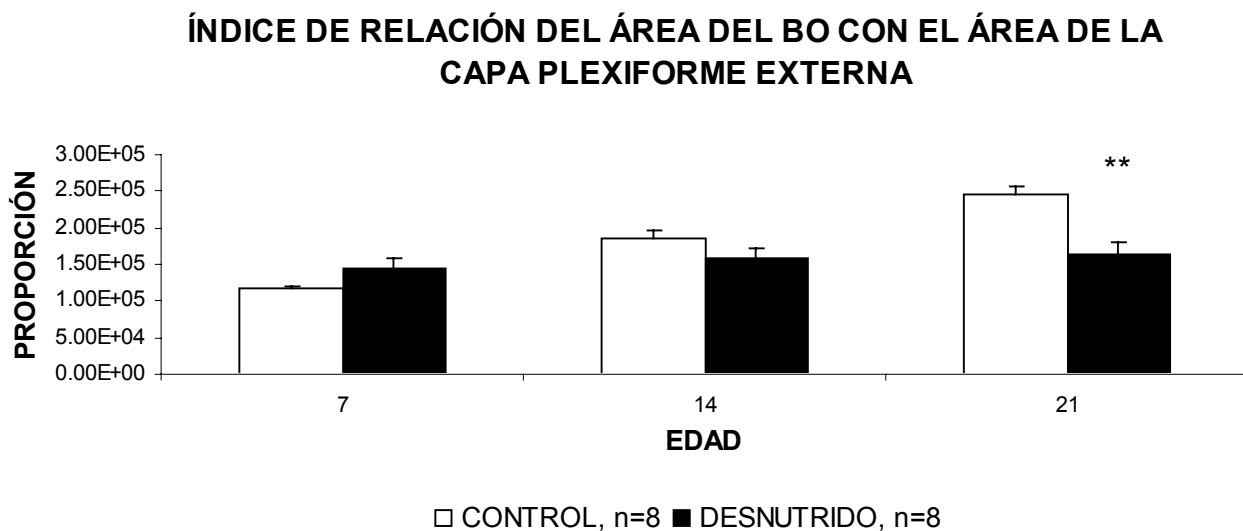
Figura 23. Fotomicrografías de uno de los bulbos olfatorios de cada grupo en las edades estudiadas. El objetivo utilizado fue de 4X. En algunas de las fotos la densidad de las capas celulares en el grupo control parece ser más compacta respecto al grupo desnutrido aunque podría ser un efecto de la técnica. Barra de calibración, 1mm en la primera foto.

B. Capas celulares. Índice de relación del área del BO y del área de las capas celulares que lo componen.

a. Capa plexiforme externa, CPE

Con el fin de conocer el impacto que tiene la desnutrición en el BO en sus diferentes poblaciones celulares y en la organización de las capas radiales se comparó el área del BO (como un valor de 100%) con las distintas capas que lo conforman, esto es la capa plexiforme externa (CPE), la capa de las células mitrales (CCM) y la capa de las células granulares (CCG). Esto permitió establecer un índice de relación entre la medida general del BO y sus partes entre los grupos con diferentes condiciones de nutrición. La (CPE) está compuesta principalmente por prolongaciones dendríticas secundarias de células mitrales, células en penacho y células granulares. Para su evaluación se empleó la técnica de Nissl, que tiñe los núcleos celulares y permitió discriminar los contornos de las capas cuya disposición se describe en el atlas de Paxinos y Watson (1986). Figura 7.

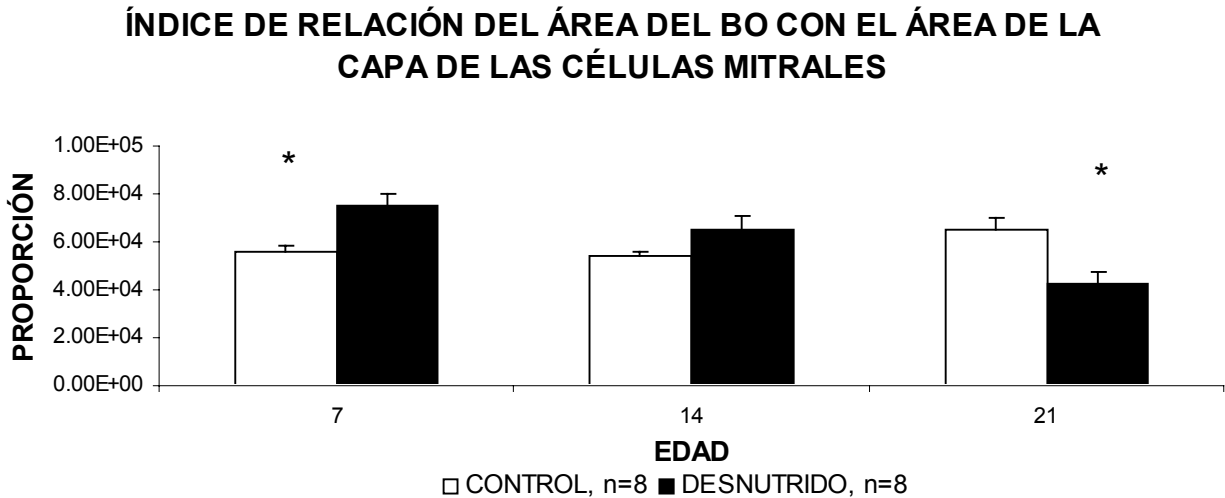
Los resultados obtenidos del índice de relación entre el BO y la CPE mostró diferencias por efecto de la condición nutricia, $F(1,14) = 8.63$, $p < 0.01$, la edad $F(2,28) = 15.07$, $p < 0.0001$ y la interacción entre ambos factores, $F(2,28) = 8.06$, $p < 0.01$. Los datos analizados con una prueba *post hoc* mostraron una disminución del índice de relación en el grupo D respecto al grupo C en el día 21, $p < 0.001$. Gráfica 6.



Gráfica 6. Índice de relación entre el área del BO y la capa plexiforme externa. En el día veintiuno hay una relación de menor proporción de esta capa en el grupo desnutrido, prueba *post hoc* de Tukey, $**p < 0.001$.

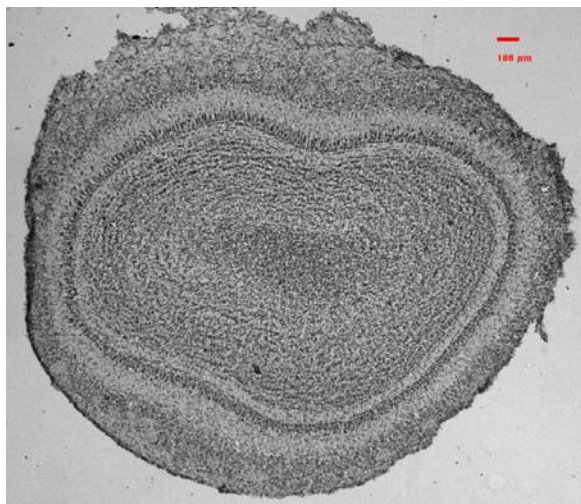
b. Capa de las células mitrales, CCM

Esta capa se caracteriza por la preponderancia de los somas de las CM. Los resultados no muestran diferencias por efecto de la condición nutricia, pero si se encuentra un efecto por la edad, $F(2,28) = 3.16$, $p < 0.05$ así como entre el factor nutricio y la edad, $F(2,28) = 12.18$, $p < 0.001$.

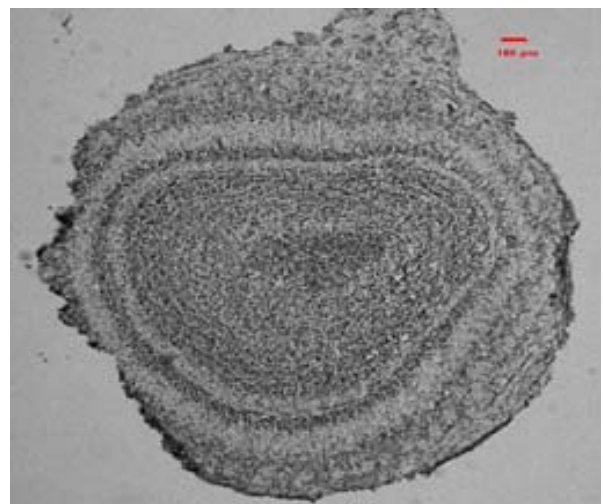


Gráfica 7. El día siete y veintiún posnatales son los que muestran las mayores diferencias entre los grupos, con una proporción mayor en el grupo D en el día 7 y una menor proporción en el grupo D respecto al grupo C en el día 21, * $p < 0.01$.

La relación entre la CCM y el BO mostró diferencias entre los grupos a los 7 días posnatales en donde el grupo D mostró una mayor proporción en el índice respecto al grupo C, manteniéndose esta tendencia a los 14 días, sin embargo, a los 21 días la relación se invirtió y se observó una disminución del índice de relación en el grupo D como era de esperarse por efecto de la desnutrición. Gráfica 7. En la Figura 24 se muestran dos cortes coronales del BO en donde se muestran algunas variaciones en la organización de las capas.



A **7D CONTROL**



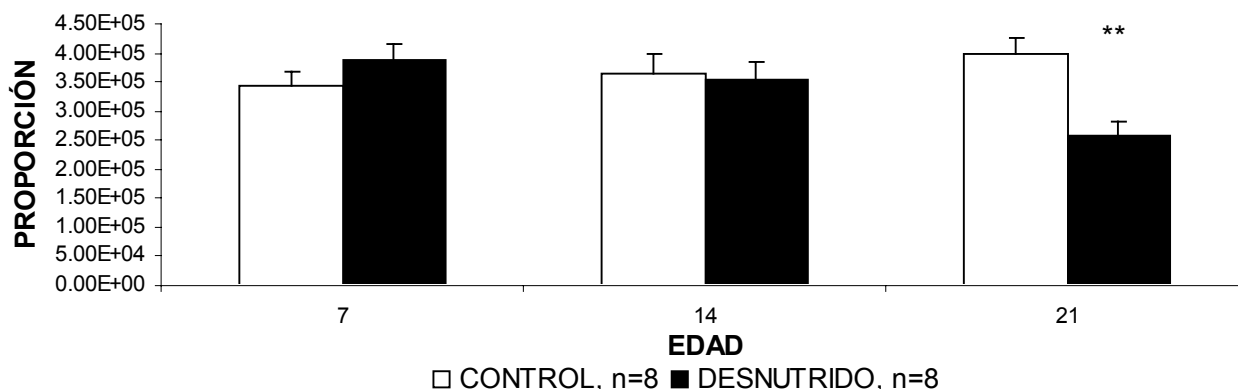
B **7D DESNUTRIDO**

Figura 24. Cortes del BO que muestran las capas radiales en donde el grupo D son aparentemente más laxas y menos definidas respecto al grupo C, cuya densidad parece ser más compacta. A) Corte transversal del BO del grupo C a los siete días, tinción Nissl. B) Corte de BO en la misma edad en el grupo D. En esta edad todavía no es notable la diferencia en el tamaño del BO entre los grupos. Calibración, 100 μ m.

c. Capa de las células granulares, CCG

La comparación del índice de relación del BO respecto a la CCG, la cual se caracteriza por la preponderancia de este tipo celular no mostró diferencias por efecto del grupo, ni por la edad, aunque si hubo diferencias en la interacción entre ambas variables, $F(2,28) = 5.61$, $p < 0.01$. En el día 21 se muestran los resultados de las diferencias entre los grupos por una prueba *post hoc*, $p < 0.001$. En la Gráfica 8 se muestra la reducción del índice de relación entre la CCG y el BO en el grupo desnutrido a los 21 días.

ÍNDICE DE RELACIÓN DEL ÁREA DEL BO CON EL ÁREA DE LA CAPA DE LAS CÉLULAS GRANULARES



Gráfica 8. Índice de relación del área del BO con la CCG. En el día veintiuno el grupo D muestra una menor relación de área respecto al grupo C lo cual se conserva de manera consistente en las otras dos capas evaluadas, CPE y CCM.

C. Morfometría de los glomérulos olfatorios, GOs

a. Número de GOs en el BO completo

La evaluación de la morfometría de los GOS se sustenta en la importancia que representa esta estructura como la unidad funcional del sistema olfatorio

En la evaluación del número total de GOs en la región media del BO, n=8 por cada grupo, no se encontraron diferencias significativas por efecto de la condición nutricia, la edad o la interacción entre ambas, sin embargo, se obtuvieron diferencias por efecto de la región $F(3,42) = 4.38$, $p < 0.01$, sin encontrarse diferencias significativas en la interacción región x grupo y edad x región. Al evaluarse la interacción edad x región x grupo se observaron diferencias significativas, $F(6,84) = 2.21$, $p < 0.05$. La prueba *post hoc* de Tukey mostró una disminución de los GOs en el grupo D respecto al grupo C en la región DL a los 7 días $F(1,14) = 4.35$, $p < 0.05$ indicada en asterisco en la Gráfica 9.

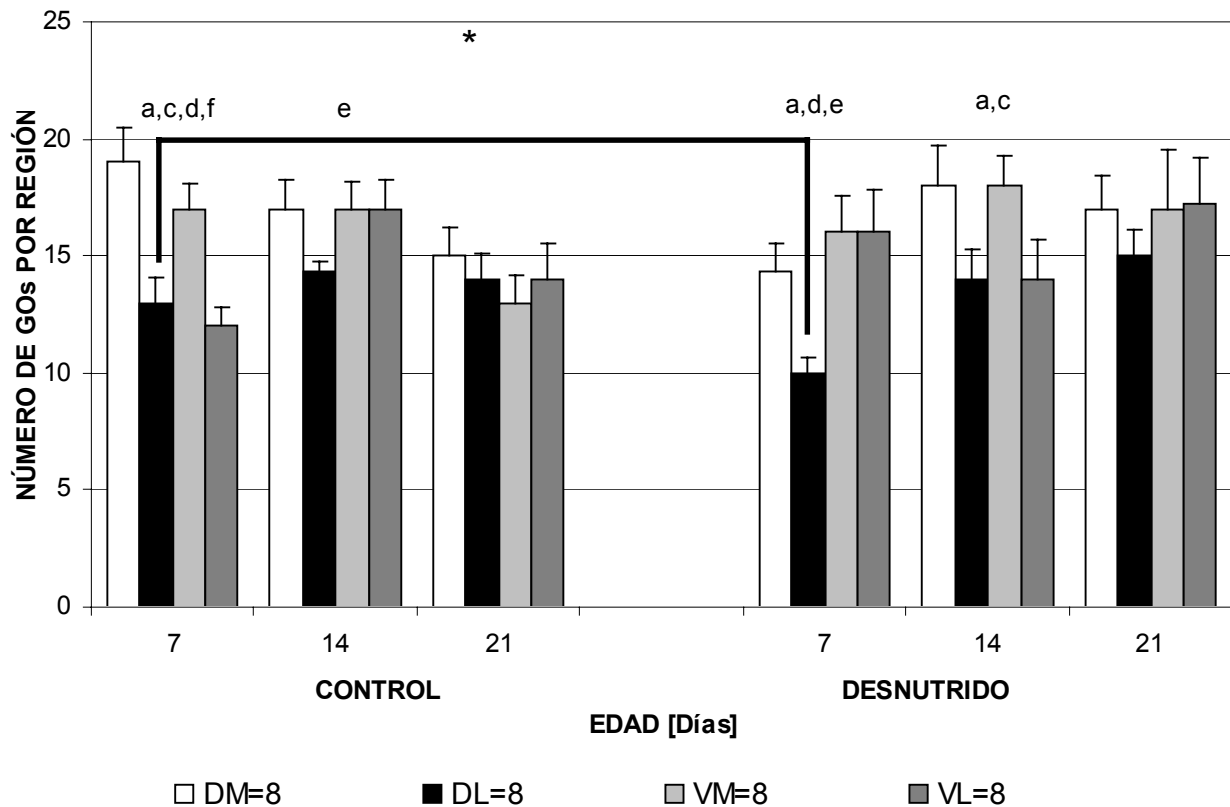
b. Número de GOs en las regiones del BO

Dado que las pruebas estadísticas indicaron diferencias por efecto de la región, se procedió a hacer un análisis del número total de los GOs dividiendo el BO por regiones (n=4 regiones x 3 edades = 12 x 8 BOs para cada grupo) se obtuvieron estos resultados

encontrándose diferencias en el factor región $F(3,42) = 4.4$, $p < 0.01$. Las regiones evaluadas fueron: dorsal medial, DM; dorsal lateral, DL; ventral medial, VM y ventral lateral, VL.

Grupo control

Posteriormente al análisis general se evaluó el número de GOs independientemente en cada uno de los grupos, así se obtuvieron diferencias en la región ventral lateral (VL) en el grupo C, $F(2,21) = 3.52$, $p < 0.05$, sin observarse diferencias significativas en las otras regiones: DM, DL, DM. La comparación de las distintas regiones en las tres edades, analizadas con una prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias a los 7 días entre la región DM y DL ($p < 0.05$), (a), DM y VL ($p < 0.01$), (c), en donde DL y VL (e) mostraron un menor número de GOs respecto a DM al igual que VM y VL, ($p < 0.05$), (f). A los 14 días posparto se encontraron diferencias entre las regiones DL y VL, $p < 0.05$ (e) con un menor número de GOs en DL, lo cual sugiere que los GOs de esta región se desarrollaron tardíamente. A los 21 días de edad no se observaron diferencias en el número de GOs entre las regiones. Todas las literales se muestran en la leyenda de la Gráfica 9.



Gráfica 9. Número de glomérulos olfatorios por región en el BO en los grupos control y desnutrido. Las literales muestran las diferencias significativas entre las regiones, diferencias que se pueden repetir en las diferentes edades y grupo; a), representa la diferencia del número de GOs entre la región DM respecto a la región DL a los siete días en el grupo C y D, así como a los catorce días en el grupo D; b) representa la diferencia en DM y VM, no indicado aquí; c) la diferencia entre la región DM respecto a la región VL a los siete días en el grupo C y a los catorce días en el grupo D; d) representa la diferencia entra la región DL respecto a la región VM a los siete días en ambos grupos; e) indica la comparación entre DL en relación a VL a los catorce días en el grupo C y a los siete días en el grupo D; f) únicamente muestra diferencias en el grupo C en la región VM respecto a VL. n = 8 BOs para cada región y para cada edad = 24 BOs para cada grupo. * p < 0.05.

Grupo desnutrido

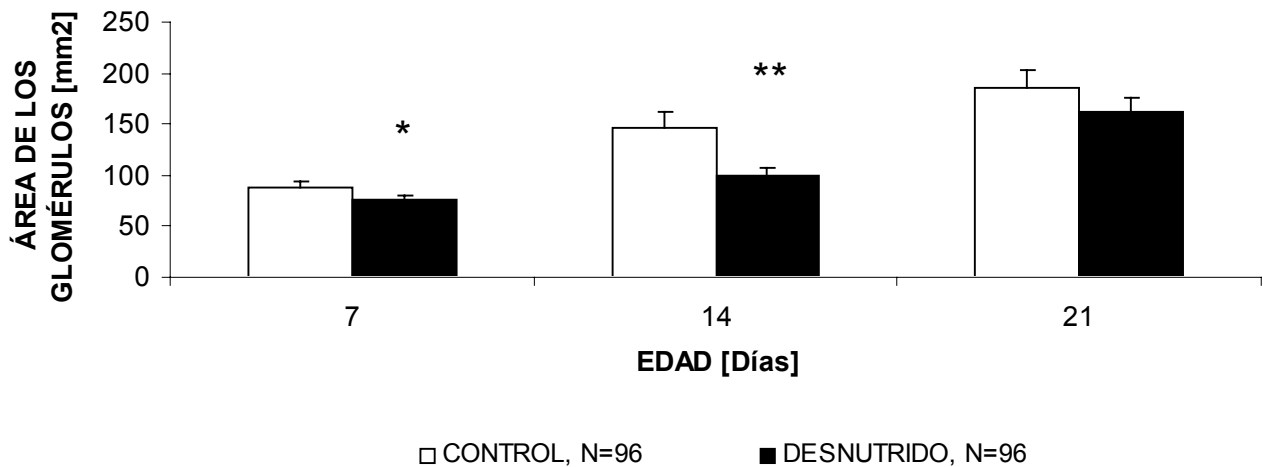
En el grupo D se obtuvieron diferencias en las regiones $F(3,63) = 3.41$, $p < 0.05$, siendo la región DL la que mostró diferencias significativas, $F(2,21) = 5.01$, $p < 0.01$. La prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias a los 7 días entre la región DM y DL ($p < 0.05$), (a), esta última mostró un menor número de GOs tal como se observó en el grupo

C. Asimismo, se encontraron diferencias entre la región DL y VM ($p < 0.01$) (d) con un menor número en la región DL. Las regiones DL vs VL (e) difirieron entre sí ($p < 0.01$), mostrándose un número menor en DL, como también se obtuvo en el grupo C. A los 14 días posparto se encontraron diferencias en el número de GOs entre las regiones DM y DL (a), siendo menor el número en esta última región. El número de GOs entre la región DM y VL (c) mostró diferencias entre sí, siendo menor en DL ($p < 0.05$). Las literales se muestran en la Gráfica 9.

De manera general los resultados muestran que la región del BO medio que se desarrolló tardíamente en el grupo C fue la porción ventral, en tanto que en el grupo D fue la dorsal, ambos casos coinciden en la porción lateral, lo cual indica que la porción medial en las distintas edades en ambos grupos y edades es la que mantiene más constancia en el número de GOs, resultado que sugiere que se trata del área de mayor consistencia en el BO y es al parecer la que se estabiliza primeramente y que en el grupo D muestra un retraso en la maduración en el tiempo respecto al grupo D por la aparición de la curva de aparición del número de GOs.

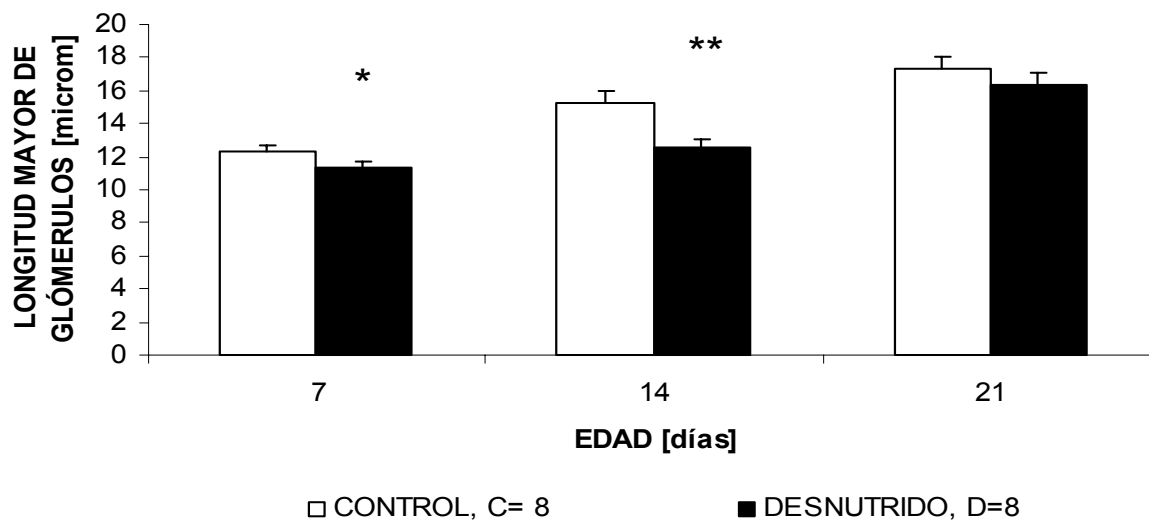
c. Área y longitud mayor de los GOs en el BO completo

Estos resultados muestran las diferencias obtenidas en los parámetros métricos del área y la longitud de los GOs en los grupos C y D en las distintas edades. Estas variables se analizaron en 96 GOs para cada grupo, en cada edad, en 8 BOs, evaluándose los datos en conjunto, posteriormente se realizó un análisis por regiones. No se encontraron diferencias significativas por efecto de la condición nutricia. Hubo diferencias significativas por efecto del crecimiento, $F(2,92) = 13.91$, $p < 0.001$, aunque no se encontraron diferencias en la interacción entre ambos factores. La prueba post hoc, mostró que el área de los GOs fue menor en el grupo D respecto al grupo C a los días 7 y 14 de edad, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, sin diferencias entre los grupos en el día 21 posnatal, Gráfica 10.



Gráfica 10. Área de los GOs, gráfica que muestra un área menor de los GOs en el grupo desnutrido respecto al grupo control a los siete y catorce días posparto. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $N = 96$ GOs para cada grupo.

Con respecto al parámetro de la longitud mayor de los GOs, se observaron diferencias por el efecto de la condición nutricia, $F(1,46) = 6.5$, $p < 0.01$ y el crecimiento, $F(2,92)$, $p < 0.001$, aunque sin diferencias en la interacción entre ambos factores, Gráfica 11. La prueba *post hoc*, mostró que el grupo D tuvo una longitud menor de los GOs respecto al grupo C en los días 7 y 14 posnatales, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, sin diferencias en el día 21 posparto, Gráfica 11. La longitud mayor se correlacionó altamente con el área por encima del 0.9 en la valoración de ambos parámetros en el BO completo y por regiones. La sumatoria de los promedios de la longitud mayor de los GOs de las tres edades que se obtuvieron para el grupo C fue de $15 \pm 0.4 \mu\text{m}$ respecto al grupo D = $13.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ lo cual muestra una diferencia significativa entre los grupos, $p < 0.01$.

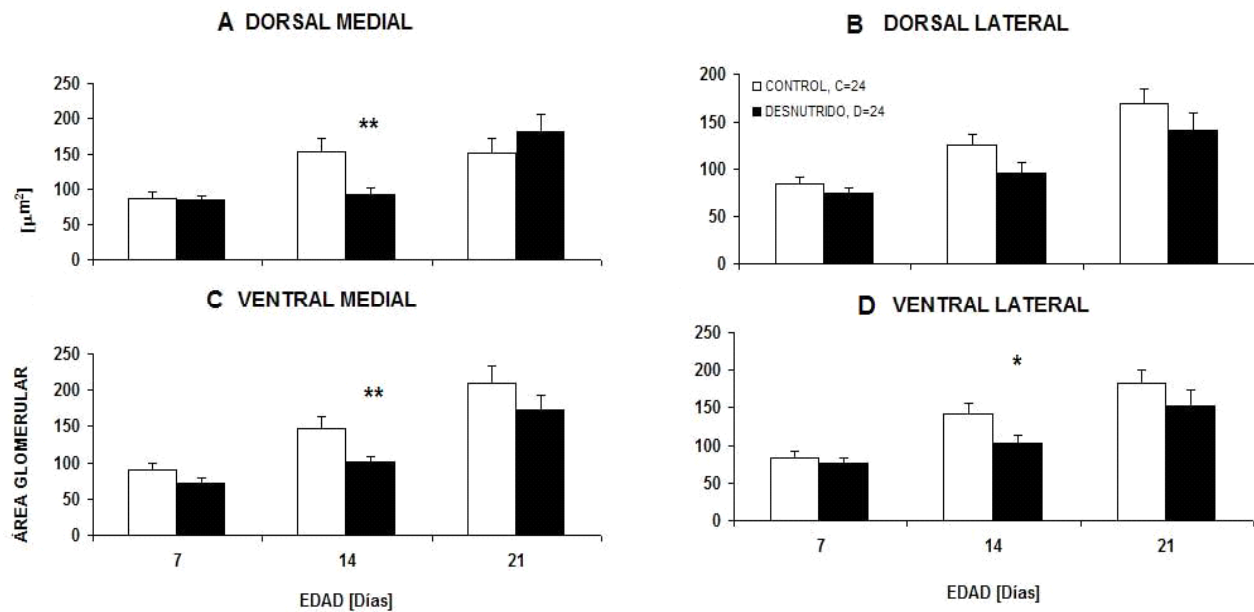


Gráfica 11. Longitud mayor de los GOs. El grupo D muestra una menor longitud respecto al grupo C. La diferencia se observa desde los siete días posparto, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ pruebas post hoc de Tukey. N = 96 GOs para cada grupo.

d. Área de los GOs por regiones

La evaluación del área de los GOs en las distintas regiones del BO mostró diferencias entre los grupos $F(1,46) = 6.02$, $p < 0.01$, así como diferencias por efecto del crecimiento, $F(2,92) = 58.81$, $p < 0.0001$, sin encontrarse diferencias entre las interacciones, excepto una tendencia ($p < 0.09$). Las pruebas *post hoc* indicaron una reducción en el área de los GOs en el grupo D respecto al grupo C a los 14 días en tres regiones DM, $F(1,46) = 7.35$, $p < 0.01$; VM, $F(1,46) = 7.13$, $p < 0.01$ y VL, $F(1,46) = 4.84$, $p < 0.05$ como se aprecia en la Gráfica 12.

De manera general los GOs del grupo C mostraron un incremento constante en el periodo posnatal desde el día 7 hasta el 21 posnatal, mientras que en el grupo D el crecimiento se retrasó principalmente en el día 14 de edad



Gráfica 12. Área de los GOs por región. (A) Se observa una disminución del área de los GOs en la región DM del grupo D a los catorce días posnatales. (B) en esta área no se encontraron diferencias significativas. (C) El área de los glomérulos ubicados en la región VM del grupo D, fue menor respecto al grupo C cuya diferencia se observó el día catorce posnatal. (D). El área de los GOs fue menor en el grupo D en la región VL a los catorce días postparto. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $N = 24$ GOs para cada una de las regiones como se indica en la gráfica B. $N = 96$ GOs para cada grupo.

D. Morfometría de las Células Mitrals, CM

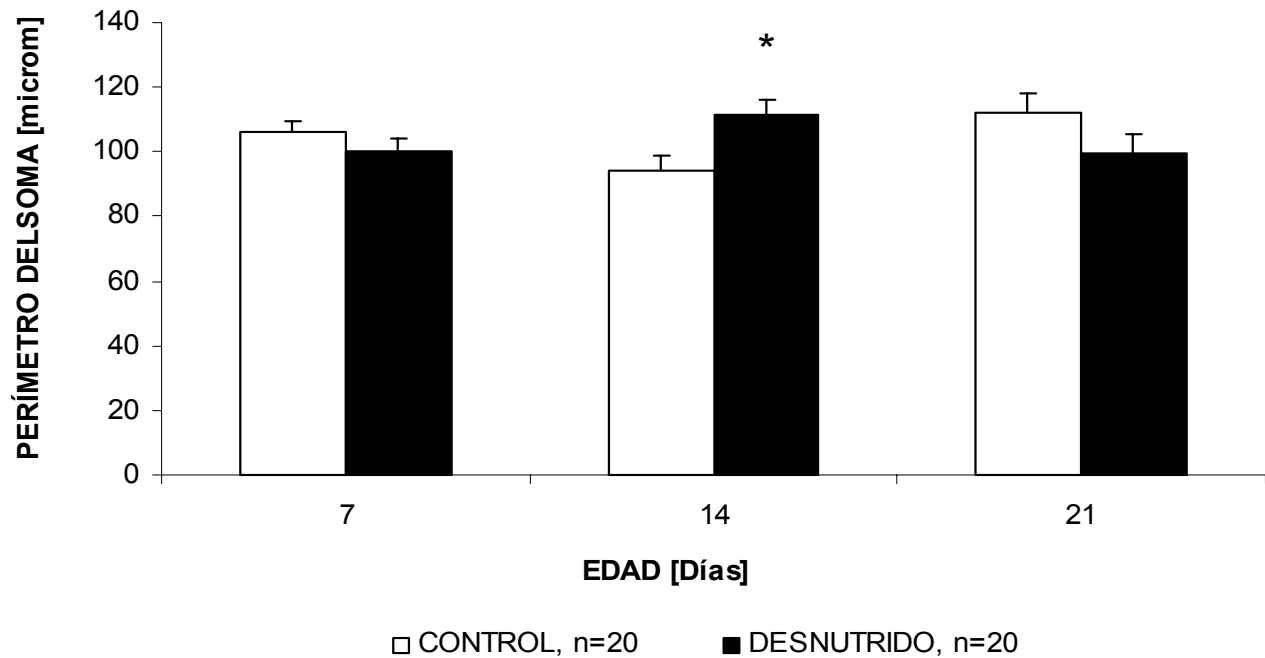
Dada la importancia de la participación de las células mitrales en la conformación del neuropilo de los glomérulos olfatorios y por su función de relevo y modulación de la señal olfatoria como segunda sinapsis en el BO, se procedió a valorar los parámetros de medición en ambos grupos, C y D en las tres edades consideradas.

a. Longitud mayor del soma

Esta variable no mostró diferencias significativas por efecto de la desnutrición, la edad o la interacción entre ambos factores. El valor promedio de la longitud mayor del soma de las CM en las distintas edades tuvo un valor promedio de 36.3 a 38.5 μm para el grupo C y de 34.9 a 39.4 μm para el grupo D.

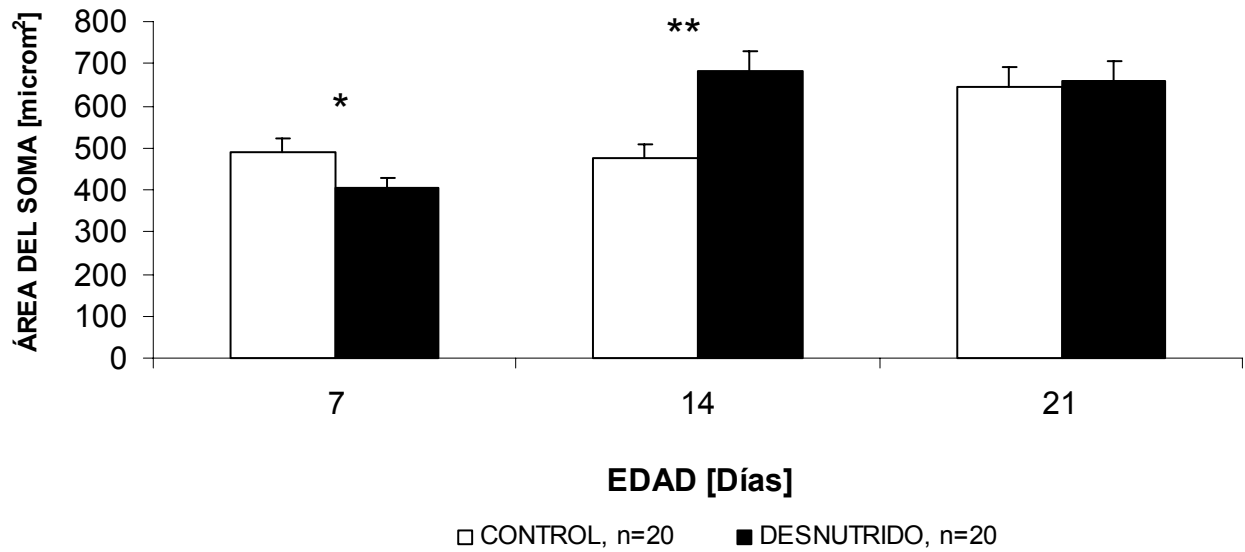
b. Perímetro y área del soma

En relación al perímetro del soma no se obtuvieron efectos por la deficiencia nutricia, ni por la edad, aunque si por efecto de la interacción de ambos factores, $F(2,76) = 5.39$, $p < 0.01$. La prueba *post hoc* de Tukey mostró que el perímetro de las CM en el grupo D fue mayor a los 14 días posnatales respecto al grupo C, $p < 0.01$. Esta variable posee una relación directa con el área del soma. Gráficas 13 y 14.



Gráfica 13. Perímetro del soma de las células mitrales. En animales desnutridos este parámetro fue mayor respecto al grupo control a los catorce días. La N = 20 indica el número de CM evaluadas en cada uno de los grupos.

El área del soma no mostró diferencias por la condición nutricia pero sí por efecto de la edad, $F(2,76) = 11.26$, $p < 0.001$, así como en la interacción entre la edad y la condición nutricia, $F(2,76) = 2.93$, $p < 0.01$. El análisis *post hoc*, indicó que a los 7 días posnatales el área del soma fue significativamente menor en el grupo D ($p < 0.05$), mientras que los 14 días en este mismo grupo, el soma mostró un área mayor respecto al grupo C, ($p < 0.01$) sin llegar a alcanzar un área por encima del grupo C en relación a su desarrollo en el día 21 posparto, Gráfica 14.



Gráfica 14. Área del soma de las células mitrales. Se observan diferencias por efecto de la edad, así como por la interacción entre la edad y la condición de nutrición, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. N = 20 células por grupo.

La Figura 25 muestra fotomicrografías de dos cortes del BO en donde se advierte una menor densidad aparente de los somas y de las prolongaciones dendríticas en el grupo D respecto al grupo C en la capa de las células mitrales.

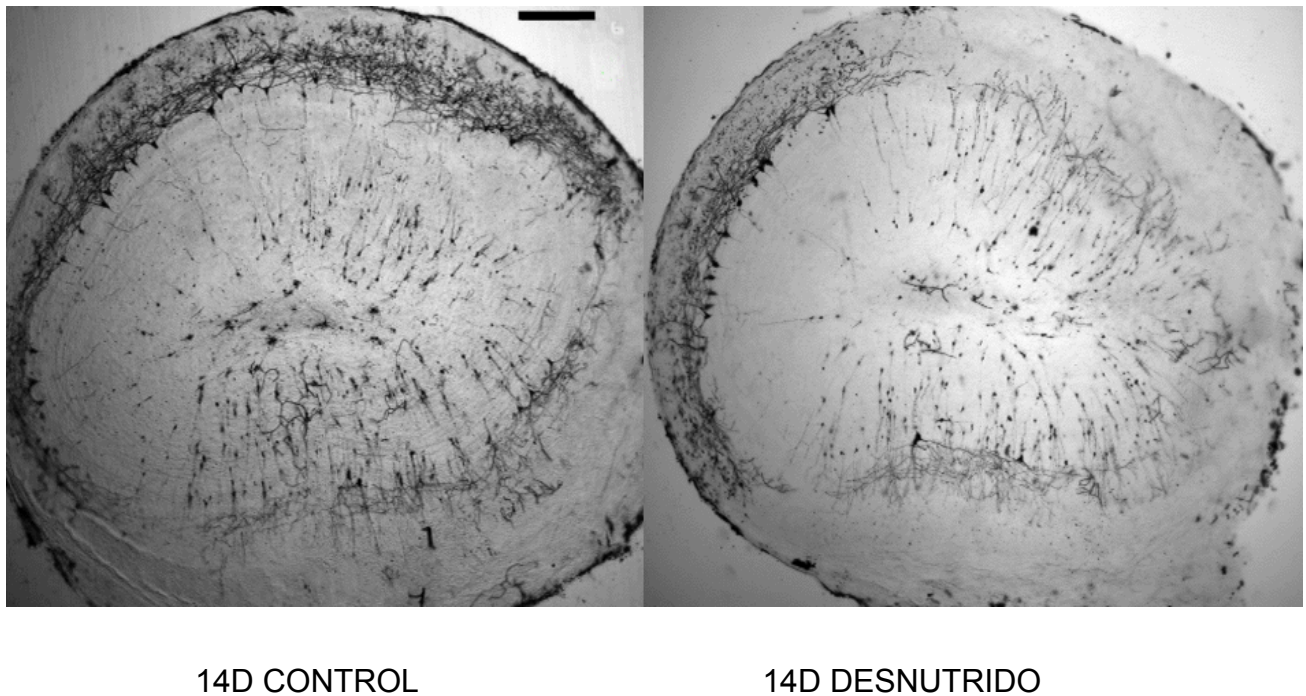
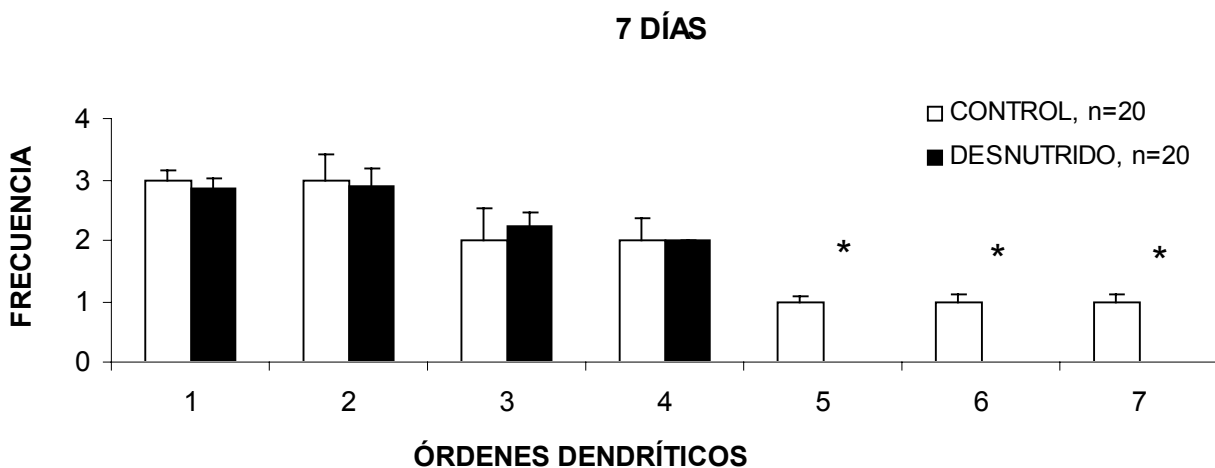


Figura 25. Fotomicrografías de bulbos olfatorios tratados con la técnica de Golgi-Cox. Nótese la disminución de la densidad de las prolongaciones dendríticas en el grupo desnutrido respecto al grupo control. Calibración 100 micras.

c. Orden dendrítico

Esta variable se refiere a la complejidad de las ramas dendríticas en las CM, las cuales se evaluaron por el método de Sholl. Los resultados mostraron diferencias notables entre los grupos, $F(1,38) = 69.9$, $p < 0.001$, por efecto de la edad, $F(2,76) = 38.03$, $p < 0.001$ y de la interacción entre ambos factores, $F(2,77) = 9.38$, $p < 0.001$. En las tres edades se observaron efectos contundentes de la desnutrición en el desarrollo de la CM las cuales aunque se formaron gestacionalmente pero se vieron afectadas en su desarrollo posnatal. Las pruebas *post hoc* indicaron diferencias a los 7 días, con una carencia de los órdenes 5o, 6o y 7o, en el grupo D, $p < 0.001$, Gráfica 15.



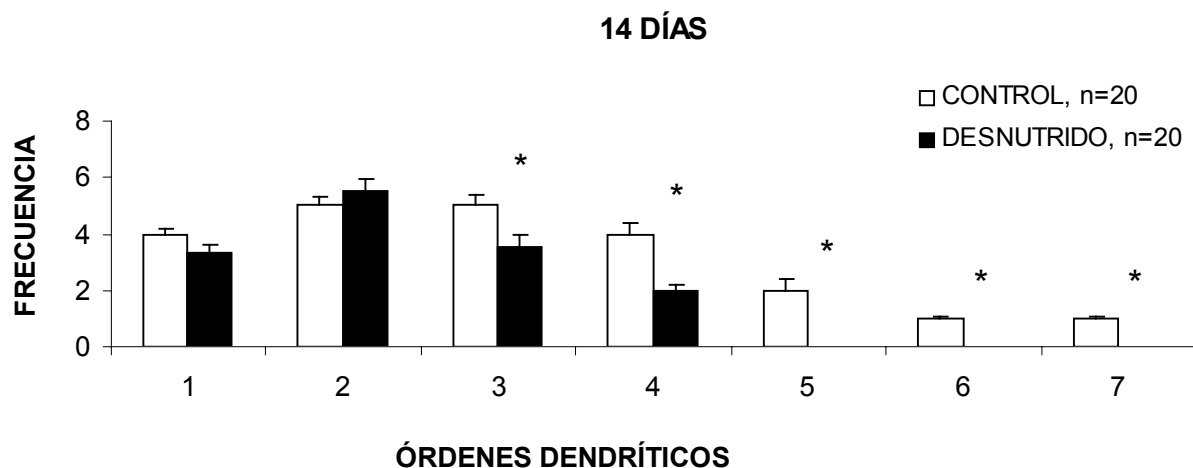
Gráfica 15. Orden dendrítico de las células mitrales a los siete días. Nótese la ausencia de dendritas del quinto, sexto y séptimo orden en el grupo D. En esta edad continúa el desarrollo de las dendritas en ambos grupos. Prueba de Tukey * $p < 0.001$. El valor de la $n = 20$ significa el número de células evaluadas para cada grupo en cada edad.

A continuación se muestran los dibujos de las CM en cámara lúcida a los 7 días, obsérvese la disminución de la complejidad de las ramas dendríticas, número y longitud de las mismas en el grupo D. Figura 26.



Figura 26. Dibujos en cámara lúcida de células mitrales de ratas a los siete días de edad. CM de la derecha en una rata desnutrida; CM de la izquierda de una rata control. Las observaciones se realizaron con el objetivo de 10X. La barra de calibración muestra 10 micras.

A los 14 días posnatales (Gráfica 16) el orden dendrítico de las CM del grupo C ya mostró el desarrollo de las prolongaciones dendríticas más distales, las cuales continuaron ausentes en el grupo D. La frecuencia de aparición de las dendritas del primero al cuarto orden se incrementó en esta edad en ambos grupos sin que aparecieran las dendritas del quinto al séptimo orden en el grupo D como fue el caso para el grupo C. En esta edad, comenzó a verse una estabilidad en la frecuencia de aparición de las dendritas del tercero y cuarto orden. El grupo D mostró una menor frecuencia en las prolongaciones dendríticas a partir del tercer orden respecto al grupo C.



Gráfica 16. Órdenes dendríticos a los catorce días posnatales. En esta edad en el grupo D las dendritas del sexto y séptimo orden no se han desarrollado. Hay una reducción de las frecuencias en el grupo D a partir del tercer orden, prueba *post hoc* de Tukey, * $p < 0.001$.

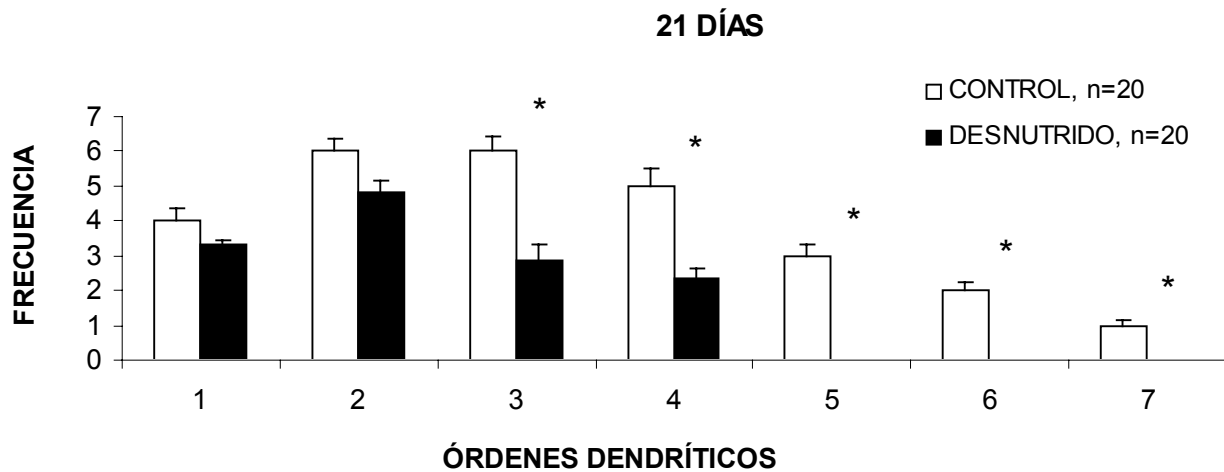
En la Figura 27 se muestran dibujos de CM a los 14 días. La complejidad de las ramas dendríticas se extendió lateralmente.



Figura 27. Dibujos en cámara lúcida de células mitrales de ratas a los catorce días de edad. Arriba CM de rata control; abajo CM de rata desnutrida. Las proyecciones dendríticas de las CM en el grupo D fueron menores que el grupo C. Las observaciones se realizaron con el objetivo de 10X. La barra de calibración indica una medida de 10 micras.

Finalmente, a los 21 días (Gráfica 17) el orden dendrítico del grupo C mostró una frecuencia de aparición de las prolongaciones dendríticas en una distribución normal, esto es, tanto las dendritas con menor complejidad de ramificación como aquellas con mayor complejidad se colocaron en los extremos de la curva. El grupo D mostró la misma distribución que a la edad de 14 días, con una menor frecuencia de aparición de dendritas del tercer orden respecto al grupo C, grupo que mostró un aumento en la frecuencia de aparición de dendritas en todos los órdenes. El grupo D siguió sin mostrar la presencia de

las ramas dendríticas del quinto, sexto y séptimo orden, lo cual indica que la complejidad de las ramas fue uno de los parámetros que más se afectó por la desnutrición en el día 21 posnatal.



Gráfica 17. Órdenes dendríticos a los veintiún días de edad. El grupo D mostró una menor complejidad de las ramas dendríticas porque disminuyó la frecuencia de aparición de los órdenes más complejos a partir del tercer orden, * $p < 0.001$.

A los 21 días se observó la formación de un penacho conformado por dendritas secundarias de las CM, las cuales provienen de la dendrita apical. Estas dendritas secundarias conforman el neurópilo del glomérulo olfatorio el cual se orienta hacia la capa glomerular. Figura 28.

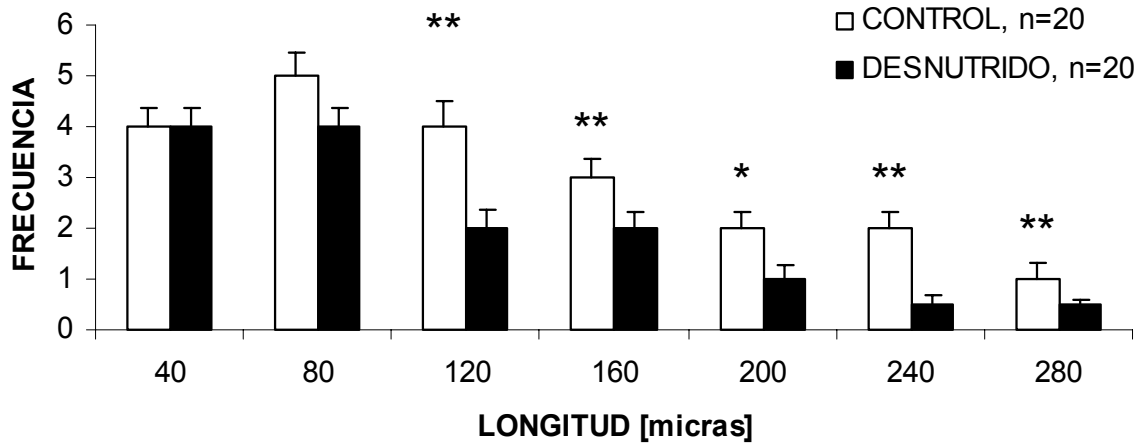


Figura 28. Dibujos en cámara lúcida de células mitrales de ratas a los veintidós días de edad. Arriba CM de rata control; abajo CM de rata desnutrida. Las células se observaron con el objetivo de 10X. La barra de calibración muestra 10 micras.

d. Longitud dendrítica

La longitud de las ramas dendríticas se evaluó por el método de Sholl, el cual consiste en medir la longitud de las dendritas a partir de círculos concéntricos equidistantes entre sí por una distancia de 40 μm . La estadística no mostró diferencias significativas en los círculos uno y dos (longitud de 40 y 80 μm , respectivamente) por efecto del grupo. Fue a partir del círculo tres al siete que se obtuvieron diferencias entre los grupos con una menor longitud en el grupo D, círculo tres ó 120 μm , $F(1,38) = 9.78$, $p < 0.01$, círculo cuatro ó 160 μm , $F(1,38) = 8.45$, $p < 0.01$, círculo cinco ó 200 μm , $F(1,38) = 4.98$, $p < 0.05$, círculo seis ó 240 μm , $F(1,38) = 11.12$, $p < 0.01$ y círculo siete ó 280 μm , $F(1,38) = 9.93$, $p < 0.01$. Las diferencias obtenidas por una prueba *post hoc* indicaron que a los 7 días a partir del tercer círculo disminuyeron la longitud de las ramas en el grupo D respecto al grupo C (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$.), esto es a partir de los 120 μm (Gráficas 18 y 19).

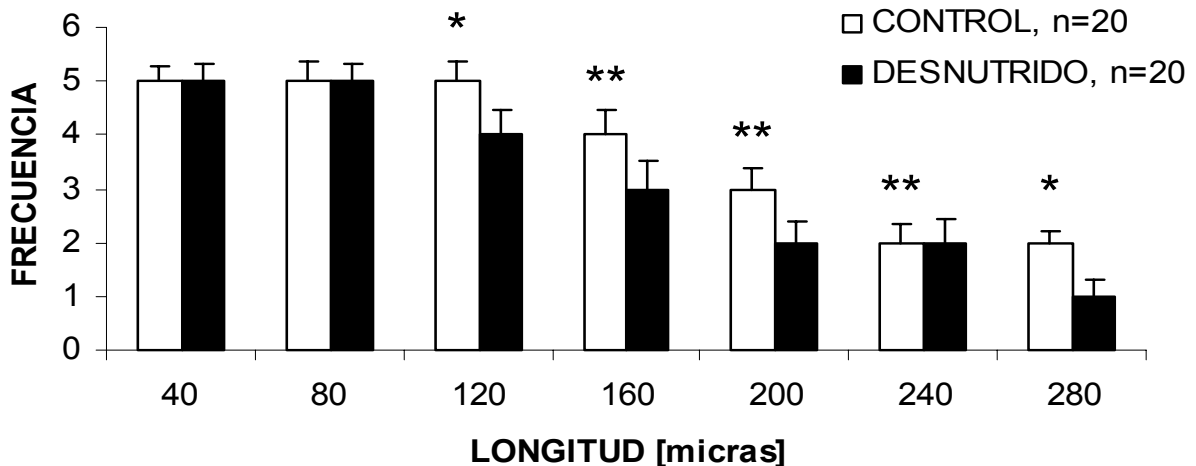
LONGITUD DENDRÍTICA, 7 DÍAS



Gráfica 18. Longitud dendrítica de las CM a los siete días. El grupo D muestra una disminución de esta longitud a partir de los 120 μm , prueba de *post hoc* de Tukey, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$. La $n = 20$ indica el número de células evaluadas para cada grupo y edad.

A los 14 días se observó un comportamiento similar al de los 7 días, en donde el grupo D mostró una menor longitud de las dendritas a partir de los 120 μm , excepto en la longitud de los 240 μm . Gráfica 19.

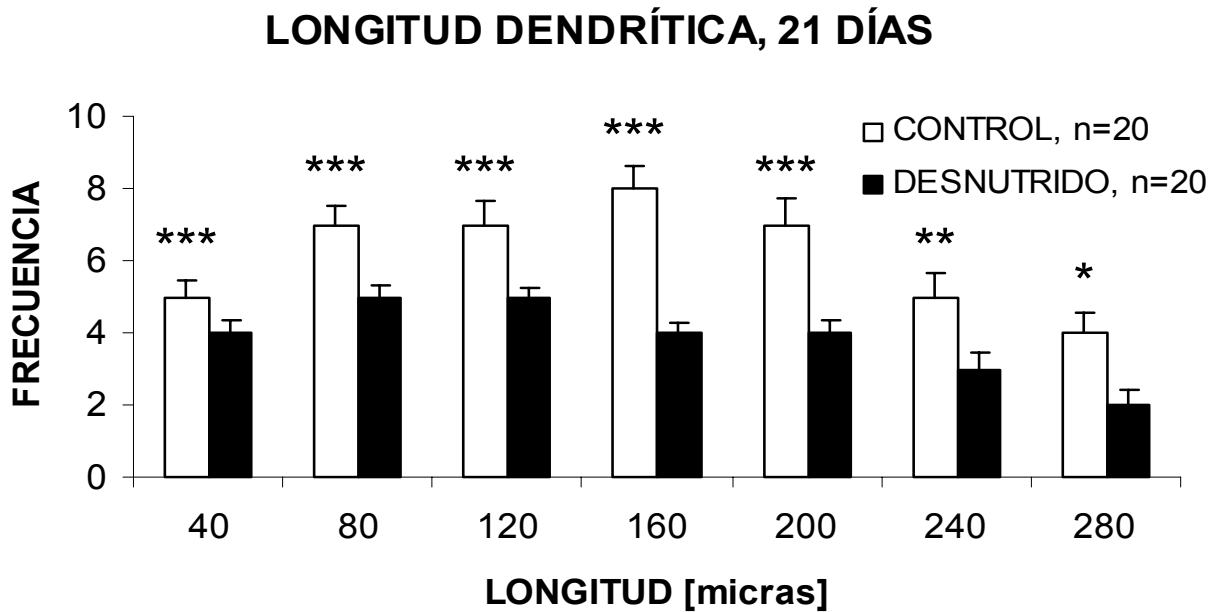
LONGITUD DENDRÍTICA, 14 DÍAS



Gráfica 19. Longitud dendrítica de las CM a los catorce días posnatales. El grupo D muestra una menor longitud a partir de las 120 μm , sin diferencias a las 240 μm , ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$.

La disminución de la longitud dendrítica en el grupo D fue más generalizada a los 21 días de edad ya que la diferencia entre los grupos se produjo a partir del primer nivel de

evaluación o del círculo que representa las 40 micras hasta el séptimo o correspondiente a las 280 micras. Gráfica 20.



Gráfica 20. Longitud de las dendritas a los veintiún días. En el grupo D fue menor la longitud de las ramas dendríticas de las CM en todos los círculos evaluados. La elongación predominante de las dendritas en el grupo C fue de 160 μm a partir del soma, mientras que la longitud dendrítica predominante en el grupo D fue de 80 a 120 μm . *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$.

La longitud de las prolongaciones dendríticas junto con la complejidad de la ramificación dendrítica de las CM fueron los parámetros que más variaron posnatalmente por efecto de la desnutrición. De manera cualitativa se observó que la disposición de las ramas organizadas espacialmente en la capa plexiforme externa se altera, aunque esta evaluación no se realizó formalmente con algún parámetro de ángulo que pudiera permitir comprobar esta aseveración. A continuación se muestran dos fotomicrografías de las CM en el grupo C y D en donde se muestran las dendritas apicales con las dendritas secundarias que participan en la formación del GO. Figura 29.

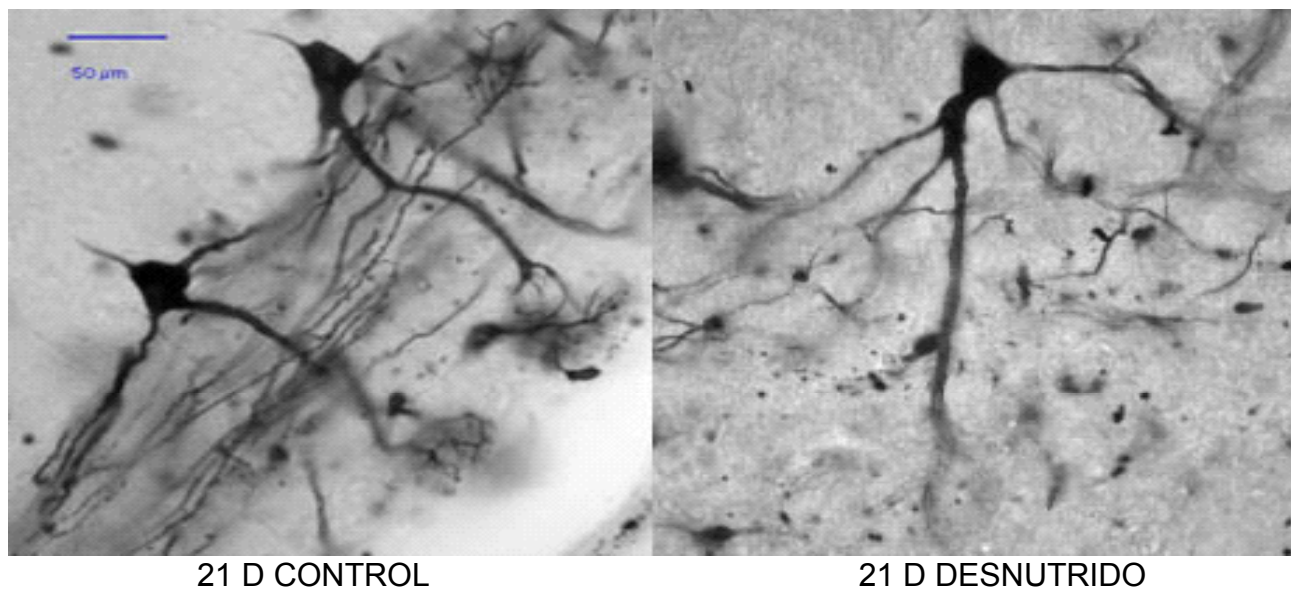
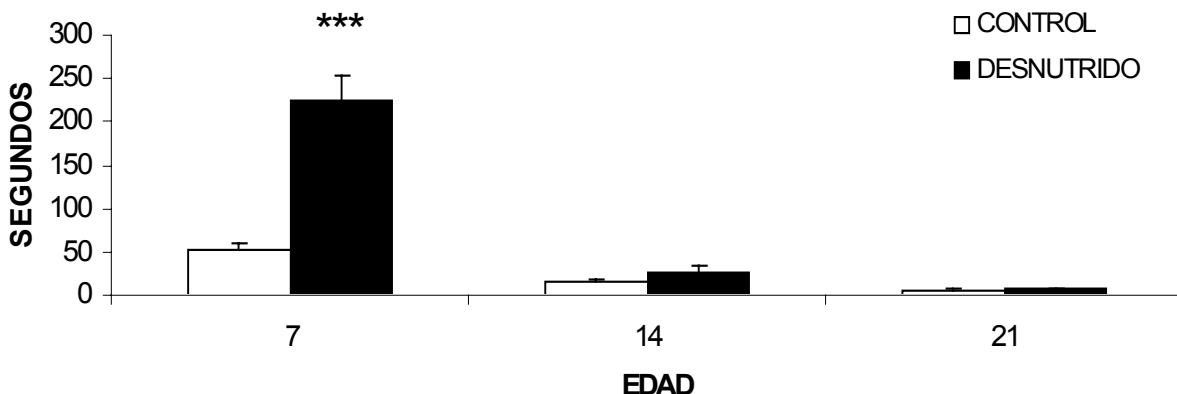


Figura 29. Fotomicrografías de CM a los veintiún días posnatales. Nótese que las dendritas apicales primarias del grupo C fueron más profundas que en el grupo D. La orientación de la dendrita apical en el grupo D fue más lateral, respecto a la posición perpendicular en el grupo C en esta edad. La valoración formal del ángulo de la posición de las dendritas podría ser utilizada como variable indicativa de la madurez en las CM. La barra de calibración representa 50 μ m.

E. Pruebas conductuales de discriminación olfatoria

Los resultados mostraron diferencias en la latencia de acercamiento al aserrín del nido de la madre por efecto de la condición nutricia $F(1,24) = 11.92, p < 0.01$, la edad $F(2,48) = 17.08, p < 0.0001$ y la interacción entre ambas variables, $F(2, 48) = 11.17, p < 0.0001$. La prueba *post hoc* mostró diferencias entre los grupos en el día 7, ($p < 0.0001$) siendo mayor el tiempo que invirtieron las crías desnutridas en llegar al aserrín del nido de la madre. Gráfica 21.

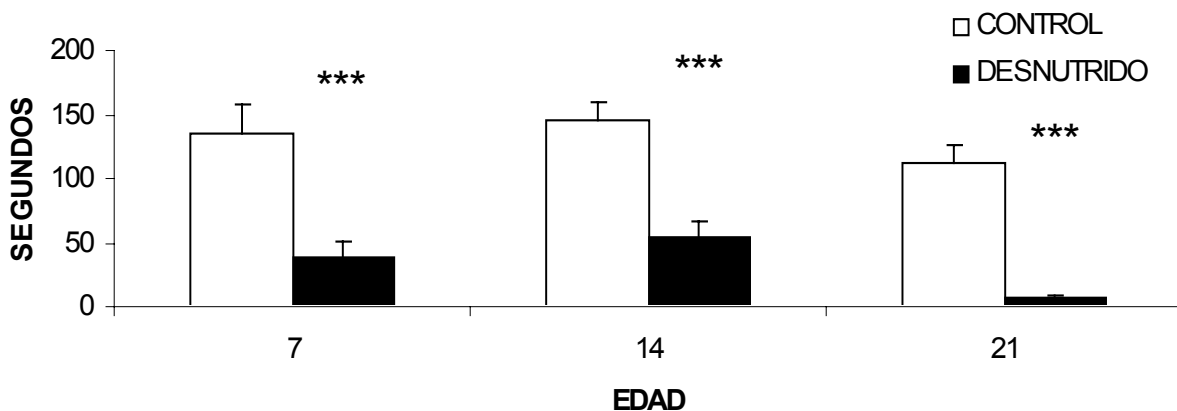
LATENCIA DE ACERCAMIENTO AL ASERRÍN MATERNO



Gráfica 21. Latencia de llegada al aserrín del nido materno. Las crías desnutridas tardaron más tiempo en llegar a este estímulo, $p < 0.001$.

La variable permanencia en el aserrín del nido proveniente de la madre mostró diferencias por efecto del grupo $F(1,14) = 45.57$, $p < 0.0001$. Las pruebas *post hoc* demostraron que en las tres edades la permanencia de los animales desnutridos sobre el aserrín del nido de la madre fue significativamente menor respecto a la permanencia en este tipo de aserrín en los animales control ($p < 0.0001$). Gráfica 22.

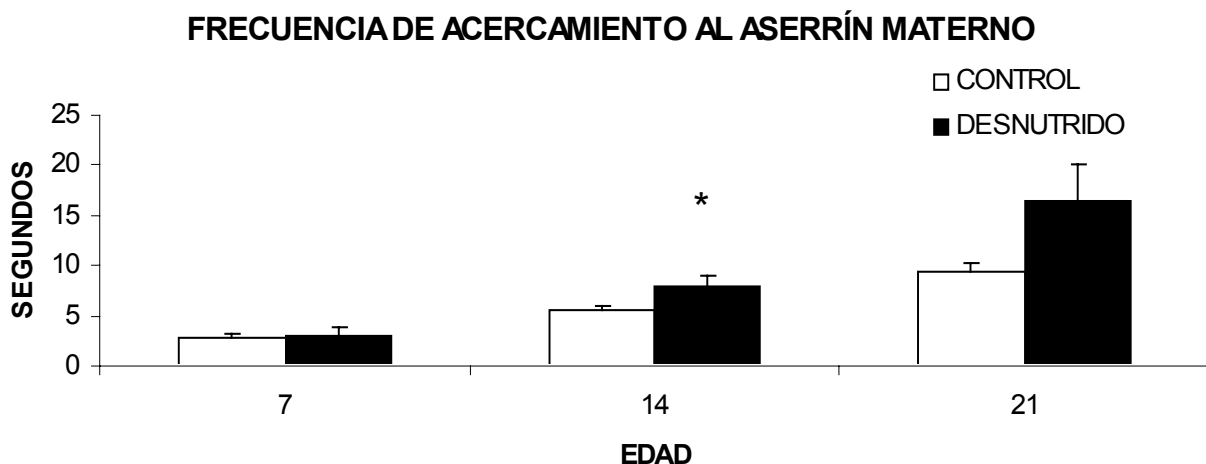
PERMANENCIA EN ASERRÍN MATERNO



Gráfica 22. Permanencia sobre el aserrín del nido de la madre. En los animales desnutridos fue significativamente menor respecto al grupo C, $***p < 0.0001$. La permanencia de acercamiento al aserrín materno en el grupo C fue relativamente constante en las tres edades.

Finalmente, en lo que se refiere a la variable de frecuencia de acercamiento al aserrín del nido proveniente de la madre se encontraron diferencias significativas por

efecto de la dieta $F(1,14) = 8.67$, $p < 0.01$ y la edad $F(2, 28) = 12.19$, $p < 0.0001$, sin encontrarse diferencias en la interacción entre ambas variables. La prueba *post hoc* de Tukey mostró un aumento en la frecuencia de acercamiento al aserrín del nido materno en el grupo D respecto al grupo C en el día 14 ($p < 0.05$), con una tendencia similar el día 21 ($p = 0.08$). Gráfica 23.



Gráfica 23. Frecuencia de acercamiento al aserrín del nido de la madre. Las crías desnutridas se acercaron de manera más frecuente a este tipo de aserrín respecto al grupo C en el día 14, * $p < 0.05$. Nótese que en ambos grupos la frecuencia aumenta con la edad lo cual se debe probablemente a su mayor capacidad motriz.

La frecuencia de acercamiento al aserrín limpio no mostró diferencias entre los grupos con diferente dieta.

DISCUSIÓN

Valoración física de los animales

La disminución significativa del peso corporal y cerebral, de la longitud del cuerpo, así como del retraso de la apertura palpebral y de los meatos auditivos externos observados en este estudio, confirman que este y otros paradigmas de desnutrición perinatal son efectivos al obtener una ganancia de peso disminuída de hasta un 10 ó 60 % respecto a un grupo bien alimentado, porcentaje que varía de acuerdo al tiempo de evaluación de la carencia nutricia (Pérez Torrero *et al.*, 2001; Barragán-Mejía *et al.*, 2002; Alipi, 2002; Rubio *et al.*, 2004). En lo que se refiere a la valoración del peso cerebral, el grupo mostró una disminución del 15 al 20% en el grupo D respecto al grupo C, lo cual coincide con los resultados de Singh y Shankar (1999) quienes encontraron una

disminución entre un 10 y 29% en los días 12 a 25, con una reducción del peso de la corteza entre el 15 y el 30% en otro paradigma de desnutrición. El detrimento en la talla y el peso de los animales del día 7 al 21 sugiere que este intervalo constituye un periodo crítico. De trabajos previos se sabe que animales rehabilitados del día 21 al 40 posnatal, no muestran un reestablecimiento del peso, aunque ya llega a ser muy cercano al peso de los animales control (Wilson et al., 1988; Rubio et al., 2004).

La diferencia observada entre la disminución del peso corporal y el peso cerebral en los animales evaluados en este trabajo, sugiere que por efecto de la desnutrición, el cerebro pierde menos peso en términos proporcionales respecto al cuerpo. Esto se verificó con la obtención de la relación alométrica del peso cerebral/peso corporal que efectivamente existió entre ambas variables. Esta diferencia probablemente se deba a un mecanismo metabólico que privilegie al cerebro. Dobbing (1970) y Morgane y cols. (1993) se refieren también a este órgano como privilegiado aún cuando hay carencia de nutrientes en todo el sistema.

Las alteraciones metabólicas son factores que contribuyen a la deficiencia de la ganancia de peso en el grupo D. Estas alteraciones metabólicas inciden en la función de factores de crecimiento, proteínas funcionales y estructurales que contribuyen a la formación de células y tejidos que constituyen la masa muscular y ósea. En el caso humano se sabe que la desnutrición calórico-proteica y la disminución de oligoelementos como el ácido fólico, zinc, cobre, cromo y hierro son factores causales de la disminución de talla y trastornos del SNC y periférico dependiendo del tiempo de evolución de la enfermedad. (Coello-Ramírez, 1996; Beard, 2003).

En relación al retraso de la maduración de los canales sensoriales como la vista y la audición los resultados de este trabajo muestran una relación con la disminución del peso corporal y cerebral en los animales desnutridos, lo cual sugiere que el desarrollo se ve afectado en varios niveles. El desarrollo físico regularmente va acompañado de un desarrollo funcional, que en este caso es a nivel somatosensorial, por lo que podría esperarse que por efecto de la desnutrición, pudiera existir un atraso en la maduración de

las vías sensoriales. Estas deficiencias pudieran ser causal de alteraciones en la interacción de la madre con su cría, tales como el reconocimiento auditivo por los patrones de vocalización, alteraciones en el sistema visual, la locomoción y en conductas de más complejidad como el juego, aspectos indispensables en el desarrollo y la sobrevivencia de los animales en una etapa en la cual aún dependen del cuidado materno cuyas repercusiones podrían darse a largo plazo, como el empobrecimiento del cuidado materno *a posteriori* en las hembras desnutridas adultas, (Salas et al., 1984; Salas et al., 1991; Loranca et al., 1999; Alvarado, 2003; Tonkiss et al., 2003).

En cuanto a la apertura errática de los meatos auditivos y de los párpados en los animales desnutridos, se evidencia una heterocronía en la maduración de estos sistemas sensoriales que podrían ser pocos favorables para la cría en este periodo de dependencia materna si son deficientes funcionalmente. La apertura de las estructuras en el caso de los animales D, en algunos casos previamente al grupo C no descartarían la presencia de procesos de compensación (“catch-up”) en respuesta a la carencia nutricional como se ha observado en otros trabajos, procesos que aunque físicamente representan un adelanto, funcionalmente, no necesariamente representan una ventaja (Hermanussen *et al.*, 1996; Oreffo *et al.*, 2003; Sant'Anna y Mortola, 2003.). Se sabe que la lactancia en la rata (día 1 al 23 posnatal) es un periodo crítico en el desarrollo del encéfalo, principalmente en el cerebro, porque durante esta etapa se observa un rápido crecimiento celular, “growth spurt”, asociado con el proceso de la mielinización de los axones, la multiplicación de la glía y la sinaptogénesis, de ahí la vulnerabilidad del tejido nervioso y la respuesta a deficiencias alimentarias en etapas tempranas capaces de activar estos mecanismos compensadores aunque no sostenidos por un largo periodo, sino puntuales, incluso un principio teratológico menciona la mayor posibilidad de daño en el organismo cuando el sistema se encuentra en su mayor periodo de desarrollo y plasticidad, de ahí que la desnutrición y su interferencia con el desarrollo de sistemas somatosensoriales, células y procesos dendríticos a nivel cortical pudieran estar asociados a esta inmadurez sensorial con un posible correlato funcional (Dobbing, 1970).

Área del BO

La disminución del área del BO en los animales desnutridos mostró una reducción del 30% respecto al grupo control a los 7 días posnatales, y de 10% a los 14 días, resultados que se asocian a la disminución del peso cerebral. El desarrollo del BO es paulatino y de acuerdo con los datos, se estabiliza en el día 21 posnatal, etapa en la cual varios de los sistemas neurales han madurado cercanamente a su estado adulto. Aunque en este trabajo no se pesaron los BOs se sabe que en animales malnutridos por deficiencia de caseína hay una disminución del peso de los BOs cercana a un 28% a los 21 días posnatales (Math y Davrainville, 1980). La disminución del área del BO forzosamente nos lleva a inferir que sus componentes se verán afectados al menos en su organización para poder estar contenidos en un menor espacio, por lo que en primera instancia se espera una alteración en las capas celulares que lo conforman y posteriormente en sus componentes celulares.

Capas celulares

El desarrollo de las capas que conforman el BO evidencia el desarrollo y maduración del tejido nervioso. De manera general las capas de la corteza del BO mostraron una disminución de su área respecto del área del BO en el día veintiuno posnatal. Este resultado sugiere que la desnutrición fue efectiva en una etapa en la cual se considera que el sistema ha alcanzado un estado más maduro, también sugiere que esta edad puede ser considerada un periodo crítico en la organización de las capas que constituyen el BO y que el efecto de la desnutrición podría mantenerse a un plazo mayor durante la organización del BO con un posible correlato funcional. Se sabe que durante la lactancia, esto es, en las primeras tres semanas posnatales, los principales tipos celulares que se originaron prenatalmente crecen y continúan su maduración morfológica y funcional en tanto que los animales desnutridos muestran una heterocronía funcional en algunos de sus componentes de ahí que se infieran alteraciones celulares como causales del deficiente desarrollo de las capas (Salas et al., 1969; Math y Davrainville, 1980; Almlí et al., 1985; Kishi, 1987; Royet et al., 1988; Bayer y Altman 2004).

En cuanto al aumento del índice de la relación en la CCM en el grupo D a los siete días, parece ser paradójico, en cuanto a la hipótesis, la cual sugiere una disminución del área de las capas. Sin embargo, este resultado podría evidenciar una heterocronía característica del grupo D en la cual algunos componentes aparentemente maduran o crecen antes, sin llegar a rebasar los valores del grupo C, en la madurez, lo cual podría ser una evidencia de la compensación del sistema. Este valor podría ser reflejo del aumento del soma en el área y perímetro de las CM en el día 14. Sin embargo, cabe destacar que esta capa aunque está compuesta principalmente por los somas de las CM, también está constituida por glía, pudiendo ser otro factor que participe en esta anomalía. Sobre el fenómeno de compensación “catch-up”, hay evidencias de este fenómeno en el peso corporal o en el aumento transitorio del tamaño de los órganos, incluyendo el cerebro, fenómeno que va asociado con diferencias en el contenido de proteínas y DNA, así como un aumento en el consumo de oxígeno que pudiera ser producto del aumento metabólico. Tal vez con base en estos antecedentes podría explicarse el por qué de los resultados paradójicos obtenidos en etapas inmaduras, previas al destete en el BO (Sant'Anna y Mortola, 2003; Buyukgebiz *et al.*, 2004).

La CPE está conformada básicamente por las prolongaciones dendríticas de las CM y las CP, las primeras, como se observó en los resultados, mostraron una disminución de la complejidad y de la longitud de las ramificaciones dendríticas lo cual podría asociarse a la disminución del área de esta capa. Los antecedentes muestran que las células granulares se originan y proliferan posnatalmente, por lo que este modelo de desnutrición podría incidir negativamente en el desarrollo de estas células y la actividad inhibitoria que ejerce hacia las células adyacentes a las cuales modula, CM y CP. La implicación de los resultados obtenidos en esta capa en particular, se asocia a la formación de los GOs ya que esta capa está constituida por las dendritas de las CM que contribuyen con la orientación de su soma y las ramificaciones dendríticas, tanto apicales como de segundo orden en la formación del neuropilo de los GOs (Shipley, 1995; Malun y Brunjes, 1996; Bailey *et al.*, 1999).

En lo que se refiere a los resultados de la evaluación de la CCG es notable observar que la variación del índice se produjo en el día 21 en el grupo D con una disminución del área. Se sabe que en el día de nacimiento, cerca del 24% de la población

total de las CG se ha originado, pero es en el día quince al dieciocho cuando se presenta el máximo pico de proliferación, el cual continúa hasta el día treinta posnatal, etapa después de la cual decae (Bayer, 1983; Bailey *et al.*, 1999; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002), (Figura 5). Lo anterior podría sugerir que debido a que las CG proliferan tardíamente en concordancia con el efecto de la desnutrición posnatal, podría esperarse que la CCG muestre un desarrollo deficiente debido a la naturaleza neurogénica de las células que la constituyen, así, el día veintiuno representa un período crítico en el desarrollo de las células y por tanto de la capa. Antecedentes funcionales de otros trabajos indican que por efecto de la malnutrición se produce una menor tasa de migración de células provenientes del flujo migratorio rostral y de la zona subventricular al BO, que podrían dar origen a un decremento del número de las CGs y sus dendritas, pudiendo reducir transitoriamente el volumen de la capa interna de las células granulares del BO (Almli *et al.*, 1985). Por ello los resultados encontrados en este trabajo sugieren que los efectos observados podrían tener repercusiones en una etapa posterior a la observada por el retraso diferido en su desarrollo. Asimismo, se esperaría que por efecto de las deficiencias nutricias en el periodo crítico de proliferación pudiera alterarse el establecimiento de la sinaptogénesis de las CG con las CM y CP, ya que las CGs participan como interneuronas inhibitorias que modulan la actividad de las células de segundo orden. Así, el envío de la señal olfatoria en la segunda sinapsis del BO, por efecto de la malnutrición se podría retrasar en la maduración de la actividad eléctrica y el proceso de inhibición lateral retroactiva que se establece con las CM, las cuales a su vez estimulan a las CG que regulan su actividad de disparo como lo sugieren los trabajos de Almli y cols. (1985). Además las alteraciones en la inhibición, el daño podría ejercerse hacia el dominio de la capa glomerular ya que las dendritas varicosas de las CG se relacionan con esa capa topográficamente, pudiendo incidir funcionalmente (Hamilton *et al.*, 2005).

Número de los GOs

El análisis de los resultados del número de los GOs entre los grupos no mostró diferencias por efecto de la edad, lo cual sugiere que en los grupos C y D los GOs ya se formaron prácticamente, aunque su desarrollo continúa por la inserción de diferentes componentes y su organización en las primeras tres semanas posnatales (Malun y

Brunjes, 1996; Bailey et al., 1999). La maduración de las prolongaciones dendríticas de las CM, como se mencionó anteriormente, es relevante en la formación y desarrollo de los GOs. La literatura indica que en el día quince hay un proceso de retracción y estabilización de las dendritas distales de las CM las cuales conforman el neurópilo del GO, pero es precisamente en esta etapa, que los resultados de este trabajo muestran de manera persistente una asincronía en la generación y maduración de las prolongaciones dendríticas en los animales desnutridos. Aunque se sabe de trabajos previos que la formación de los GOs se produce antes del parto con la formación de una cápsula de glía y astrocitos en forma de “cuña”, formando protoglomerulos, la maduración y adición de otros de sus componentes se produce posnatalmente, así con base en las observaciones derivadas de este trabajo y las evidencias de otros autores se verifica que la cápsula glomerular que conforma al GO ya existe antes del día siete posnatal y continúa posnatalmente (Royet *et al*, 1988; Malun y Brunjes, 1996). De la literatura se sabe que cerca del 100% de los GOs se han generado en el día catorce posnatal, cuando las NORs y las CM se han integrado al GO y continúan su desarrollo en los días posnatales, veintiuno al veinticuatro (Malun y Brunjes, 1996), en tanto que Lamantia y cols. (1992) muestran que los GOs se forman gradualmente las primeras semanas posnatales y su población es cercana al 70% en el intervalo de las 2 a las 3 semanas posnatales, edades que coinciden en la maduración de la mayoría de las células que se han generado, migrado y ocupado sus posiciones laminares apropiadas en el BO. De cualquier modo, estos resultados concuerdan en que las edades críticas, en la conformación del GO y su desarrollo se extiende posnatalmente en las edades estudiadas en este trabajo y nos aportan un indicio de los factores que contribuyen a su formación y probablemente se ven modificados por efecto de la desnutrición aunque no hayan sido valorados en este trabajo, tales como la inserción de las NORs al GO que también pudo haber sido tardía.

Evaluación de los GOs por regiones

La valoración del número y el tamaño de los GOs por regiones en el BO: región dorsal medial (DM), dorsal lateral (DL), ventral medial (VM) y ventral lateral (VL) en la porción media del bulbo olfatorio (1450 ± 150) en cortes coronales, surgió del interés por determinar si existe un sustrato anatómico que pudiera aportar indicios sobre la actividad y el funcionamiento modular de los glomerulos en áreas específicas del BO durante el

desarrollo aún cuando en este trabajo no se hizo una valoración funcional. Uchida y colaboradores (2000), Uchida y Mainen (2003) así como Guthrie y Gall (2003) han realizado una valoración de la actividad glomerular en las porciones rostrales y caudales de la región dorsal del BO, observando actividad glomerular distribuída por regiones a una exposición a distintos estímulos olfatorios. Por ello, con base en los resultados de esos autores, podría sugerirse que las evaluaciones funcionales de los GOS por regiones podrían ser producto de la diferencia del gradiente de la densidad glomerular.

Los resultados en el número de GOs en el grupo C mostraron un patrón de aparición primaria en las regiones mediales, tanto dorsales como ventrales, pero fue en la región lateral que se atrasó el desarrollo de los GOs al menos en los días 7 y 14 de edad. En cuanto al grupo D, el patrón de la aparición del número de los GOs fue similar al del grupo C, excepto que hubo un retraso en el tiempo en la región DL (Gráfica 10). Este resultado sugiere que esta región puede ser la más susceptible al desarrollo de los componentes celulares de los GOs por efecto de la desnutrición. De datos de la literatura, se sabe que la formación de los GOs está condicionado por factores periféricos relacionados con el contacto que hacen los axones de las NORs con el GO, las proyecciones dendríticas apicales de las CM y las dendritas secundarias que conforman el GO, así como la proliferación de la glía en el neurópilo que convergen en este estadio del desarrollo. Los resultados sugieren que la anacronía en estos eventos podría darse por efecto de la desnutrición (Graziadei y Monti-Graziadei, 1986; Royet *et al.* 1988; Malun y Brunjes, 1996; Bailey *et al.*, 1999).

La diferencia entre los grupos en el número de GOs en las diferentes regiones del BO, evidenció que la desnutrición incide en la organización topográfica de estas estructuras. Se obtuvo que el número de GOs por región, aumentó en el grupo D en el día 7 y disminuyó en el día 14 en la región VL. El aumento en el día 7, se sugiere se debe a un posible fenómeno de compensación, en contraposición a la disminución en el día 14 en el grupo D, debido a un retraso en la inserción de los componentes de este complejo celular. Los resultados de este trabajo muestran que las diferencias por regiones se producen en estas 3 semanas posnatales cuando la proliferación de los GOS es mayor, se agrupan, aumentan en número y complejidad, engrosando la capa glomerular con variaciones en el grupo C, por lo que es de esperar cambios aún más drásticos en el

grupo D (Roselli-Austin y Altman, 1979; Friedman y Price, 1984; Brunjes y Frazier, 1986). De acuerdo con los estudios de Royet, los primeros GOs aparecen en la porción lateral del bulbo rostral, después en el área ventral, que va de la porción media a la posterior (Royet *et al.*, 1988; Bailey *et al.*, 1999), (Figura 8). Finalmente, es en la parte dorsal donde aparecen los últimos GOs, de ahí que es factible encontrar la formación de nuevos glomérulos en la región más distal del BO en etapas tardías creándose un gradiente espacial en la morfogénesis glomerular que parece organizarse en una forma simultánea a lo largo de los planos radiales y sagitales dentro de la simetría del BO (Royet *et al.*, 1988; LaMantia *et al.*, 1992; Bailey, 1999).

En cuanto a la apariencia macroscópica de los GOs, en este trabajo se observó que tanto los animales control como los desnutridos y de manera preponderante en este último grupo, los GOs mostraron una apariencia poco nítida de los bordes a los siete días posnatales. Es probable que esta apariencia coincida con la génesis y proliferación de las CPg que los circunscriben, interneuronas cuya neurogénesis se produce a partir del nacimiento y proliferan en las tres semanas posnatales, al igual que las CGs (Bailey *et al.*, 1999), (Figura 5). En este mismo sentido debe considerarse el ingreso de las dendritas de las CM que conforman el neurópilo del GO, que en este periodo comúnmente se restringen a un solo GO y que es precisamente en el grupo desnutrido donde se observa un desarrollo dendrítico limitado de las CM en las tres semanas posnatales como se obtuvo en los resultados y se discutirá más adelante.

De manera general los resultados indican que la región del BO medio con un desarrollo tardío en el grupo C, fue la porción ventral, en tanto que en el grupo D la región que mostró retraso en el desarrollo, fue la región dorsal, ambos casos coinciden en la porción lateral, lo cual indica que la porción medial en las distintas edades en ambos grupos sugiere que esta región es la que muestra mayor consistencia en el BO y se estabiliza tempranamente acorde con la curva de aparición del número de los GOs.

Longitud mayor y área de los GOs

En cuanto a los parámetros morfométricos, los resultados de este trabajo mostraron que la longitud de los GOs fue significativamente menor en el grupo D respecto al grupo C

en periodos críticos (7 y 14 días), y que los resultados de estos parámetros en ambos grupos mostraron una longitud significativamente menor respecto a los datos obtenidos en trabajos previos (Meisami y Safari, 1981; Pomeroy et al., 1990; Shipley y Ennis, 1995; Bailey et al., 1999). Es muy probable que esta diferencia se deba a que las mediciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo en animales muy jóvenes, en tanto que la mayoría de los trabajos previos se obtuvo de animales adultos. De este modo los resultados derivados de este trabajo, indican que el desarrollo es un factor importante en el tamaño de las estructuras.

Las alteraciones en los parámetros de medición de los GOs en las distintas regiones del BO parecen estar asociadas al desarrollo deficiente de las prolongaciones dendríticas de las células de segundo orden, CM, que contribuyen a la formación del neurópilo del GO, aspecto que también parece intervenir en el área de la capa de las CM como consecuencia de las deficiencias producidas por la desnutrición en la organización del BO y de la orientación de estas dendritas en las capas del BO. Existe también la posibilidad de que otros componentes y procesos que conforman a los GOs, no evaluados en este trabajo, pudieran contribuir a este resultado por efecto de la restricción de alimento, debido a que se encuentran también en periodo de desarrollo, tales como las células CPg y la proliferación de la glía (Royet et al., 1988).

Los resultados mostraron que los GOs más pequeños en el grupo D fueron aquellos ubicados en la región medial, tanto dorsal como ventralmente, área que como se discutió anteriormente, es la que se consolida antes, sin embargo estos resultados muestran que en el día 14 posnatal el efecto es más notable. Este y otros resultados, de manera persistente, indican que esta edad es una de las más atrasadas en el desarrollo de varias estructuras del BO en este trabajo y que se trata de un periodo crítico en el desarrollo del BO y sus componentes. Las alteraciones de las dimensiones de los GOs en las diferentes regiones ofrecen una perspectiva funcional interesante, ya que estas modificaciones estructurales debidas a la desnutrición además de sugerir un efecto en el desarrollo, pudieran tener implicaciones funcionales en la comunicación intrabulbar. Existe evidencia de la formación de circuitos locales como el formado por las CM y CP con las CG en la modulación de la información entrante por las NORs, regulada dentro del GO la cual es enviada al BO contralateral por las fibras que forman ambos tipos celulares en el núcleo

olfatorio anterior ipsilateral y contralateral (Figura 14). Hay asimismo la evidencia de la formación de un mapa simétrico de GOs homólogos en cada lado de los bulbos que responde simultáneamente al estímulo olfatorio, cuya actividad responde a una identidad del receptor olfatorio a determinado olor en ambos lados del BO (Marks y Belluscio, 614, 2005 SFN). Se sabe que los glomérulos isofuncionales en cada bulbo están ligados a través de un circuito recíproco intrabulbar mediado por células en penacho externas, las cuales reciben información de un glomérulo sobre un lado del BO al cual proyectan los axones de manera recíproca, de este modo los GOs contralaterales muestran un mapa funcional en espejo (Marks y Belluscio, 2005 SFN). También se sabe que gran parte de la información que se procesa en el BO posterior a la transducción de la señal en las NORs se procesa monofásicamente, esto es, de manera relativamente simple, pero la presencia de estos GOs isofuncionales en espejo sugieren un procesamiento en ambos pares del BO que implica la integración de la señal olfatoria, previamente a su llegada a la regiones sub y corticales (Lledó *et al.*, 2005).

Es factible que además del factor citoarquitectónico alterado en el grupo D, funcionalmente haya una alteración en la expresión de los neurotransmisores que participan en la actividad del GO, ya que durante esta etapa del desarrollo, la función de los NTs en los diferentes componentes celulares que conforman al GO se están consolidando y muestran un desarrollo similar al del estado adulto hasta los 24 días posnatales (Malun y Brunjes, 1996; Guthrie y Gall, 2003).

Funcionalmente durante el desarrollo, es de especial relevancia la sinaptogénesis en el BO en desarrollo, de ahí que en el siguiente apartado se evalúe una posible relación del desarrollo de prolongaciones dendríticas de las CM en este desarrollo morfo-funcional.

Células mitrales

La longitud mayor del soma de las CM entre los grupos no mostró diferencias entre los grupos, lo cual sugiere cierta consistencia de esta estructura a factores epigenéticos como la desnutrición. En el cuerpo celular se concentran los organelos, el citoesqueleto y la gran mayoría de las estructuras que permiten la supervivencia y el mantenimiento de la célula, por lo que es factible que este parámetro se vea menos afectado en función de la

neurogénesis y el desarrollo. La literatura muestra que las CM se originan en el día doce de la gestación proliferando en el día 15 de la gestación, por lo que en un principio podría esperarse que el impacto de la desnutrición posnatal no fuera severo debido a que se infligió posnatalmente, tal como se observa a nivel del soma, sin embargo, cuando se evaluó el perímetro y área del soma se encontraron diferencias por efecto de la edad y la interacción con la condición nutricia, observándose que el desarrollo de esta estructura efectivamente se alteró por la desnutrición con una predisposición a ser mayor en el grupo D el día 14 (Bayer, 1983 y Bailey et al., 1999). La disminución del área del soma en el grupo D en el día siete posnatal, es de esperarse, pero en el día catorce, el aumento del perímetro y área del soma en el grupo D previamente a su maduración, sugiere la presencia del fenómeno de compensación o “catch-up” durante el cual las células o el organismo (el sistema completo y algunos de sus componentes) se recuperan de la deficiencia de la desnutrición, transitoriamente, sin que por ello sobrepasen el valor del control adulto en la madurez como se observa en el grupo C el día 21 posnatal, edad en la cual ya no se distinguen diferencias en estos parámetros entre los grupos. Aunque no existe una evidencia de la disminución del número de las CM por efecto de la desnutrición no se descarta que el aumento del tamaño del soma de las CM en el grupo D, pudiera relacionarse con una reducción en su densidad en el BO, por lo que podría sugerirse que la hipertrofia de las CM pudiera ser un fenómeno compensatorio funcional y morfológico producido por la desnutrición. Por otra parte el posible efecto de compensación en el desarrollo del soma de las CM, coincide con la maduración de otros sistemas sensoriales, que pudieran estimular el desarrollo del sistema olfatorio en respuesta a un enriquecimiento ambiental, aunado a un posible cambio en la dieta de la madre presente en la caja de las crías.

Las CM participan en la formación del BO durante las primeras tres semanas posnatales, aunque se originan gestacionalmente. En el día catorce, se produce el contacto entre las NORs y las CM, mientras que en el día quince proliferan las dendritas secundarias, produciéndose así la conformación de los GOs. En el día quince hay evidencia de la retracción de las dendritas supernumerarias y es al día siguiente que la dendrita apical ya se ha agregado al GO (Panhuber *et al.*, 1985, 1987; Bailey et al., 1999). Las CM forman parte del glomérulo hasta el día 4 posnatal, de ahí que con la técnica de Golgi-Cox pocas CM sean observadas a los 7 días de edad (Malun y Brunjes, 1996).

En cuanto a la complejidad dendrítica en las CM, se obtuvo que el grupo de las crías desnutridas mostró un menor número de dendritas de mayor complejidad en las tres edades, en comparación con el grupo C, frecuencia que disminuyó a partir del tercer orden de complejidad dendrítica, efecto que fue más notable en las edades catorce y veintiuno posnatales. Tal vez podría esperarse que se ampliara la ventana de observación temporal, el desarrollo de las dendritas de las CM en edades más avanzadas pudiera verse compensado, sin embargo, la disminución de esta variable es uno de los datos más notables y consistentes por efecto de la desnutrición debido a que a la edad de veintiún días estas diferencias son más significativas en los seis órdenes dendríticos, cuyo efecto difícilmente podría revertirse en el transcurso de un tiempo mayor de maduración, aunque no es desdeñable la gran plasticidad que muestran estas estructuras en el BO.

Uno de los resultados más relevantes en este trabajo, es precisamente la variable longitud dendrítica de las CM. En esta variable se observó una disminución de la frecuencia en las dendritas más largas en el grupo desnutrido, persistente hasta los veintiún días de edad. Edad que muestra que estas estructuras son afectadas desde el primer nivel de evaluación o círculo que representa las 40 hasta las 280 micras. Adicionalmente a este resultado cuantitativo, de manera cualitativa se obtuvo que la disposición de la rama apical de las CM a los 21 días en el grupo D respecto al grupo C fue más perpendicular, lo cual probablemente evidencia un estado de inmadurez en la organización de las prolongaciones dendríticas dentro de las capas radiales del BO. La disminución de la longitud y complejidad dendrítica sugieren que la desnutrición es un factor limitante en la composición y organización de la capa de las CM, produciendo una menor área de esta capa y en el desarrollo del neurópilo que constituye el cuerpo del GO. Extrapolación que tal vez podría ser válida para los otros tipos celulares, en la conformación de las capas, de manera particular en las CG, las cuales proliferan tardíamente. Se ha observado en otras estructuras que la complejidad de las ramificaciones y la longitud de las prolongaciones dendríticas se modifican notablemente durante el desarrollo en una estructura relacionada con el procesamiento de la señal gustativa como en las células que conforman el núcleo del tracto solitario, estructura que forma parte de los sentidos químicos, altamente relacionado con el sistema olfatorio (Rubio et al., 2004).

La disminución de la complejidad de la ramificación y la longitud dendrítica de las CM en este trabajo sugiere que su participación en la formación del neuropilo de los GOs es relevante posnatalmente aunque estas células se originan gestacionalmente, pero cuyo desarrollo dendrogenético es posnatal, durante el cual incide la desnutrición. Trabajos previos muestran que el desarrollo crítico de las dendritas así como su disposición en la CCM es alrededor de los tres a los cinco días de edad, y en el día 7 las dendritas se dirigen e integran a un glomérulo para conformarse, de ahí que es factible, acorde con estos resultados que la maduración de los GOs, de las capas glomerular y CPE en el BO se vean diferidas en su formación o muestren trastornos morfológicos y funcionales debido al limitado desarrollo de las dendritas y su relación con el proceso de sinaptogénesis y comunicación intracelular en los animales desnutridos.

La formación de las dendritas secundarias distales constituye el neuropilo del GO. Estas dendritas participan fundamentalmente en la sinaptogénesis que establecen las NORs y las células Pg en la formación del GO proceso que se presenta en el día 21 de la gestación y continúa en la primera semana posnatal. Aunque en este trabajo no se evaluaron las dendritas secundarias de la dendrita apical de las CM las cuales forman un penacho se sugiere que pudieran presentar las mismas anomalías observadas en sus dendritas homólogas, tales como una menor longitud dendrítica secundaria y una circunscripción limitada lo cual podría limitar la relación sináptica proximal respecto a las células circundantes, en particular de las CPg que también son interneuronas moduladoras en las sinapsis con las CM al igual que en la relación de las dendritas laterales secundarias de las CM con las CGs (Kosaka y Kosaka, 2005). Por ello con base en este antecedente se podría esperar que funcionalmente las sinapsis que se establecen en este pequeño circuito pudieran modificarse debido al menor desarrollo de las dendritas secundarias. Estas alteraciones podrían modificar la función del circuito en el GO aunque una evaluación morfológica y funcional de estas dendritas es necesaria para corroborar esta aseveración.

La relevancia de los resultados obtenidos en este trabajo como la disminución de la complejidad dendrítica y la reducción de las prolongaciones dendríticas de las CM por efecto de la desnutrición radica en las posibles implicaciones funcionales como las

asociadas con el proceso de modulación de la señal y el proceso de inhibición que ejercen las células granulares sobre estas células y su correspondencia, pudiendo verse modificado el proceso de retroalimentación excitatorio-inhibitorio entre ambos tipos celulares (Math y Davrainville, 1980). Por otra parte debido a que el desarrollo de las células granulares se prolonga a etapas avanzadas posnatalmente, es de esperarse que la desnutrición hubiera incidido sobre su desarrollo morfológico y funcional, de ahí que funcionalmente se podría esperar limitación en su capacidad inhibitoria que se origina ontogénicamente posterior a la función excitatoria pudiendo afectarse, como lo sugieren los estudios de Math y Davrainville, la actividad eléctrica espontánea de las CM debido a la deficiente modulación de las sinapsis inhibitorias de las CG y su desarrollo tardío o ausente entre ellas en esta etapa del desarrollo, debido a la deficiencia en la formación de las sinapsis dentro-dendríticas entre ambos tipos celulares (Math y Davrainville, 1980; Tolley y Bedi, 1994). Estos resultados junto con la disminución de la complejidad dendrítica, indican que la estructura celular relacionada con la sinapsis pudiera tener efectos funcionales anómalos en la efectividad del relevo de la información de la señal odorífera que pasa a través de estos diferentes componentes celulares. Resultados previos sugieren que la restricción de alimento durante el desarrollo se asocia con una menor formación de microneuronas, CG aunque este aspecto es debatido (Math y Davrainville, 1980; Tolley y Bedi, 1994). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere que el crecimiento del neurópilo que constituye a los GOS, así como el número de sinapsis se verán reducidos o alterados en su organización por la disminución de la complejidad de las ramificaciones y el acortamiento de las dimensiones dendríticas. Funcionalmente, además de la posible alteración de la proporción de sinapsis, se sabe que la malnutrición altera los niveles de NTs involucrados en la sinapsis y la distribución que presentan durante el desempeño de las funciones en las cuales están implicados (Math y Davrainville, 1980). Existe evidencia de un retraso del desarrollo de las conductas guiadas olfatoriamente, en relación con las alteraciones en el desarrollo morfológico del BO (Ruiz, 2006). Lo cual podría sugerir que la alteración de la actividad espontánea de las CM en animales desnutridos, asociada a una posible ineficiencia en la capacidad de inhibición de las CGs podría pudiera ser un indicio de las alteraciones funcionales que pudieran producirse a nivel de la segunda sinapsis en el BO, pudiendo manifestarse como un impacto en la capacidad de respuesta en la discriminación olfatoria, al menos a este nivel (Math y Davrainville, 1980).

Finalmente, este trabajo muestra que la exposición a un factor epigenético como la desnutrición, impacta de manera generalizada en el organismo, alterando el desarrollo de las neuronas del BO y la morfología y densidad de los GOs. Resultados obtenidos con este y otros modelos de desnutrición muestran un retraso en la migración y desarrollo neuronal en otras áreas del cerebro, asociados con deficiencias en la formación de proteínas estructurales que conforman las neuronas y alteraciones en el metabolismo de los lípidos, pudiendo dar origen a alteraciones de la membrana celular. Existen además deficiencias en la formación de factores de crecimiento que regulan la maduración y mantenimiento neuronal (Bass et al., 1970; Neville y Chase, 1971; Cragg, 1972; Salas et al., 1974; Salas, 1980). Es factible que el aspecto metabólico esté asociado con la disminución de los procesos dendríticos debido a una posible alteración en la fosforilación de la membrana sináptica dependiente de la edad observada debido a la desnutrición, aunque la carencia de nutrientes de manera intuitiva induce a pensar en la carencia generalizada de aminoácidos esenciales, formadores de sillares estructurales indispensables en la formación de las proteínas estructurales de la célula (Singh y Shankar, 1999). Existen otros factores epigenéticos que modulan la morfometría de los GOs, tales como la estimulación olfatoria y táctil, así se ha observado que crías de rata entrenadas a un olor, muestran un aumento del tamaño de los GOs, los cuales protruyen a la CPE con cambios en diferentes regiones del BO cuyos cambios sugieren alteraciones en la morfología de algunos componentes del BO por estimulación táctil que podría llevarse a cabo por mediación de una vía noradrenérgica (Leon, 1992).

La reducción del tamaño de los GOs en las diferentes áreas y las alteraciones observadas en las prolongaciones dendríticas de las CM mostrados en este trabajo por efecto de la desnutrición, sugiere la implicación de una deficiencia funcional que pudiera verse reflejada en la capacidad de discriminación de los olores durante el desarrollo y la etapa adulta del organismo. Por ello es indispensable una evaluación conductual y electrofisiológica para determinar este efecto con mayor certeza.

Se conoce de trabajos anteriores que tanto para la cría como para la madre las excretas de la madre lactantes son atractivas porque contienen un contenido de cecotrófo, esto es, una mezcla de materia fecal con leche, lo cual constituye un estímulo natural

relevante tanto para la cría como para la madre que ocasionalmente lo reingiere (Leon, 1992).

Valoración conductual

En este trabajo los resultados derivados de las pruebas conductuales de discriminación olfatoria muestran algunos indicios sobre las posibles alteraciones funcionales. Así se observa que la latencia para llegar al aserrín del nido de la madre en los animales del grupo D sugiere que la cría es capaz de discriminar el olor aunque tarda más en llegar al aserrín del nido de la madre, lo cual podría deberse a que no percibe adecuadamente el olor del aserrín del nido de la madre o lo percibe débilmente, o debido a que su capacidad motriz es menor y por ello hay una mayor lentitud en intento para llegar, ya que la desnutrición se sabe que afecta vías piramidales, relacionadas con la función motora y el desarrollo muscular (Wilson *et al.*, 1988; Quirck *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 2004), una tercera opción pero menos probable podría ser que las crías no muestran interés marcado por este estímulo, sin embargo, de haber sido así, no se habría observado una orientación hacia al estímulo que indicara cierta motivación. Esta diferencia fue observable en el grupo D en la etapa más joven de las edades evaluadas, lo cual podría implicar que conforme avanza la edad hay un proceso de aprendizaje que se asocia a esta motivación y que se ve facilitado a una mayor edad ya no se observaron diferencias lo cual podría sugerir que la alteración podría ser atenuada por la experiencia.

En cuanto a la permanencia sobre el aserrín proveniente del nido materno. Se obtuvo que los animales desnutridos permanecieron durante menos tiempo sobre el aserrín del nido de la madre, lo cual sugiere dos aspectos: el primero, que efectivamente la cría tuvo una menor capacidad para detectar el olor del aserrín de la madre o que mostró menor interés por este estímulo, el segundo, podría sugerir la participación de un fenómeno de motivación que implicara que la cría no tiene interés por el aserrín del nido materno porque no encuentra una retribución por parte de la madre ya que tiene el conducto galactóforo ligado. Esta diferencia se mantuvo hasta el día 21 cuando persiste la dependencia alimentaria hacia la madre. Los resultados obtenidos sobre las alteraciones en las prolongaciones dendríticas de las CM mostraron que estas anomalías se mantuvieron hasta el día 21 posnatal. Se sabe de resultados electrofisiológicos obtenidos

en animales malnutridos, que la actividad espontánea se modifica probablemente por la deficiente inhibición de las CGs, lo cual asociado con los resultados obtenidos de este trabajo en el deficiente desarrollo de las proyecciones dendríticas de las CM y las alteraciones en las diferentes capas radiales del BO, también en el día 21, pudiera ser los factores que podrían asociarse con deficiencias sinápticas que derivaran en estos aspectos funcionales y perceptuales de la cría (Math y Davrainville, 1988).

Al no encontrarse diferencias entre los grupos en la permanencia en el aserrín limpio, nos sugiere que las crías pudieron discriminar el estímulo pero no fue relevante. Esto al parecer descarta el problema motor que pudiera subyacer al parámetro latencia de llegada al aserrín del nido de la madre. Este resultado sugiere además, que las crías del grupo D pueden tener una capacidad de discriminar olfatoriamente pero de manera limitada, porque del modo contrario, la orientación entre ambos tipos de estímulos hubiera sido similar.

La frecuencia de acercamiento al aserrín del nido de la madre se incrementó con la edad en ambos grupos, lo cual sugiere motivación y experiencia. Esto sugiere que el aumento de la ingesta se debe a las exigencias en el suministro por el desarrollo. En el grupo desnutrido, existen tres posibles explicaciones a este resultado, podría ser factible que una mayor frecuencia de acercamiento al aserrín proveniente del nido de la madre en las crías desnutridas, sea debido a que su limitada capacidad de discriminación, se acerque continuamente a “verificar” el estímulo de preferencia, orientándose frecuentemente para “detectar” el olor. Otra posible explicación desde la perspectiva de la locomoción, pudiera deberse a la mayor movilidad que experimentan las crías después de la apertura de los párpados en ambos grupos. En el caso de los animales desnutrido, se conoce de trabajos previos que la regulación del movimiento es y algunos de ellos muestran una carencia de control o no están regulados, manifiestos como cierta hiperactividad derivada de alteraciones en la generación y propagación de los potenciales de acción en las fibras aferentes relacionadas con los músculos (Griffin *et al*, 1977; Salas, 1980; Segura *et al.*, 2004). Un último factor que se sugiere, podría tener un componente motivacional, en el cual las crías del grupo D por la carencia de leche durante la mitad del día muestren más avidez por el olor de la madre, aunque esta propuesta podría desecharse porque los resultados acerca de la permanencia sobre el aserrín del nido de la

madre fue menor en este grupo, lo cual sugiere que la capacidad olfatoria fue menor en el grupo D (Resnick *et al.*, 1979).

En relación a la frecuencia de acercamiento al aserrín limpio, variable que no mostró diferencias entre los grupos, sugiere que ninguno de los grupos estuvo suficientemente motivado para acercarse al aserrín limpio y por tanto el grupo D posee capacidad olfatoria aunque podría ser limitada.

CONCLUSIONES

El menor desarrollo físico y el retraso en la maduración de las vías visuales y auditivas indican que la desnutrición fue efectiva. La diferencia en la relación alométrica entre el peso cerebral y el peso corporal sugiere que el cerebro es un órgano privilegiado cuando hay carencia de nutrientes generalizada.

La disminución del área de las capas del BO, indica que aún cuando el origen y proliferación de los principales tipos celulares del BO se genera prenatalmente, los efectos de la desnutrición posnatal influye en su desarrollo y en la organización en conjunto, lo cual podría tener repercusiones funcionales durante el procesamiento de la señal en las diferentes partes del relevo de la vía. El día veintiuno posnatal puede ser considerado un periodo crítico en el desarrollo de las capas que conforman al BO, de ahí que la rehabilitación nutricia en esta etapa podría revertir los efectos debido a alteraciones por deficiencias en la organización de las láminas del BO de manera particular en la CCG.

Los resultados de este trabajo muestran que en ambos grupos, la mayoría de los GOs se ha consolidado en número en la porción medial del BO en las distintas edades estudiadas pero aparecen tardíamente en la porción lateral, de manera particular en la región ventral, lo cual indica que la desnutrición modifica el desarrollo de los glomérulos topográficamente y probablemente pudiera haber un correlato funcional con esta diferencia en la generación del número de los GOs en esta etapa del desarrollo.

madre fue menor en este grupo, lo cual sugiere que la capacidad olfatoria fue menor en el grupo D (Resnick *et al.*, 1979).

En relación a la frecuencia de acercamiento al aserrín limpio, variable que no mostró diferencias entre los grupos, sugiere que ninguno de los grupos estuvo suficientemente motivado para acercarse al aserrín limpio y por tanto el grupo D posee capacidad olfatoria aunque podría ser limitada.

CONCLUSIONES

El menor desarrollo físico y el retraso en la maduración de las vías visuales y auditivas indican que la desnutrición fue efectiva. La diferencia en la relación alométrica entre el peso cerebral y el peso corporal sugiere que el cerebro es un órgano privilegiado cuando hay carencia de nutrientes generalizada.

La disminución del área de las capas del BO, indica que aún cuando el origen y proliferación de los principales tipos celulares del BO se genera prenatalmente, los efectos de la desnutrición posnatal influye en su desarrollo y en la organización en conjunto, lo cual podría tener repercusiones funcionales durante el procesamiento de la señal en las diferentes partes del relevo de la vía. El día veintiuno posnatal puede ser considerado un periodo crítico en el desarrollo de las capas que conforman al BO, de ahí que la rehabilitación nutricia en esta etapa podría revertir los efectos debido a alteraciones por deficiencias en la organización de las láminas del BO de manera particular en la CCG.

Los resultados de este trabajo muestran que en ambos grupos, la mayoría de los GOs se ha consolidado en número en la porción medial del BO en las distintas edades estudiadas pero aparecen tardíamente en la porción lateral, de manera particular en la región ventral, lo cual indica que la desnutrición modifica el desarrollo de los glomérulos topográficamente y probablemente pudiera haber un correlato funcional con esta diferencia en la generación del número de los GOs en esta etapa del desarrollo.

La diferencia en el número de GOs en las distintas regiones del BO, sugiere un desarrollo diferencial en la maduración en cuanto a la estabilización del número presente en las diferentes regiones del BO, lo cual es acorde con resultados previos.

Una menor longitud y área de los GOs muestra una deficiencia en el desarrollo de estas estructuras por un efecto derivado en la deficiencia del desarrollo de sus componentes debido a la desnutrición.

El retraso en la aparición de los GOs y la disminución de las dimensiones en el grupo D en las diferentes regiones coincide con el retardo en el periodo de maduración de otros canales sensoriales como el visual y el auditivo y núcleos y estructuras del SNC.

La disminución de las dimensiones de los GOs en la región medial del BO podría ser un factor en el cual se pudiera alterar la forma que se procesa el código olfatorio a nivel de la comunicación intrabulbar en comparación al grupo control

La valoración por regiones permitió obtener un método para evaluar la heterocronía del desarrollo de los GOs en el BO de los animales D respecto a los animales del grupo C, lo cual confirma que no hay una uniformidad del desarrollo de los GOs en ambos grupos en las diferentes regiones del BO, lo cual aporta información sobre las variaciones que se producen en estas importantes estructuras por efecto de la desnutrición, tales como una heterocronía en la región medial.

Las alteraciones en el soma de las CM no mostraron una disminución significativa por efecto de la desnutrición pero es factible que se haya dado un proceso de compensación que influyó por efecto de la desnutrición, aunque esta estructura de la célula es una de las más consistentes por haberse originado gestacionalmente previo al efecto epigenético.

La complejidad dendrítica y la longitud de las CM disminuyeron en el grupo D con efectos que podrían ser causa de la disminución del índice del área de la CPE y del tamaño de los GOs.

Debido a la reducción general de las dendritas de las CM por efecto de la desnutrición durante una etapa crítica del desarrollo, podría ser factible la presencia de alteraciones en la sinaptogénesis de las CM con las células circundantes formadoras del GO, la capa glomerular y la CPE que participan de manera importante en la modulación de la señal olfatoria a ese nivel.

Los resultados conductuales mostraron anomalías en la conducta de orientación olfatoria de los animales desnutridos que efectivamente podrían tener un sustrato anatómico alterado por efecto de la desnutrición que pudiera incidir en la percepción. Sin embargo la complejidad de los olores a los cuales fue expuesta la cría al ser nutrida por dos hembras podría ser causa de un conflicto de motivación al recibir un estímulo positivo y uno negativo, aunque es necesaria una mayor evaluación para poder discernir estos efectos respecto a la conducta motora, el aprendizaje y la motivación.

De manera general los resultados obtenidos de este trabajo mostraron un atraso del desarrollo físico de los animales desnutridos relacionado con deficiencias en el desarrollo de los componentes del BO en esta etapa posnatal, alteraciones que podrían influir negativamente en el funcionamiento del sistema olfativo y las capacidades de discriminación del individuo durante el crecimiento y la etapa adulta debido a que inciden en períodos críticos de la sobrevivencia de la cría.

PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

Evaluar el efecto de la desnutrición en las mismas estructuras evaluadas en un plazo más largo para responder a la pregunta: ¿persisten las alteraciones morfológicas de estas estructuras en la etapa adulta?, de ser así ¿habría efectos funcionales en la capacidad de discriminación olfatoria o se compensarían por efecto del desarrollo en una estructura plástica como lo es el BO y en general el rinencéfalo?

Comparar los resultados obtenidos en este trabajo con resultados de animales rehabilitados y evaluar si hay una compensación de las alteraciones morfológicas.

Si hubiera alteraciones de la capacidad discriminatoria se podría proponer una rehabilitación por estimulación olfatoria y táctil que probablemente podría revertir los efectos en la alteración celular y la capacidad de discriminación olfatoria (Panhuber, y Laing, 1987; Leon, 1992).

Evaluar con inmunohistoquímica los parámetros morfométricos de las células granulares, y su posible retraso en la proliferación y maduración con técnicas como las de radioinmunoensayo con timidita tritiada. Evaluar los parámetros morfológicos de las CGs y de las dendritas secundarias que conforman al GO con una técnica de marcaje, tal vez con inmunohistoquímica de la proteína marcadora olfatoria o alguna otra marcadora de proteínas distintivas de las CM y las NORs como la PMO.

Evaluar las espinas dendríticas de las CM, CP, CPg y CG así como las vesículas sinápticas y sus receptores ya sea con técnicas argénticas como la de Golgi rápida o con otras técnicas de inmunohistoquímica.

Evaluar el efecto en los otros tipos celulares menos estudiados como las células en Penacho, de Blanes y CPg, que también están involucrados en la formación del GO y participan en el relevo de la información olfatoria.

Evaluar la discriminación olfatoria con un paradigma experimental que no implique la participación motora.

Electrofisiológicamente ver de qué modo se lleva a cabo la comunicación inhibitoria-excitatoria entre las CM y las CG en las edades evaluadas durante el desarrollo, así como las interacciones con los otros tipos celulares con el fin de evaluar la actividad eléctrica de estos y otros tipos celulares en el BO y tratar de establecer en qué estructura o parte del proceso del relevo de la señal olfatoria hay alteraciones debido a la desnutrición.

Valorar el índice de mortandad entre el grupo D y C y correlacionar este efecto con alteraciones que pudieran deberse a una deficiencia en la alimentación o la interacción de la madre con su cría con efectos en su sobrevivencia.

CONSIDERACIÓN FINAL

De los estudios derivados de este y otros trabajos, podemos evidenciar que los efectos de la desnutrición en el desarrollo, pueden llegar a ser muy puntuales en determinadas estructuras del sistema nervioso, o muy amplias como se obtuvo en el desarrollo físico. De algún modo, este tipo de estudios intentan explicar algunos mecanismos que se pudieran presentar en el caso humano con el fin de resarcir los efectos o atenuarlos en determinados periodos del desarrollo, sin embargo, queda patente que esta problemática trasciende el aspecto científico y que debe de abordarse con prontitud desde una perspectiva más humana por los efectos que se producen a largo plazo por sus implicaciones en la salud pública. Su mitigación requiere su atención desde una perspectiva económica, política y social con responsabilidad y voluntad por parte de las personas y organismos que toman decisiones en diferentes niveles, ya que se trata de una problemática que estratégicamente merece ser tomada en cuenta para su prevención dado que resulta menos costosa que su remediación. Basta recordar lo mencionado por el Sr Kul C Gautam, Director Ejecutivo adjunto del UNICEF,

“En el mundo se producen alimentos suficientes para satisfacer las necesidades de todos los hombres, las mujeres, los niños que lo habitan. Por lo tanto, el hambre y la desnutrición no son consecuencia sólo de la falta de alimentos, sino también de la pobreza, la desigualdad y los errores en el orden de las prioridades.”

Discurso oficial de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación, 2000.

REFERENCIAS

Abercrombie M. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*, **94**: 239-247.

Acebes A, Ferrus A. 2001. Increasing the number of synapses modifies olfactory perception in *Drosophila*. *J Neurosci*, **21**: 6264-6273.

Alippi RM, Meta MD, Olivera MI, Bozzini C, Schneider P, Meta IF, Bozzini CE. 2002. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. *Arch Oral Biol*, **1**: 47-53.

Allen WK, Akeson R. 1985. Identification of an olfactory receptor neuron subclass: cellular and molecular analysis during development. *Dev Biol*, **109**: 393-401.

Allen RG, Ballin, AK. 1989. Oxidative influences on development and differentiation: an overview of the free radical theory of development. *Free Rad Biol Med*, **6**: 631-661.

Allison AC, 1953. The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol Rev*, **28**: 195-244.

Almli CR, Henault MA, Velozo CA, Morgane PJ, 1985. Ontogeny of electrical activity of main olfactory bulb in freely-moving normal and malnourished rats. *Develop Brain Res*, **18**: 1-11.

Altman J, 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **137**: 433-458.

Altman J, Sudarshan K, Das GD, Mc Cormick N, Barnes D. 1970. The influence of nutrition on neural and behavioral development. III. Development of some motor, particularly locomotor patterns during infancy. *Dev Psychobiol*, **4**: 97-114.

Alvarado S. “Efectos de la desnutrición neonatal y de la estimulación sensorial temprana en las respuestas visual y auditiva provocadas en diferentes etapas del desarrollo de la rata”. Tesis de licenciatura en Nutrición. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Qro. 2003.

Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas P, Espinosa-Villanueva J, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia, S. 1999. Memory deterioration in oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett*, **270**: 107-109.

Bailey MS, Poston MR, Shipley MT. 1989. Unique morphology of olfactory bulb radial glia: role in glomerular development?. *Soc Neurosci Abstr*, **15**: 690.

Bailey MS, Shipley MT. 1993. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol*, **328**: 501-526.

Bailey MS, Puche AC, Shipley MT. 1999. Development of the olfactory bulb evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J Comp Neurol*, **270**: 559-568.

Barragán-Mejía MG, Castilla-Serna L, Calderón-Guzmán D, Hernández-Islas JL, Labra-Ruiz NA, Rodríguez-Pérez RA, Santamaría-Del Angel D. 2002. Effect of nutritional status and ozone exposure on rat brain serotonin. *Arch Med Res*, **33**: 15-19.

Bass NN, Netsky MG, Young E. 1970. Effect of neonatal malnutrition on developing cerebrum I. Microchemical and histologic study of cellular differentiation in the rat. *Arch Neurol*, **23**: 289-302.

Bayer, SA. 1983. 3H-Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res*, **50**: 329-340.

Bayer SA, Altman J. 2004. Development of the telencephalon: neural stem cells, neurogenesis and neuronal migration. En: The rat nervous system. Ed.: G Paxinos. Elsevier. Sydney, Australia. Pp 60-61.

Beard, JL. 2003. Does iron deficiency cause low birth weight, prematurity, anemia, and mortality in early infancy?. Delange FM, West KP Jr (eds): Micronutrient deficiencies in the first months of life. Nestlé Nutrition Workshop Series Pediatric Program, 52:129-141, Nestlé LTD.; Vevey, Suiza. Karger AG, Basilea.

Benuck M, Banay-Schwartz M, Lajtha A. 1993. Proteolytic activity is altered in brain tissue of rats upon chronic exposure to ozone. *Life Sci*, **52**: 877-881.

Biesalki HK; Wellner U, Stofft E, Bassler KH. 1985. Vitamin A deficiency and sensory function. *Acta Vitaminol Enzymol*, **7**: 45-54.

Breer H, Shepherd G. 1993. Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *TINS* **16**: 5-9. Review.

Brunjes PC, Frazier LL. 1986. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Res*, **11**: 1-45.

Brunjes PC. 1994. Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res Rev*, **19**: 146-160.

Buck LB, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**: 175-187.

Buck LB. 2004. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr Rev*, 62: S184-S188.

Burd GD, Davis BJ, Macrides F, Grillo M, Margolis F. 1982. Carnosine in primary afferents of the olfactory system: an autoradiographic and biochemical study. *J Neurosci*, **2**: 244-255.

Burd GD, Tolbert LP. Development of the olfactory system. Cap. 10. En: Finger TE, Silver WL y Restrepo D, eds. *The Neurobiology of Taste and Smell*. 2a. ed Canada: Wiley-Liss, 2000. Pp. 60-120.

Butler AB, Hodos, W. *Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and Adaptation*. Wiley-Liss. 1996. Pp. 30-34.

Butt AM, Pugh M, Hubbard P, James G. 2004. Functions of optic nerve glia: axoglial signalling in physiology and pathology. *Eye*, **18**: 1110-1121.

Buyukgebiz B, Ozturk Y, Yilmaz S, Arslan N. 2004. Serum leptin concentrations in children with mild protein-energy malnutrition and catch-up growth. *Pediatr Int*. **46**: 534-538.

Callison D, Spencer J. 1968. Effect of chronic undernutrition and/or visual deprivation upon the visual evoked potential from the developing rat brain. 1968. *Dev Psychobiol*, **1**: 196-204.

Calderón-Guzmán D, Hernández-Islas JL, Hernández-García E. 2002. Ingesta deficiente de proteínas y exposición a ozono sobre Na⁺, K⁺, ATPasa en cerebro de ratas. *Arch Neurocién (Mex)*. **7**: 132-135.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford Rusty, Alvarez-Buylla A, Lledo PM, 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neurosci*, **6**: 507-518.

Carpenter MB. *Neuroanatomía Fundamentos*. 4^a. Ed. Editorial Médica Panamericana. 1994. Buenos Aires, Argentina. Pp. 448.

Chen WR, Shepherd GM, 1997. Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb. *Brain Res*, **745**: 189-196.

Christensen TA, White J. Representation of olfactory information in the brain, Cap. 9. En: Finger TE, Silver WL y Restrepo D, eds. *The Neurobiology of Taste and Smell*. 2a. ed. Canada: Wiley-Liss, 2000. Pp. 201-232.

Cintra, L, Galván, A. 1991. Influencia de los nutrientes en el desarrollo del sistema nervioso, En: *Ontogenia Neural*, Ed. Salas, M. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas-UNAM-Coord. de la Investigación Científica. Pp. 147-164.

Cintra L, Galván, Díaz-Cintra S, Escobar C. 1994. Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol Estud Med Biol*, **42**: 11-19.

Cintra L, Durán P, Guevara MA, Aguilar A, Castañón-Cervantes O. 2002. Pre and Post-natal protein malnutrition alters the effect of rapid eye movements sleep-deprivation by the platform-technique upon the electrocorticogram of the circadian sleep-wake cycle and its frequency bands in the rat. *Nutr Neurosci*, **5**: 91-101.

Coello-Ramírez, P. 1996. Deficiencias nutricias específicas en pediatría: importancia del zinc y del cobre en la nutrición del niño. En: *Nutrición. Temas de Pediatría*. Asociación Mexicana de Pediatría, AC. Arnaiz CJ., Gamboa JD, Escobar E, Aparicio E. Interamericana. Mc Graw Hill. México. Pp. 135-167.

Colín-Barenque L; Avila-Costa MR; Fortoul T; Rugerio-Vargas C; Machado-Salas JP Espinosa-Villanueva J, Rivas-Arancibia S. 1999. Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neurosci Lett*, **274**: 1-4.

Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A. 2000. Disruptions of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nature Neurosci*, **3**: 1091-1097.

Cox G, Chengelis CP (eds). *Animal models in toxicology*. Ed. Marcel Dekker, Inc. 1992. Pp. 21-164.

Díaz-Cintra S, Garcia-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L. 1994. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res*, **662**: 117-126.

Del Angel Meza AR, Ramirez-Cortes L, Olvera-Cortés E. Perez-Vega MI, Gonzalez-Burgos I. 2001. A tryptofan-deficient corn-based induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. *Int J Dev Neurosci*, **19**: 447-453.

Dodd J, Castellucci VF. Smell and Taste: The Chemical Senses, Cap. 34. En: Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM eds. Principles of Neural Science. 3a. ed. USA: Mc Graw Hill, 1991. Pp 512-518.

Escobar C, Salas M, 1993. Neonatal undernutrition and amygdaloid nuclear complex development: an experimental study in the rat. *Exp Neurol*, **122**: 311-318.

Escobar C, Salas M, 1995. Dendritic branching of claustral neurons in neonatally undernourished rats. *Biol Neonate*, **68**: 47-54.

Fadool DA, Tucker K, Perkins R, Fasciani G, Thompson RN, Parsons AD, Overton JM, Koni PA, Flavell RA, Kaczmarek LK. 2004. Kv1.3 Channel gene-targeted deletion produces "super-smeller mice" with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron*, **41**: 389-404.

Farbman AI. 1990. Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls?. *Trends Neurosci*, **13**: 362-365.

Frazier LL, Brunjes, PC. 1988. Unilateral odor deprivation: Early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number. *J Comp Neurol*, **269**: 355-370.

Frazier-Cierpal L, Brunjes PC. 1989. Early postnatal differentiation of granule cell dendrites in the olfactory bulbs of normal and unilaterally odor-deprived rats. *Dev Brain Res*, **47**: 129-136.

Frías C, Paz C, Torrero C, Regalado M, Salas M. Olfactory glomeruli of undernourished and ozonated rats: a morphometric study. Número de Programa: 41.5. Sesión: Development olfactory and taste systems. Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, CA. USA. October 2004.

Frias C, Torrero C, Regalado M, Salas M. 2006. Organization of olfactory glomeruli in neonatally undernourished rats. *Nutr Neurosci*, **9**: 49-55.

Friedman B, Price JL. 1984. Fiber systems in the olfactory bulb and cortex: a study in adult and developing rats using the Timm method with the light and electron microscope. *J Comp Neurol*, **223**: 88-109.

Frischer Th, Pullwitt A, Kühr J, Haschke N, Studnicka M, Lubec G. 1997. Aromatic Hydroxylation in nasal lavage fluid following ambient ozone exposure. *Free Rad Biol Med*, **22**: 201-207.

García-Ruiz M, Díaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G. 1993. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res*, **625**: 203-212.

Gong Q, Shipley MT. 1995. Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the formation of the olfactory bulb. *Neuron*, **14**: 91-101.

Gramsbergen A, Westerga J. 1992. Locomotor development in undernourished rats. *Behav Brain Res*, **48**: 57-64.

Granados-Rojas L, Aguilar A, Diaz-Cintra S. 2004. The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutr Neurosci*, **7**: 301-308.

Graziadei PPC, Monti-Graziadei GA. 1986. Principles of organization of the vertebrate olfactory glomerulus: An hipotesis. *Neuroscience*, **19**: 1025-1035.

Greer CA. 1987. Golgi analyses of dendritic organization among denervated olfactory bulb granule cells. *J Comp Neurol*, **257**: 442-452.

Griffin WST, Woodward DJ, Chandra R. 1977. Malnutrition-induced alterations of developing Purkinje cells. *Exper Neurol*, **56**: 298-311.

Günther T, Höriegl V, Vormann J. 1993. Perinatal development of iron and antioxidant defense systems. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, **7**: 47-52.

Guillemot F, Parras C. 2005. Adult neurogenesis: a tale of two precursors. *Nat Neurosci*, **8**: 846-848.

Guthrie KM, Gall C. 2003. Anatomic mapping of neuronal odor responses in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. **455**: 56-71.

Hamilton KA, Heinbockel T, Ennis M, Szabo G, Erderly F, Hayar A. Properties of external plexiform layer interneurons in mouse olfactory bulb slices. *Neurosci*, **133**: 819-829.

Harvey FE y Cowley JJ. 1984. Effects of external chemical environment of the developing olfactory bulbs of the mouse (*Mus musculus*). *Brain Res Bull*, **13**: 541-547.

Hermanussen M, Rol de Lama MA, Romero AP, Ruiz CA, Burmeister J, Tresguerres JA. 1996. Differential catch-up in body weight and bone growth after short-term starvation in rats. *Growth Regul*, **4**: 230-237.

Herz RS, Influences of odors on mood and affective cognition. Cap 10. En: Olfaction, taste and cognition, ed: Rouby C, Schaal B, Dubois D, Gervais R y Holley A. Ed Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2002. Pp 462.

Hill RE, Favor J, Hogan BL, Tun CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen. 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired like homeobox continuing gene. *Nature*, **354**: 522-525.

Ingham CA, Hood SH, Arbuthnott GW. 1989. Spine density on neostriatal neuron changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res*, **503**: 334-338.

Kaplan MS, Mc Nely NA, Hinds JW. 1985. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **239**: 117-125.

Kishi K, 1987. Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. *J Comp Neurol*, **258**: 112-124.

Knight JA. 1998. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci*, **28**: 331-346.

Kornack DR, Rakic P. 2001. Generation and migration of new olfactory neurons in adult primates. *Proc Natl Acad Sci, USA*, **98**: 4752-4757.

Kovacs T, Papp MI, Cairns NJ, Khan MN, Lantos PL. 2003. Olfactory bulb in multiple system atrophy. *Mov Disord*, **18**: 938-942.

Kosaka T, Kosaka. 2005. Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb. *Chem Senses*, **30**: 107-108.

LaMantia AS, Pomeroy SL, Purves D. 1992. Vital imaging of glomeruli in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, **12**: 976-988.

Le Gros CWE. 1956. Inquiries into the anatomical basis of olfactory discrimination. *Proc R Soc. London Ser B* **146**: 299-319. En: Shipley y Ennis, 1996. Pp. 123-176.

Leon M, 1992. Neuroethology of olfactory preference development. *J Neurobiol*, **23**: 1557-1573.

Liberles SD y Buck L. 2006. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, **442**: 645-650.

Liu G, Rao Y. 2003. Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 23: 6651-6659.

Liesi P, Dahl D, Vaheri A. 1983 Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *Cell Biol*, **96**: 920-924.

Lledó P-M, Gheusi G y Vincent JD. 2005. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev*, **85**: 281-317.

Lois C, Alvarez-Buylla A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci, USA*, **90**: 2074-2077.

Loranca A, Torrero C, Salas M. 1999. Development of play behavior in neonatally undernourished rats. *Physiol Behav*, **66**: 3-10.

Lundell KH, Eriksson BO, Sabel KG, Mellgren G. 1996. Skeletal muscle energy substrates, metabolic products and enzyme activity in infants with symptomatic ventricular septal defect. *Acta Paediatr*, **85**: 1314-1318.

Malun D, Brunjes PC. 1996. Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *J Comp Neurol*, **368**: 1-16.

Marks CA, Belluscio L. 2005. The development and activity-dependent refinement of the olfactory intrabulbar map. Cartel. Número de Programa: 614.4. Sesión: Olfactory coding in olfactory bulb/antennal lobe. Society for Neurosciences, Washington DC. Noviembre 2005.

Márquez-Orozco MC. Bases morfológicas y fisiológicas del desarrollo del sistema nervioso. En: Ontogenia Neural. Ed M Salas. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México. 1991. Pp. 73-125.

Math F, Davrainville JL. 1980. Electrophysiological study on the postnatal development of mitral cell activity in the rat olfactory bulb. influence of undernutrition. *Brain Res*, **194**: 223-227.

Mc Guire MK, Pachon H, Buttler WR, Rasmussen KM. 1995. Food restriction, gonadotropins and behavior in the lactating rat. *Physiol Behav*, **58**: 1243-1249.

Meisami E, Safari L. 1981. A quantitative study of the effects of early unilateral olfactory deprivation on the number and distribution of mitral and tufted cells of glomeruli in the rat olfactory bulb. *Brain Res*, **221**: 81-107.

Meredith M. 2001. Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chem Senses*, **26**: 433-445.

Mombaerts P, 2001. How smell develops. *Nat Neurosci*, **4**: 1192-1198. Suppl. Review.

Mombaerts P, 2004. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited, *Curr Opin Neurobiol*, **14**:31-36.

Morgane PJ, Austin La France R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*, **17**: 91-128.

Mourek J, Himwich WA, Myslivecek K, Callison DA. 1967. The role of nutrition in the development of evoked cortical responses in the rat. *Brain Res*, **6**: 241-251.

National Research Council. 2003. Guidelines for the Care and Use of Mammals En: National Research Council of the National Academies, editor. Neuroscience and Behavioral Research. Washington DC: National Academies Press. Pp 209.

Neville HE, Chase HP. 1971. Undernutrition and cerebellar development. *Exper Neurol*, **33**: 485-497.

Oland LA, Tolbert LP. 1996. Multiple factors shape development of olfactory glomeruli: insights from insect model system. *J Neurobiol*, **30**: 92-109.

Oreffo RO, Lashbrooke B, Roach HI, Clarke NM, Cooper C. 2003. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone*, **33**: 100-107.

Panhuber H, Laing DG, Wilcox ME, Eagleson GK, Pittman EA. 1985. The distribution of the size and number of mitral cells in the olfactory bulb of the rat. *J Anat*, **140**: 297-308.

Panhuber H, Laing DG. 1987. The size of mitral cells is altered when rats are exposed to an odor from their day of birth. *Brain Res*, **431**: 133-140.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 2a. ed. 1986. Plano 2 y 3.

Pedersen PE, Stewart WB, Greer CA, Shepherd GM. 1983. Evidence for olfactory function in utero. *Science*, **221**: 478-480.

Pérez-Torrero E, Torrero C, Salas M. 2001. Effects of perinatal undernourishment on neuronal development of the facial motor nucleus in the rat. *Brain Res*, **905**: 54-62.

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

Pomeroy SL, LaMantia AS, Purves D, 1990. Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, **10**: 1952-1966.

Purves D. Modules. lección II. En: Purves D, ed. Neural activity and the growth of the brain. Great Britain: Cambridge University Press, 1994. Pp 22-43.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. Capítulo 14, "The Chemical Senses". En: Neuroscience. 3a Ed. Sinauer, Massachusetts, 2004. Pp. 337-354.

Quirck GJ, Mejía WR, Hesse H, Su H. 1995. Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract. *Brain Res*, **670**: 277-282.

Rakic P. 2002. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nature Rev*, **3**: 65-71.

Ramón-Moliner, E. The Golgi-Cox technique, En: SA Nauta, SOE Ebbenson (Eds), Contemporary Research Methods in Neuroanatomy, Springer, New York, 1970. Pp. 32-55.

Regalado M, Torrero M, Salas M. 1999. Maternal Responsiveness of neonatally undernourished and sensory stimulated rats: Rehabilitation of maternal behavior. *Nutr Neurosci*, **2**: 7-18.

Resnick O, Miller M, Forbes W, Hall R, Kemper T, Bronzino J, Morgane PJ. 1979. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, **3**: 233-246.

Riesgo-Escovar JR. La neurotransmisión en las neuronas receptoras olfatorias. Cap 6. En: Neurobiología de los sistemas sensoriales. 1a Ed. G Meza. editora. UNAM. Coordinación de la Investigación Científica. México. 1995. Pp. 101-117.

Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM. 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci*, **22**: 2679-2689.

Romer AS, Parsons T S. Cap. 16 Sistema Nervioso en: Anatomía Comparada. 5a. Ed. Nueva Editorial Interamericana. México. 1981. Pp. 329-361.

Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Ravelli ACJ, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. 2001. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocr*, **185**: 93-98.

Roselli-Austin L, Altman J. 1979. The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol*, **1**: 295-313.

Royal SJ, Gambello MJ, Wyshaw-Boris A, Key B, Clarris HJ. 2002. Laminar disorganization of mitral cells in the olfactory bulb does not affect topographic targeting of primary olfactory axons. *Brain Res*, 932: 1-9.

Royet JO, Souchier C, Jourdan F, Ploye H. 1988. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol*, **270**: 559-568.

Rubio L, Torrero C, Regalado M, Salas M, 2004. Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation. *Nutr Neurosci*, **7**: 291-300.

Rudy JW, Cheate MD. 1977. Odor-aversion learning in neonatal rats. *Science*, **198**: 845-846.

Ruiz M. Interacción entre desnutrición perinatal y estimulación sensorial: discriminación olfatoria en la rata infante. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Neurobiología. 2006.

Salas M. 1972. Effects of early malnutrition on the development of swimming ability in the rat. *Physiol Behav*, **8**: 119-122.

Salas M. 1980. Effects of early undernutrition on dendritic spines of cortical pyramidal cells in the rat. *Dev Neurosci*, **3**: 109-117.

Salas M, Guzman-Flores C, Schapiro S. 1969. An ontogenetic study of olfactory bulb electrical activity in the rat. *Physiol Behav*, 4: 699-703.

Salas M, Cintra L. 1973. Nutritional influences upon somatosensory evoked response during development in the rat. *Physiol Behav*, **10**: 1019-1022.

Salas M, Diaz S, Nieto. 1974. Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. *Brain Res*, **73**: 139-144.

Salas M, Cintra L., 1975. Development of the electrocorticogram during starvation in the rat. *Physiol Behav*, **14**: 589-593.

Salas M. 1980. Effects of early undernutrition on dendritic spines of cortical pyramidal cells in the rat. *Dev Neurosci*, **3**: 109-117.

Salas M, Torrero C, Pulido S. 1984. Long-term alterations in the maternal behavior of neonatally undernourished rats. *Physiol Behav*, **3**: 273-278.

Salas M, Pulido S, Torrero C, Escobar C. 1991. Neonatal undernutrition and self grooming development in the rat: long term effects. *Physiol Behav*, **50**: 567-572.

Sant'Anna G, Mortola JP. 2003. Inter-organ unevenness and catch-up growth in rats. *Growth Dev Aging*, **67**: 27-46.

Santacana M, Heredia M, Valverde F. 1992. Transient pattern of exuberant projections of olfactory axons during development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res*, **70**: 213-222.

Schaal B, Marlier L, Sousignan R. 1998. Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behav Neurosci*, **112**: 1438-1449.

Segura B, Guadarrama JC, Gutierrez AL, Merchant H, Cintra L, Jimenez I, 2001. Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr Neurosci*, **4**: 475-488.

Segura B, Guadarrama JC, Pratz G, Mercado V, Merchant H, Cintra L, Jiménez I. 2004. Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. *Neurosci Lett*, **354**: 181-184.

Sayer AA, Dunn R, Langley-Evans S, Cooper C. 2002. Prenatal exposure to a maternal low protein diet shortens life span in rats. *Gerontology*, **47**: 9-14.

Schaal B, Marlier L, Sousignan R. 1998. Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behav Neurosci*, **112**: 1438-1449.

Schapiro S, Salas M, Vukovich, K. 1970. Hormonal effects on ontogeny of swimming ability in the rat: Assessment of central nervous system development. *Science*, **168**: 147-151.

Shepherd GM. 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev*, **42**: 864-914.

Shipley MT, Mc Lean JH, Ennis M. Cap 33, Olfactory System, En: The Rat Nervous System (ed Paxinos, G.). 2^a ed. Academic Press. Sydney, Australia. 1995. Pp. 899-921.

Shipley MT, Ennis M. 1996. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol*, **30**: 123-176.

Sholl DA. 1953. Dendritic organization of the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, **87**: 387-406.

Singh TD, Shankar R. 1999. Developmental regulation and effect of early undernutrition on phosphorylation of rat cortical synaptic membrane proteins. *Int J Devl Neurosci*, **17**: 743-751.

Skeen LC, Due BR, Douglas FE. 1985. Effects of early anosmia on two classes of granule cells in developing mouse olfactory bulbs. *Neurosci Lett*, **54**: 301-306.

Smith DV, Shepherd GM. Chemical senses: taste of olfaction. Cap 25. En: *Fundamental Neuroscience*. Eds. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL y Squire LR, San Diego: Academic Press, 1999. Pp. 719-759.

Smith DV, Shepherd GM. 24. Chemical Senses: Taste and Olfaction. Cap. 24. En: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. San Diego: Academic Press, 2003. Pp. 649-666.

Smotherman WP. 1982. Odor aversion learning by the rat fetus. *Physiol Behav*, **29**: 769-771.

Tolley LK, Bedi KS. 1994. Undernutrition during early life does not affect the number of granule cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **348**: 343-350.

Torrero C, Pérez E, Regalado M, Salas M. 2000. Pattern of suckling movements during artificial feeding of neonatally undernourished rats. *Nutr Neurosci*, **3**: 245-254.

Torrero C, Medina I, Gutiérrez G, Regalado M, Soriano O, Gonzalez L, Salas M. Restricción neonatal de alimento y privación unilateral del olfato en la actividad de las vesículas sinápticas del bulbo olfatorio (BO) de la rata. Memorias del Congreso de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, 2001. Cancún, México.

Torrero C, Regalado M, Perez E, Rubio L, Salas M. 2005. Neonatal food restriction and binaural ear occlusion interfere with the maturation of cortical motor pyramids in the rat. *Nutr Neurosci*, **8**: 63-66.

Trindade VMT, Scotti L, Becker D, Perry MLS, Bernard EA. 1995. Undernutrition alters the hypothalamic ganglioside profile of the fetal rat. *J Nutr Biochem*, **6**: 155-157.

Tolley LK, Bedi KS, 1994. Undernutrition during early life does not affect the number of granule cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **348**: 343-350.

Tsim TY, Wong EY, Leung MS, Wong CC. 2004. Expression of axon guidance molecules and their related genes during development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats. *Neuroscience*, **123**: 951-965.

Uchida N, Takahashi YK, Tanifuji M, Mori K. 2000. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nature Neurosci*, **3**: 1035-1043.

Uchida N, Mainen Z. 2003. Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. 2003. *Nature Neurosci*, **6**: 1224-1229.

UNICEF, 2006. Progress for children. A report card in nutrition. Número 4, Mayo. Unite for children. Nueva York. Dirección electrónica (agosto, 2006). http://www.unicef.org/publications/files/Progress_for_Children_-_No._4.pdf

Valadares CT, de Sousa-Almeida S. 2005. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. *Nutr Neurosci*, **8**: 39-47.

Valverde-Garcia F. 1965. Studies on the piriform lobe. Cambridge Mass, USA. Harvard University. Pp.131.

Valverde F, Santacana M, Heredia M. 1992. Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience*, **49**: 255-275.

Vicario-Abejon C, Yusta-Boyo MJ, Fernandez-Moreno C, de Pablo F. 2003. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require

endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci*, **23**: 895-906.

Wilson SJ, Ross JJ, Harris AJ. 1988. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development* **102**: 815-821.

Winberg J, Porter RH. 1998. Olfaction and human neonatal behavior: Clinical implications. *Acta Paediatrica*, **87**: 6-10.

Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, W JY, Rao Y. 1999. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*, **400**: 331-336.

Xu F, Schaefer M, Kida I, Shafer J, Liu N, Rothman DL, Hyder F, Restrepo D y Shepherd GM. 2005. Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors of pheromones. *J Comp Neurol*, **489**: 491-500.

Zigmond MJ, Bloom, FE, Landis, SC, Roberts, JL, Squire, LR. Fundamental Neuroscience. Ed. Academic Press. London. 1999. Pp 737-759.

APÉNDICE

Diferencias del peso en animales desnutridos en el día y en la noche

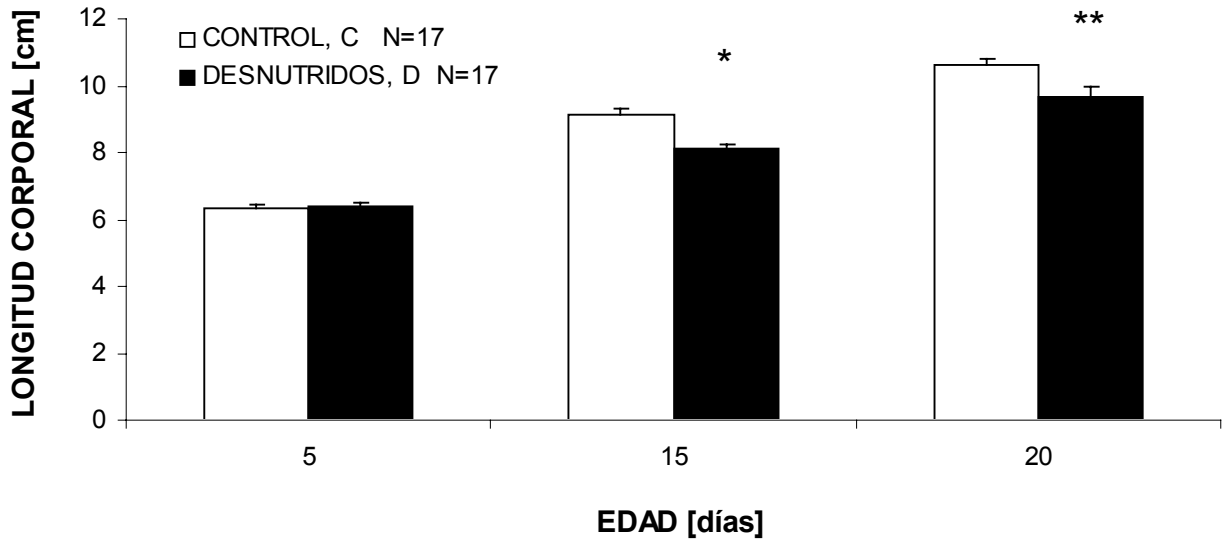
Con el fin de evaluar alguna posible diferencia entre el peso de los animales que se desnutrieron en el día, respecto a aquellos que se desnutrieron durante la noche, se compararon los resultados del peso corporal de ambos grupos sin obtenerse diferencias por efecto del ciclo de luz/oscuridad, $F(1,14)=1.69$, $p=2.15$ ó la interacción ciclo luz/oscuridad en las distintas edades, $F(4,56)=0.409$, $p=0.801$.

Somatometría

Longitud corporal

Además de la valoración física del peso corporal y cerebral, la longitud del cuerpo y la apertura de los meatos auditivos y de los párpados, también se evaluaron las variables largo del cuerpo (LC) que es lo mismo que la longitud céfalo-sacra, esto es a partir de la punta de la nariz hasta la base del cuerpo, así como la longitud de la ulna. Estos parámetros permiten evaluar el impacto de la desnutrición y la maduración somatosensorial. La estadística empleada para valorar los parámetros, longitud de la ulna y longitud corporal, fue la misma que para los otros parámetros somatométricos. Los datos se compararon con un ANOVA de tres vías: 2 condiciones nutrimentales (C y D) x 3 edades (7, 14 y 21 días posnatales) x 2 parámetros somatométricos (longitud corporal y longitud de la ulna) cuyos resultados fueron los siguientes.

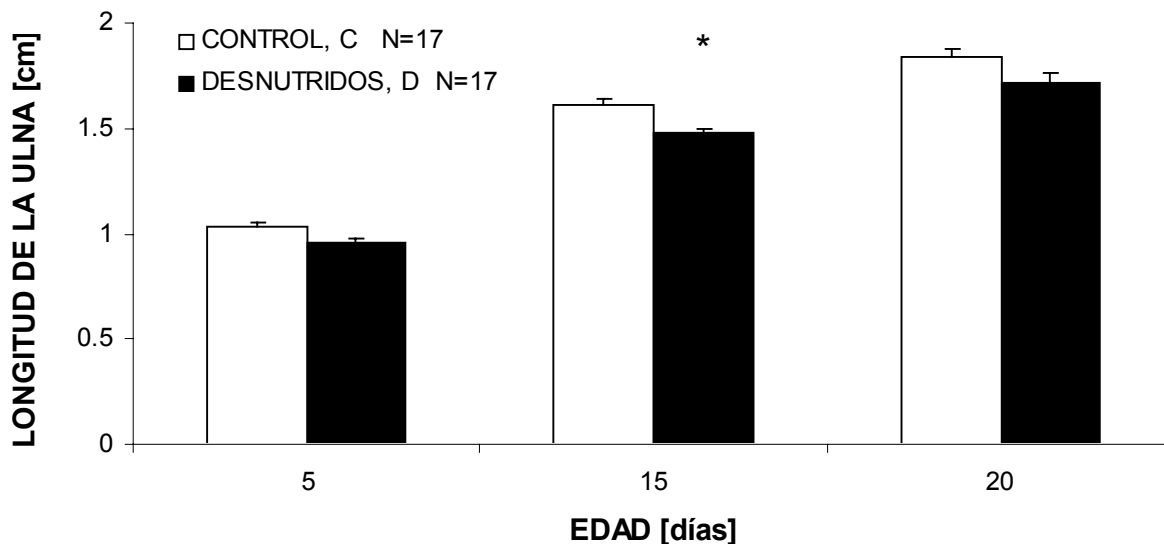
A diferencia de las otras variables, la medición de la longitud corporal se obtuvo en los días 5, 15 y 20 posnatales con una $n = 17$ para cada uno de los grupos, y para cada edad. Los resultados mostraron un efecto debido a la condición, $F(1,8) = 23.54$, $p < 0.0001$. También se observaron diferencias por efecto de la edad, $F(2,16) = 822.36$, $p < 0.0001$ y la interacción entre ambas variables, $F(2,16) = 24.66$, $p < 0.0001$. Los resultados con una prueba *post hoc* indicaron diferencias significativas a los 15 y 20 días posnatales, que se muestran en la Gráfica A1.



Gráfica A1 Longitud corporal en ambos grupos en las diferentes edades. La prueba *post hoc* de Tukey muestra una disminución de la longitud en el grupo D en los días 15 y 20 de edad, * $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$.

Longitud de la ulna

Se considera a la ulna (U) como la región que abarca a partir de donde termina el metacarpo hasta la articulación del miembro anterior. La medición de este parámetro no mostró diferencias por efecto de la condición aunque si por el efecto de la edad $F(2,16) = 100.60$, $p < 0.0001$, sin encontrarse una interacción entre ambos factores. Gráfica A2.



Gráfica A2. Longitud de la ulna de ambos grupos en diferentes edades. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos el día 15 de edad, con una disminución de la longitud en el grupo D, * $p < 0.05$.

La prueba *post hoc* mostró una reducción significativa de la longitud de la ulna en el grupo D respecto al grupo C en el día 15 posnatal. En conjunto la valoración del desarrollo físico confirma que el procedimiento experimental fue adecuado para provocar la desnutrición.

Contenido de nutrimentos en la dieta de los animales alimentados con producto “Lab Science” ©

Forma del producto Estándar: Pellet

Ingredientes: harina de trigo, harina de maíz, alimento de soya, gluten de maíz, aceite de soya, carbonato de calcio, levadura, fosfato dicálcico, sal yodatada, L-lisina, DL-metionina, cloruro de colina, niacina, acetato de vitamina A, biotina, hidrocloreuro de piridoxina, mononitrato de tiamina, suplemento de vitamina D3, ácido fólico, complejo de bisulfito de sodio menadiona (fuente de actividad de vitamina K), suplemento de vitamina E, suplemento de vitamina B12, riboflavina, pantotenato de calcio, sulfato ferroso, óxido de magnesio, óxido de manganeso, óxido de zinc, sulfato de cobre, yodato de calcio, carbonato de cobalto, sulfato de cromo potasio. 21% proteína.

Técnicas histológicas

Tinción con violeta de Cresilo (Nissl) (Modificada)

Formaldehído/alcohol (9 partes de etanol al 100% + 1 parte de paraformaldehído

27.7 ml formaldehído + 222.22 ml de etanol	algunas inmersiones
etanol al 100%	enjuagar
Xilol	15 min
Xilol	15 min
Etanol al 100%	10 min
Etanol al 95 %	2 min
Etanol al 80 %	2 min
Etanol al 70 %	2 min
Etanol al 50 %	2 min
Agua destilada	2 min
Violeta de cresilo	5 min o más
Agua destilada	2 min
Etanol al 70%	enjuagar
Etanol al 80%	2 min
Etanol al 95% + algunas gotas de ácido acético para contrastar	enjuagar +/- 1 min
Etanol al 100 %	4 min
Xilol	10 min
Xilol	10 min
Cubrir la preparación con cubreobjetos y Entellan	

Técnica por impregnación Golgi-Cox

Preparación de la solución

Solución A:

Cloruro de Mercurio (HgCl ₂)	1g
Dicromato de Potasio	1g
Agua Destilada	85 cm ³

Para esta solución se calienta el agua sin hervir, posteriormente se le añade el cloruro de mercurio hasta que se diluya y enfríe totalmente, entonces se añade el dicromato de potasio.

Solución B

Cromato de Potasio	0.8g
Tungstato de Sodio o Potasio	0.5g
Agua destilada	20 cm ³

Se mezclan la solución A y B

Se deja inmerso el tejido cerebral por 20 a 30 días si los animales son jóvenes, el tiempo se acorta si se trata de animales viejos.

Una vez transcurrido este tiempo se deshidrata el tejido sin lavar:

Impregnación

Durante 24 horas se deja el tejido en alcohol/acetona (volumen a volumen)

Posteriormente, durante 4 horas se pasan a una solución éter/alcohol (volumen a volumen)

Se impregna el tejido en celoidina de menor a mayor graduación

Celoidina	Tiempo de impregnación
2%	4 días
4%	4 días
15%	4 días
30%	2 días

Posteriormente, el tejido se incluye en celoidina al 16% en un pequeño recipiente de polietileno y se coloca en un desecador con cloroformo al vacío de uno a tres minutos. Posteriormente, se dejan reposar los bloques por 24 horas.

Se extraen los bloques de cerebro del recipiente.

En frascos ámbar se colocan los bloques extraídos con alcohol al 50% Podrán permanecer los bloques de esta manera antes de ser cortados.

Cortes

Los bloques se extraen del frasco con alcohol y se pegan a una base de madera para cortarse con microtomo exponiendo la base más ancha del bloque a éter/alcohol colocando de nuevo el bloque

en el desecador por uno o dos minutos. Se corta el tejido de 100 a 150 micras. Inmediatamente después de cortar se deshidrata el tejido.

Deshidratación

Se realiza una secuencia de baños en distintas soluciones para cada uno de los cortes en el siguiente orden:

Agua destilada (4 baños consecutivos en diferentes cajas de petri),

Microdol a concentración para revelar sin diluir. Una vez que el tejido obtuvo una coloración gris-verdosa se cambia a,

Agua destilada

Alcohol al 70%

Alcohol al 96%

Alcohol absoluto

Propanol

Tolueno

Las preparaciones se montan. Es importante que en cada cambio el tejido permanezca en cada solución durante 10 a 20 minutos.

Los artículos derivados de este trabajo se pueden localizar en línea en:

Frias C, Torrero C, Regalado M, Salas M. 2006. Organization of olfactory glomeruli in neonatally undernourished rats. *Nutr Neurosci*, **9**: 49-55.

El artículo de revisión se puede consultar en:

<http://www.cinvestav.eclipse.red.cinvestav.mx/seminariofarmacologia/>

Actualmente existe el compromiso de preparar un artículo *in extenso* para un capítulo de libro para la editorial Nova Publishers.