

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO EN TERAPIA OCUPACIONAL



Desarrollo embrionario de las conexiones neuronales del sistema olfatorio.

Autor: Giménez–Benedid Salve, Beatriz.

Nº expediente: 887.

Tutor: De Puelles Martínez de la Torre, Eduardo.

Cotutora: Company Devesa, Verónica.

Departamento de Histología y Anatomía.

Curso académico 2017-2018.

Convocatoria de junio.

AGRADECIMIENTOS:

A Eduardo de Puelles por su dedicación, paciencia y motivación.

A Verónica Company por saber amainar y conducir los momentos de agobio con una gran sonrisa y positividad.

“Hay perfumes que huelen a recuerdos...”



ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página:
• Resumen y palabras clave	1
• Abstract and key words	2
• Introducción	3
• Hipótesis de trabajo	8
• Objetivos	8
• Material y métodos	9
• Resultados	14
• Discusión	22
• Conclusiones	23
• Bibliografía	24



RESUMEN:

Introducción: A pesar de la importancia del sistema olfatorio en la vida diaria (relacionado con emociones y memoria) y de sus patologías, los profesionales responsables de su rehabilitación y tratamiento tienen pocos conocimientos respecto a su formación. Por tanto, sería interesante encontrar técnicas que nos permitan ampliarlos para lograr una intervención más eficaz.

Hipótesis del trabajo: Las técnicas inmunohistoquímicas contra Neurofilamento y los marcadores lipofílicos (DiI) son buenas herramientas para el estudio del desarrollo del sistema olfatorio.

Objetivos: Estudiar mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas y marcadores lipofílicos (DiI) el desarrollo embrionario prenatal y postnatal de las conexiones en el sistema olfatorio para describir la formación de dichos tractos en los estadios citados.

Material y métodos: Este trabajo se ha efectuado utilizando 2 herramientas: técnica de inmunohistoquímica contra Neurofilamento y marcador lipofílico DiI en el estudio del desarrollo embrionario del sistema olfatorio en los estadios E12.5, E15.5, E18.5 y P3.

Resultados: En los resultados obtenidos se puede observar como, a medida que avanzan los estadios, las estructuras morfológicas relacionadas con el sistema olfatorio van determinándose y aumentando de tamaño. Algunas de ellas, como el bulbo olfatorio, son detectables desde los primeros estadios mientras otras, como el tubérculo olfatorio, no aparecen hasta estadios más avanzados.

Discusión: Las dos técnicas han mostrado su validez para estudiar este sistema. Los resultados obtenidos nos han permitido observar cómo y cuando se desarrollan los diferentes componentes.

Conclusiones: Las herramientas utilizadas permiten estudiar el desarrollo del sistema olfatorio. Siendo más precisa y específica la inmunohistoquímica.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, sistema olfatorio, inmunohistoquímica, DiI.

ABSTRACT:

Introduction: Given the olfactory system importance in daily life (related to emotions and memory) and its pathologies, the professionals responsible for its rehabilitation and treatment have poor knowledge about its formation. It would be interesting to find techniques that allow us to implement it and to achieve a more effective intervention.

Working hypothesis: Immunohistochemical technique against Neurofilament and lipophilic markers (DiI) are good tools for studying the olfactory system development.

Objective: To study, through the use of immunohistochemical technique and lipophilic markers (DiI), the prenatal and postnatal development of the olfactory system connections to describe the above-mentioned tracts formation.

Materials and methods: This work has been carried out using 2 tools: immunohistochemistry against Neurofilament and DiI lipophilic marker in the study of the embryonic development of the olfactory system in E12.5, E15.5, E18.5 and P3 stages.

Results: In the results obtained it can be observed how, as the stages develop, the morphological structures related to the olfactory system are determined and increased in size. Some of them, such as the olfactory bulb, are detectable from the earliest stages while others, such as the olfactory tubercle, do not appear until more advanced stages.

Discussion: The two techniques have shown their validity to study this system. The results obtained have allowed us to observe how and when the different components are developed.

Conclusions: The tools used allow the study of the olfactory system development. The immunohistochemistry is more precise and specific.

Key words: Embryonic development, olfactory system, immunochemistry, DiI.

INTRODUCCIÓN:

Como ya se sabe, el desarrollo embrionario comienza en la formación de los gametos. Esa parte se va a omitir para comenzar a partir de la fecundación, es decir, la unión del espermatozoide con el óvulo dando lugar al cigoto. A partir de aquí comienza la Blastogénesis, la cual comprende dos procesos. Primero, la segmentación que hace referencia a la división y multiplicación mitótica que acontece en la trompa uterina y por la cual se diferencian varias etapas según el número de células y días de gestación. En este punto nos encontraríamos con un embrión bilaminar formado por dos capas superpuestas denominadas epiblasto e hipoblasto. Posteriormente, la gastrulación, etapa del desarrollo embrionario producida sobre la tercera semana que culmina con la formación de la gástrula. Esta se caracteriza por el paso de las capas germinales (epiblasto e hipoblasto), a las tres hojas fundamentales precursoras de los diferentes tejidos del embrión. El epiblasto contiene el material celular destinado a formar el ectodermo (parte más externa), mesodermo (capa intermedia) y endodermo (parte más interna), mientras que las células del hipoblasto desencadenan inductivamente el proceso de gastrulación, pero quedan luego excluidas del embrión propiamente dichas ^(1,2).

Por tanto, ahora el embrión trilaminar consta de tres capas, la primera que pertenece al resto del primitivo epiblasto pasando a llamarse ectodermo y del cual se desarrollarán la epidermis y el tejido nervioso central (cerebro y médula espinal) donde nos vamos a centrar. La segunda, formada por las células invaginadas que migran por la capa intermedia apartándose en todas direcciones de la línea primitiva formando el mesodermo, el cual, dará lugar al sistema musculoesquelético, tejido conjuntivo y aparatos renal y circulatorio y, en tercer lugar, el endodermo que ha desplazado en el techo de la vesícula vitelina al primitivo hipoblasto para posteriormente formar el tubo digestivo con sus correspondientes glándulas y aparato respiratorio ^(1,2).

A partir de este punto, mediante procesos de inducción e inhibición por señales moleculares tendrá lugar la especificación de los diferentes componentes del ectodermo. A este proceso se le denomina inducción neural, en el cuál la porción central del ectodermo se convierte en la placa neural que tras la neurulación primaria pasará a ser el tubo neural (esbozo del Sistema Nervioso Central) ^(1,2).

A continuación, en la parte rostral donde se encuentra el primordio encefálico, aparecen 3 dilataciones denominadas vesículas encefálicas primarias conocidas como prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. En este caso, nos vamos a centrar en el desarrollo del prosencéfalo, el cual, se divide en prosencéfalo secundario, que contendrá las dos vesículas secundarias denominadas telencéfalo, rostralmente (cerebro terminal), y diencéfalo, caudalmente (cerebro intermedio). Dejando a un lado el diencéfalo y siguiendo el desarrollo del telencéfalo observamos que ocurre una nueva división de los hemisferios telencefálicos. Por un lado, aparece el *pallio o techo* y por otro el *subpallio o base* ^(2,3).

Siguiendo con el desarrollo del cerebro y su formación, prosiguen las subdivisiones del subpallio y el pallio. Del primero se podrán observar las siguientes estructuras: pálido, estriado, zona innominada, región preóptica, parte ventral del septum y partes centromediales de la amígdala. Mientras que en el segundo observaremos cuatro zonas longitudinales denominadas *medial, dorsal, lateral y ventral* ^(2,4).

El pallio medial madura para dar origen al allocórtex hipocámpico y, el dorsal para formar una estructura de seis capas llamada isocórtex o neocorteza ^(2,4).

Mientras que de manera conjunta lateral y ventral forman parte de la corteza allocortical olfatoria junto con el bulbo olfatorio, con únicamente 3 capas, así como, poblaciones nucleares paliales y núcleos paliales de la amígdala (en este último también participa el medial) ^(2,4).

Esta parte del encéfalo, telencéfalo, se subdivide en los sistemas y complejos funcionales que se nombran a continuación:

- Sistema Olfatorio: formado por bulbo y tubérculo olfatorio, cortezas prepiriforme y piriforme y núcleos corticales de la amígdala. En el que centramos el presente trabajo.
- Hipocampo y estructuras relacionadas: septum precomisural y lóbulo límbico.
- Amígdala y claustró.
- Ganglios basales.
- Neocorteza.

Sistema olfatorio:

El bulbo olfatorio se sitúa sobre la lámina cribosa del hueso etmoides. Es el centro primario del sistema olfatorio actúa de lugar de relevo para todos los impulsos olfatorios que transcurren entre la mucosa olfatoria y los centros olfatorios superiores. Se trata de una masa sólida de estructura cortical concéntrica que se conecta mediante su tallo con el extremo anterior del tubérculo olfatorio en la base del encéfalo. El tallo lleva los axones de proyección del bulbo, que hacia su raíz se van haciendo superficiales, y forman la cintilla olfatoria. En la superficie, el tallo muestra una estructura allocortical olfatoria a su alrededor denominada área olfatoria anterior que recibe proyecciones del bulbo olfatorio y otras áreas olfatorias ^(5,7).

Otra de los componentes que conforman el sistema olfatorio es la corteza olfatoria secundaria. Es la región olfatoria más grande y se divide en zona prepiriforme y zona piriforme. Tiene semejanzas con la neocorteza pero presenta una composición más simple contando solo con 3 capas (paleocorteza). De ella hay proyecciones hacia la amígdala, hipocampo, hipotálamo, tálamo dorsal y neocorteza, todas ellas pertenecientes al prosencéfalo ^(5,7).

Las capas se suelen designar como I, II, III. La I es una capa plexiforme superficial que contiene escasa neuronas dispersas y, sobre todo, axones de recorrido tangencial y expansiones dendríticas ascendentes de las células piramidales y semilunares subyacentes. La capa II estaría formada por somas neuronales densamente agrupados y, por último, la III muestra una densidad celular moderada en las que se encuentran neuronas piramidales y multipolares (**Figura 1**) ⁽⁷⁾.

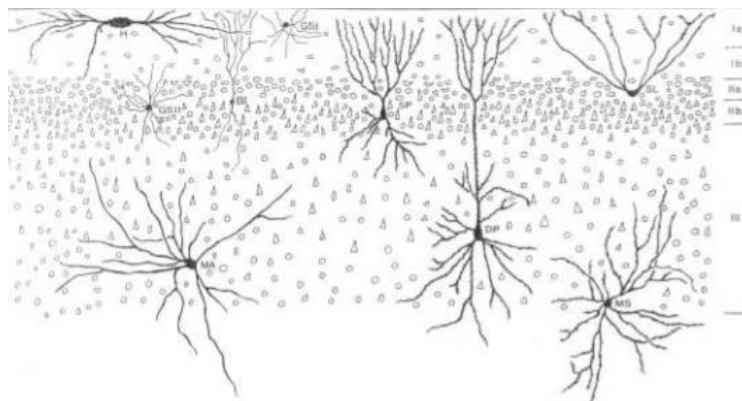


Figura 1: Citoarquitectura y principales tipos celulares de la corteza olfatoria primaria.

Relación con el sistema límbico:

La olfacción en algunos de los contextos desencadena potentes reacciones emocionales de agrado, desagrado, aversión y pulsión, teniendo tendencia a quedar el evento grabado en la memoria, aunque sea de forma inconsciente. A veces, un simple olor puede desencadenar el recuerdo de una compleja escena vivida anteriormente. Esto se debe a la conectividad directa de la corteza piriforme, que cubre a la amígdala, sobre sus núcleos paliales, que integran la memoria emocional, y sobre otras cortezas y formaciones límbicas. Esto permite una entrada al circuito del hipocampo y, por tanto, que la experiencia olfatoria sea grabada en la memoria junto a los demás detalles de la experiencia ⁽⁶⁾.

Patologías relacionadas con el olfato:

El sentido del olfato ayuda a disfrutar de la vida, y permite disfrutar de los aromas de sus comidas preferidas o la fragancia de las flores. También es un sistema de alerta, que avisa si hay señales de peligro, como una fuga de gas, alimentos que se han echado a perder o un incendio. Cualquier pérdida en el sentido del olfato, aunque sea mínima, puede tener un efecto negativo en la calidad de vida. También puede ser una señal de otros problemas de salud más serios ⁽⁸⁾.

Las personas con trastornos del olfato pueden sufrir una pérdida en la capacidad de oler o cambios en cómo perciben los olores ⁽⁸⁾.

- La hiposmia es una reducción en la capacidad para detectar olores.
- La anosmia es la total incapacidad para detectar olores. En raras ocasiones, se puede nacer sin el sentido del olfato, lo que se llama anosmia congénita.
- La parosmia es un cambio en la percepción normal de los olores, por ejemplo, cuando se distorsiona el olor de algo familiar, o cuando algo que normalmente le agradaba de repente se vuelve desagradable.
- La fantosmia es la sensación de percibir un olor que en realidad no está presente.

A pesar de la importancia del sistema olfatorio en la vida diaria (relacionado con el sistema límbico y con funciones tan importantes como la memoria) y de sus patologías (anosmia, parosmia), los

profesionales responsables de su rehabilitación y tratamiento tienen pocos conocimientos respecto a su formación, siendo interesante encontrar técnicas que nos permiten ampliarlos para lograr una intervención más eficaz.

Por tanto, es vital conocer con exactitud cómo se generan y conectan los diferentes componentes del mismo. Nos planteamos estudiar, usando el ratón como modelo, la formación de las conexiones olfatorias a lo largo del desarrollo embrionario. El fin de nuestro trabajo es profundizar en nuestro conocimiento del sistema olfatorio, validando técnicas experimentales, para así poder describir y entender los procesos patológicos.



HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Las técnicas inmunohistoquímicas contra Neurofilamento y los marcadores lipofílicos (DiI) son buenas herramientas para el estudio del desarrollo embrionario y postnatal del sistema olfatorio.

OBJETIVO:

Estudiar mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas contra Neurofilamento y marcadores lipofílicos (DiI) el desarrollo embrionario prenatal y postnatal de las conexiones en el sistema olfatorio para describir la formación de dichos tractos.



MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio ha sido realizado durante los meses de octubre y noviembre de 2017 entre los laboratorios 101, 102 y 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Realizamos un estudio observacional descriptivo de la conectividad del sistema olfatorio tomando para ello muestras de cerebro de ratón en estadios de desarrollo diferentes: embrionarios (E12.5, E15.5 y E18.5) y postnatales (P3).

Las técnicas utilizadas para realizar el estudio han sido la técnica de inmunohistoquímica y el marcador lipofílico DiI.

Origen de las muestras:

Los animales fueron obtenidos del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en concreto del animalario de la Unidad de Sant Joan de dicho servicio. Este animalario sigue el control ISO 9001/2008 y mantiene una excelente calidad en sus instalaciones y mantenimiento de las líneas animales. La manipulación de los ratones fue llevada a cabo por personal acreditado.

El estudio se ha efectuado siguiendo estrictamente la normativa que rige la experimentación con animales y el uso de organismos modificados genéticamente (Real Decreto 53/2013, Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea). Esta experimentación recibió el visto bueno del Órgano evaluador de proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche y la aprobación de la Generalitat Valenciana.

Criterios de selección:

Como único criterio de selección de los embriones se ha tenido en cuenta que sean animales silvestres de la cepa ICR (no consanguínea) y estar en los estadios de desarrollo embrionario y postnatal necesario (E12.5, E15.5, E18.5 y P3).

Obtención de las muestras:

Con el objetivo de obtener las muestras se utilizaron hembras preñadas en los días 12.5, 15.5 y 18.5 a las que se sacrificó por dislocación cervical y posnatales de 3 días a los que se decapitó previa anestesia. A continuación, se procedió a aislar los embriones del útero con la ayuda de una lupa estereoscópica (modelo LEICA® EZ4D). Seguidamente fueron limpiados en una solución salina de PBS (Phosphate Buffered Saline).

Técnica de inmunohistoquímica:

Una vez obtenidos los cerebros se procedió a su fijación en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS donde permanecieron a 4°C durante 24 horas los estadios embrionarios y 72 horas los postnatales. Tras la fijación, las muestras se lavaron en PBS (2 cambios de 40 minutos) y a continuación fueron deshidratadas progresivamente en etanol 25%, 50%, 70% y 100% (1 cambio de 40 minutos en cada alcohol excepto en el de 100% que se realizaron 2) y almacenados hasta su posterior selección y uso.

Antes de comenzar la técnica descrita a continuación, se rehidrataron (siguiendo el proceso inverso a la deshidratación) y se procedió a la inclusión en agarosa. En primer lugar, preparamos 100 ml de Agarosa al 4%. Con la agarosa líquida, se incluyó el embrión en una placa Petri y se orientó en el plano de corte seleccionado (sagital y coronal). Una vez fría y solidificada la agarosa, se talló el bloque y se procedió a su sección, realizándose los cortes con un vibratomo (LEICA ® VT1000S) utilizando un grosor de 100µm para cada sección.

Se usó esta técnica con el fin de detectar la expresión de las proteínas objeto de interés, ya que, es capaz de reconocer una gran variedad de antígenos presentes en las células. Se basa en aplicar un anticuerpo primario al tejido que reconozca la proteína a estudio, para después añadir un anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconozca el anticuerpo primario, amplificando así la señal y posibilitando el revelado posterior.

Esta técnica permite detectar una variedad de antígenos presentes en las células (en este caso neuronas). Se basa en aplicar un anticuerpo primario al tejido que reconozca la proteína de interés, para después añadir un anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconozca el anticuerpo primario, amplificando así la señal y posibilitando el revelado posterior. En este caso la proteína a estudiar fue únicamente Neurofilamento.

Una vez obtenidos los cortes, se colocaron en una placa multipocillo y fueron lavados en PBS con tritón (PBST) al 0,1% (tres repeticiones de 10 minutos). A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido con H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se utilizó lisina al 10% en PBST. El anticuerpo primario, Neurofilamento, se incubó a la concentración indicada en albúmina de suero bovino (BSA) al 1% con azida al 0,1% en PBST. Se dejó actuar durante una noche a temperatura ambiente (en la **Tabla 1** se detalla la concentración a la que se usó el anticuerpo y qué anticuerpo secundario se utilizó).

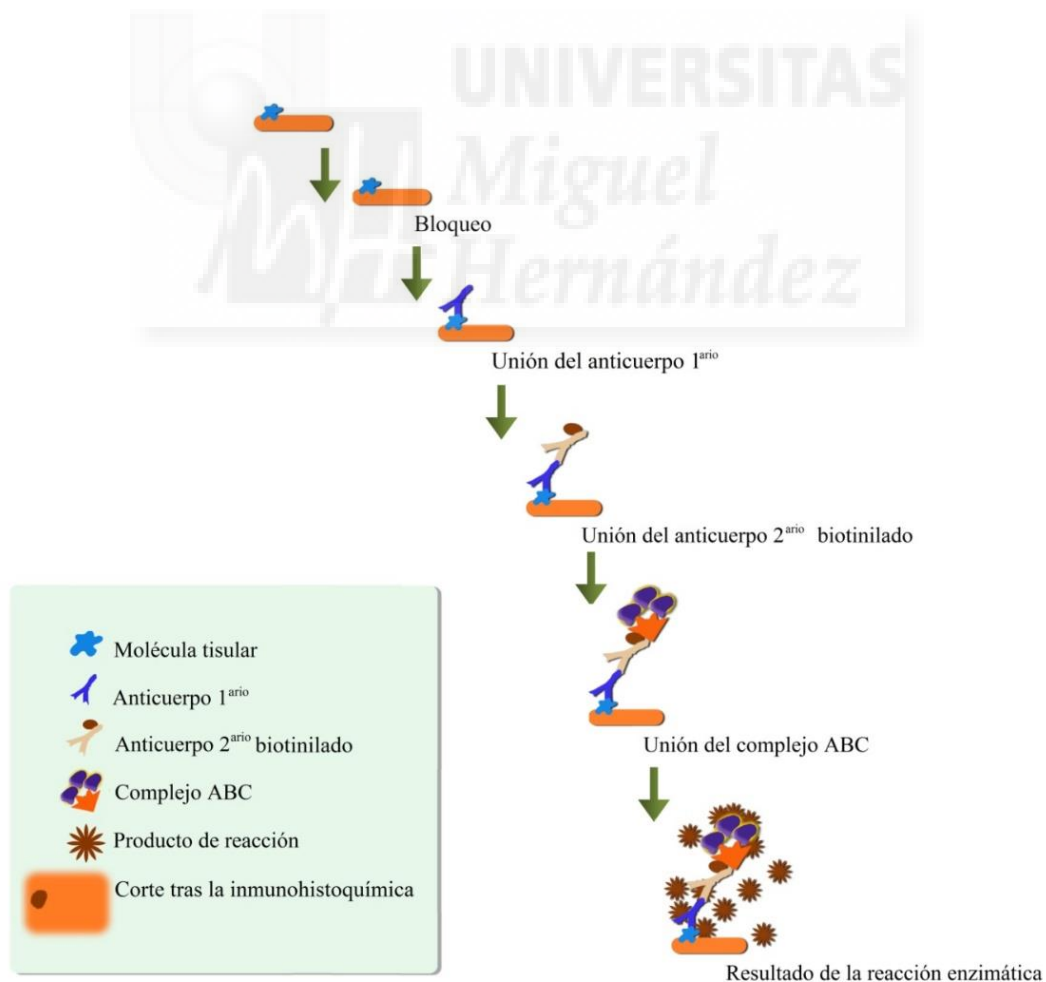
Anticuerpo	Concentración	Anticuerpo 2 ^{ario}	Casa comercial
α NF	1/800	α Rabbit	Abcon ab-64300

Al día siguiente se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron los cortes varias veces en PBST. Se usó el anticuerpo secundario biotinilado a 1:200 de concentración en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBST se añadió el complejo ABC (Avidin Biotin Complex) de Vector Laboratories ® a la concentración de 1:300 en PBST. Este complejo contiene avidina y la peroxidasa del rábano biotinilada. La avidina tiene una gran afinidad por la biotina y forma un complejo donde se unen la peroxidasa biotinilada a la avidina dejando al menos un sitio de unión libre para la biotina del anticuerpo secundario. Al añadirlo, la avidina se une al secundario biotinilado y ancla la peroxidasa al lugar de expresión de la proteína. Para el revelado se usó como substrato de la peroxidasa 1 ml de diaminobenzidina (DAB) con H₂O₂ al 0,6% y 0,025 mg de níquel

por cada 100ml de PBS. El níquel provoca que el precipitado aparezca de color negro en vez del marrón habitual de la DAB. Se muestra un esquema de este proceso en la **Figura 2**. Técnica de inmunohistoquímica. La reacción se paró con PBS.

Los cortes fueron ordenados y montados en portaobjetos y se deshidrataron en una serie creciente de etanoles hasta llevarlos a 100% etanol, desde donde se pasaron a xilol, para luego montarlos con Eukitt® (cubreobjetos) y dejarlos secar varios días en una estufa a 37°C.

Figura 2. Técnica de inmunohistoquímica.



DiI Procedimiento:

Una vez lavados los cerebros (tres por cada estadio E15.5, E18.5 y P3), con ayuda de un filamento de tungsteno insertamos los DiI en el bulbo olfatorio (aproximadamente 4 cristales por cada bulbo repartidos por toda su superficie). Una vez colocados, dejamos los cerebros inmersos en PFA en una estufa de 37°C durante 10 días.

Terminado este periodo se incluyeron en agarosa (como previamente se ha explicado) y se realizaron cortes coronales de 300µm en el vibratomo anteriormente mencionado. Obtenidos los cortes se montaron en portaobjetos y se cubrieron con Mowiol ® (Sihma, 324590-100G).

Realización de figuras:

Para visualizar las muestras se utilizó el microscopio estereoscópico (modelo LEICA® MZ 16FA) y para realizar las fotografías se utilizó una cámara digital de alta resolución (modelo LEICA® DFC550). Posteriormente, se llevó a cabo el tratamiento de fotos con el software de edición de imagen Adobe Photoshop CS6 y se montaron las figuras con el programa de maquetación Adobe Illustrator CS6.

RESULTADOS:

Los resultados que hemos obtenido al observar los cortes se describen a continuación de cada figura.

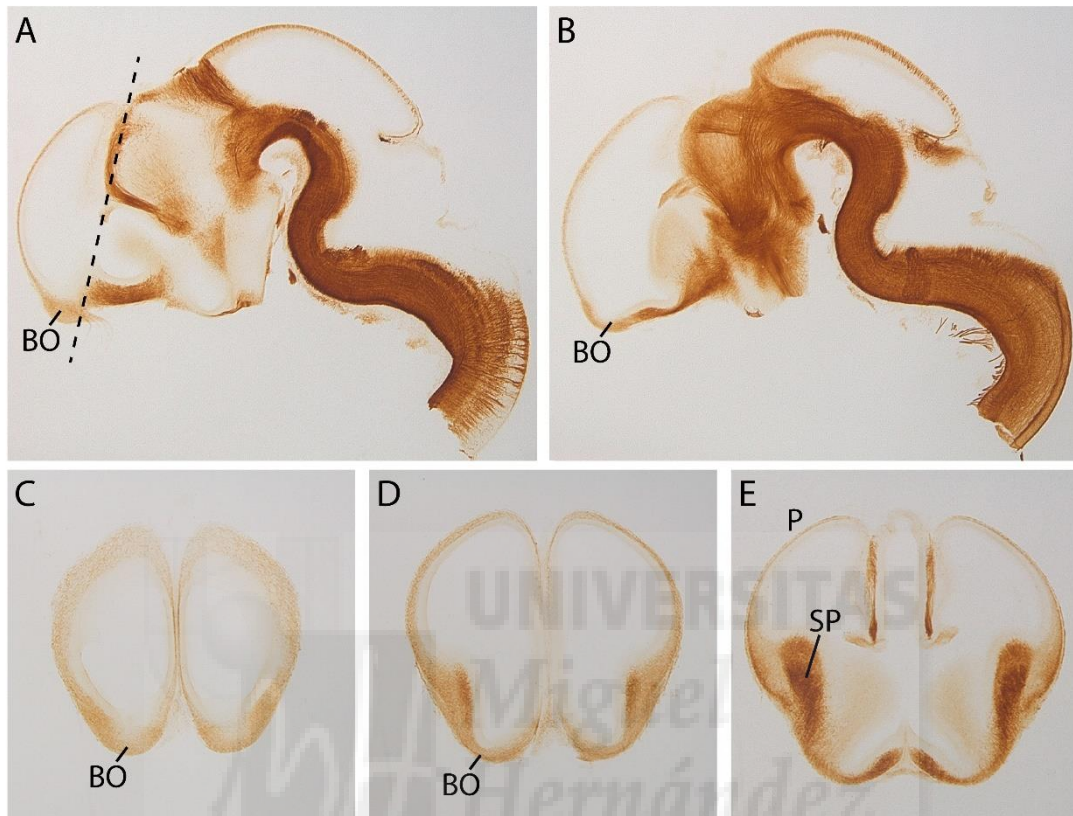


Figura 3. Inmunohistoquímica con α NF en cortes de cerebros de embriones (E12.5). La línea punteada en la Fig. 3A nos indica el plano de corte. A, B: Corte sagital; C-E: corte coronal de rostral a caudal. Abreviaciones: BO: bulbo olfatorio; P: palio; SP: subpalio.

En la **Figura 3** se muestran cortes de cerebro de ratón en estadio 12.5 a los que se le ha realizado la técnica de inmunohistoquímica contra Neurofilamento. Se puede apreciar en los cortes sagitales, como comienza a aparecer en el área telencefálica una estructura abombada de pequeño tamaño que dará lugar al bulbo olfatorio del cual salen pequeñas ramificaciones nerviosas que tienen su origen en las células nerviosas del epitelio olfatorio (**Fig. 3A**). En niveles más laterales comprobamos como en el bulbo olfatorio se forma una evaginación, ya que el ventrículo lateral se extiende dentro de él (**Fig. 3B**).

En las siguientes imágenes, vemos una secuencia de cortes coronales ordenados de rostral a caudal (la línea punteada en la **Fig. 3A** nos indica el plano de corte) donde observamos cómo se va evaginando el bulbo y a la vez como se van empezando a diferenciar las primeras neuronas ya que aparece marcaje para Neurofilamento (**Fig. 3C-E**).

Por otro lado, estos cortes nos permiten apreciar las subdivisiones de la vesícula telencefálica en sus dos componentes: palio y subpalio (**Fig. 3E**). Recordamos que el bulbo olfatorio pertenece a la región palial.

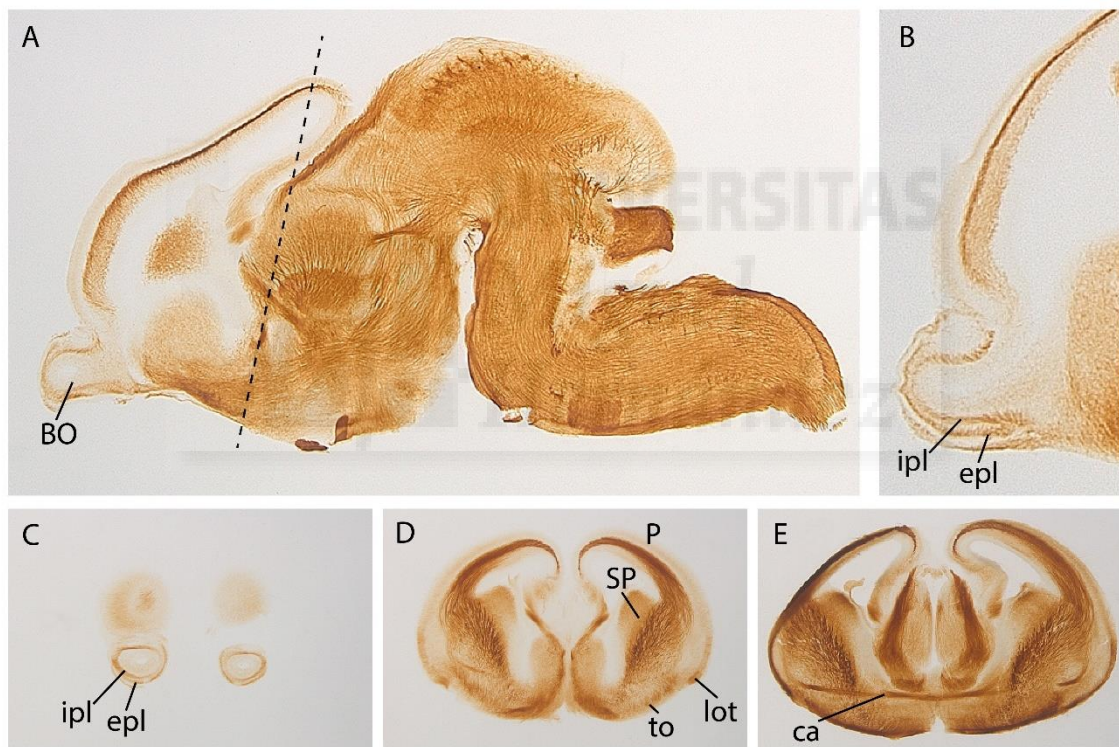
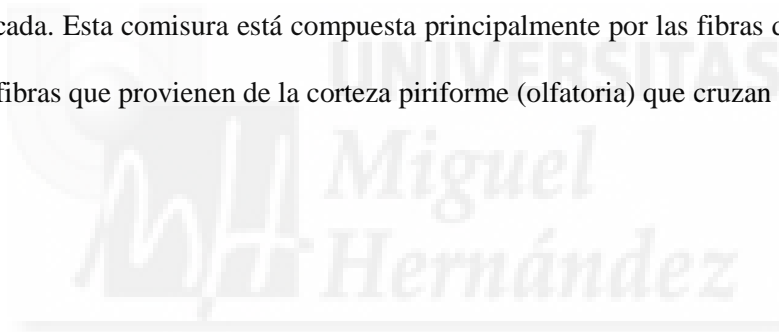


Figura 4. Inmunohistoquímica con α NF en cortes de cerebros de embriones (E15.5). La línea punteada en la Fig. 4A nos indica el plano de corte. A, B: Corte sagital; C-E: corte coronal de rostral a caudal. Abreviaciones: BO: bulbo olfatorio; P: palio; SP: subpalio; ipl: capa plexiforme interna; epl: capa plexiforme externa; to: tubérculo olfatorio; lot: tracto olfatorio lateral; ca: comisura anterior.

En los cortes sagitales, en el estadio E15.5, podemos apreciar como el bulbo olfatorio ha aumentado de tamaño con respecto al estadio anterior y ya se pueden distinguir las capas plexiformes interna y externa que lo componen, entre otras (**Fig. 4A, B**). Estas capas aparecen positivas ya que contienen una alta densidad de fibras. En un corte coronal anterior, apreciamos la estructura laminar de los bulbos olfatorios en los que de nuevo se puede observar claramente el marcaje positivo de estas dos capas (**Fig. 4C**).

Además, en este estadio podemos diferenciar en un corte posterior, como aparecen de manera más marcada el tracto olfatorio lateral mientras recorre de rostral a caudal la vesícula telencefálica buscando sus regiones diana (**Fig. 4D**). Podemos resaltar también como a la región donde se localiza el tubérculo olfatorio, comienzan a llegar terminales olfatorios, aunque todavía en este estadio el marcaje es poco intenso (**Fig. 4D**). Por último, en el corte más caudal se observa la comisura anterior fuertemente marcada. Esta comisura está compuesta principalmente por las fibras de la estría olfatoria medial y por las fibras que provienen de la corteza piriforme (olfatoria) que cruzan al otro hemisferio.



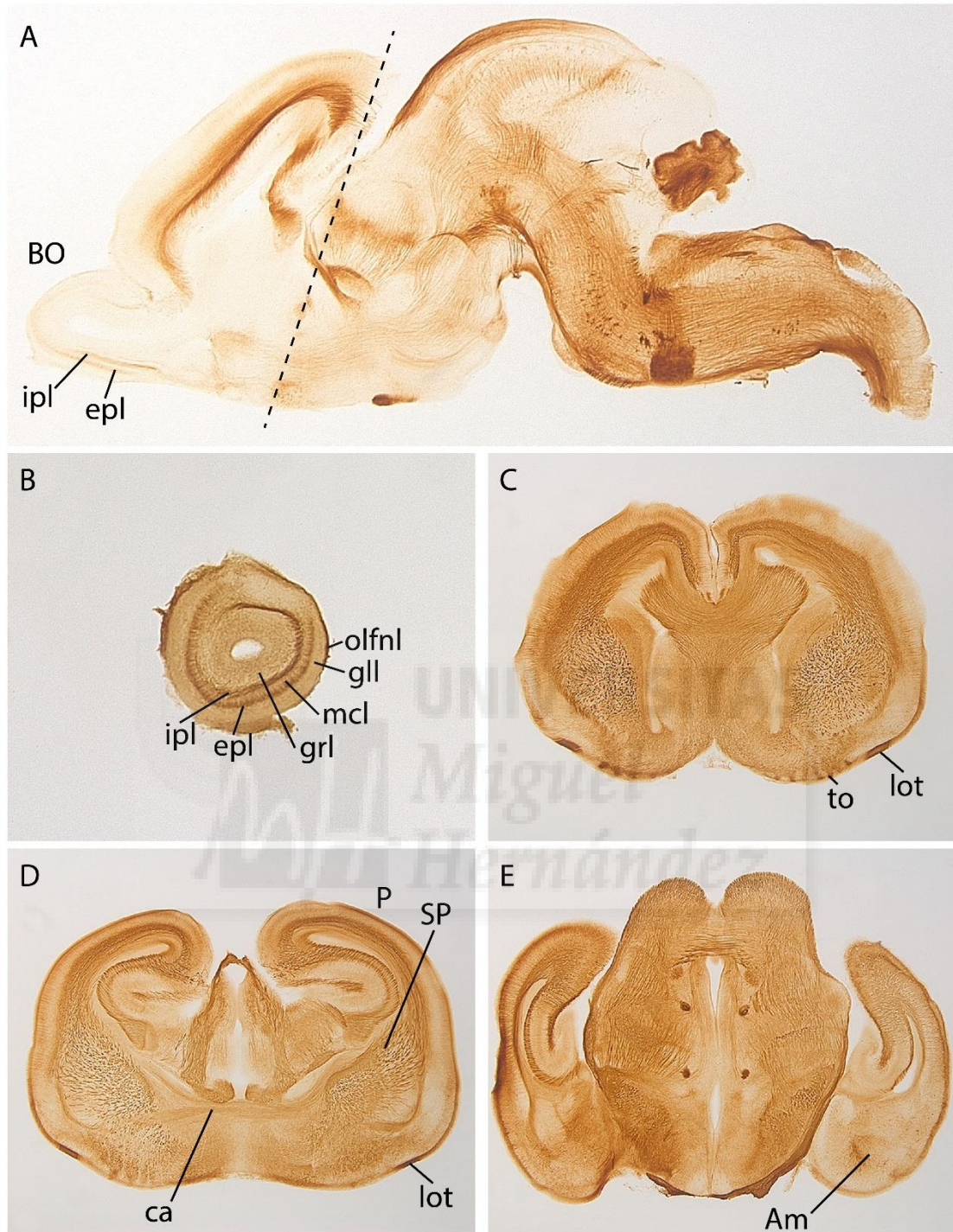
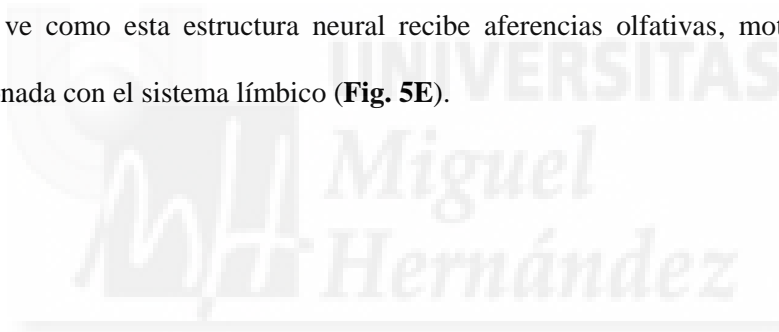


Figura 5. Inmunohistoquímica con α NF en cortes de cerebros de embriones (E18.5). La línea punteada en la Fig. 5A nos indica el plano de corte. A: Corte sagital; B-E: corte coronal de rostral a caudal. Abreviaciones: BO: bulbo olfatorio; P: palio; SP: subpalio; ipl: capa plexiforme interna; epl: capa plexiforme externa; to: tubérculo olfatorio; lot: tracto olfatorio lateral; ca: comisura anterior; am: amígdala; olfnl: capa del nervio olfatorio; gll: capa glomerular; mcl: capa de células mitrales; grl: capa de células granulosas.

Avanzando en el desarrollo embrionario prenatal, en el estadio E18.5 podemos observar en un corte sagital la extensión del bulbo olfatorio y como se mantiene el ventrículo lateral dentro del mismo (**Fig. 5A**). En un corte coronal del bulbo olfatorio podemos ver todas sus capas concéntricas. De exterior a interior podemos observar en primer lugar la capa del nervio olfatorio seguida de la capa glomerular, después observamos la capa plexiforme externa, la capa de células mitrales, capa plexiforme interna y, por último, la capa de células granulosas (**Fig. 5B**).

En un corte más posterior, volvemos a detectar el tracto olfatorio lateral con un marcaje más intenso que en el estadio anterior y en el tubérculo olfatorio podemos destacar como aparecen los Islotes de Calleja con una gran inervación por parte de las fibras provenientes del bulbo olfatorio (**Fig. 5C**). En un nivel más caudal podemos ver de nuevo la comisura anterior con sus dos componentes positivos (**Fig. 5D**). En la región más posterior de la vesícula telencefálica podemos observar la localización de la amígdala. Se ve como esta estructura neural recibe aferencias olfativas, motivo por el cual se encuentra relacionada con el sistema límbico (**Fig. 5E**).



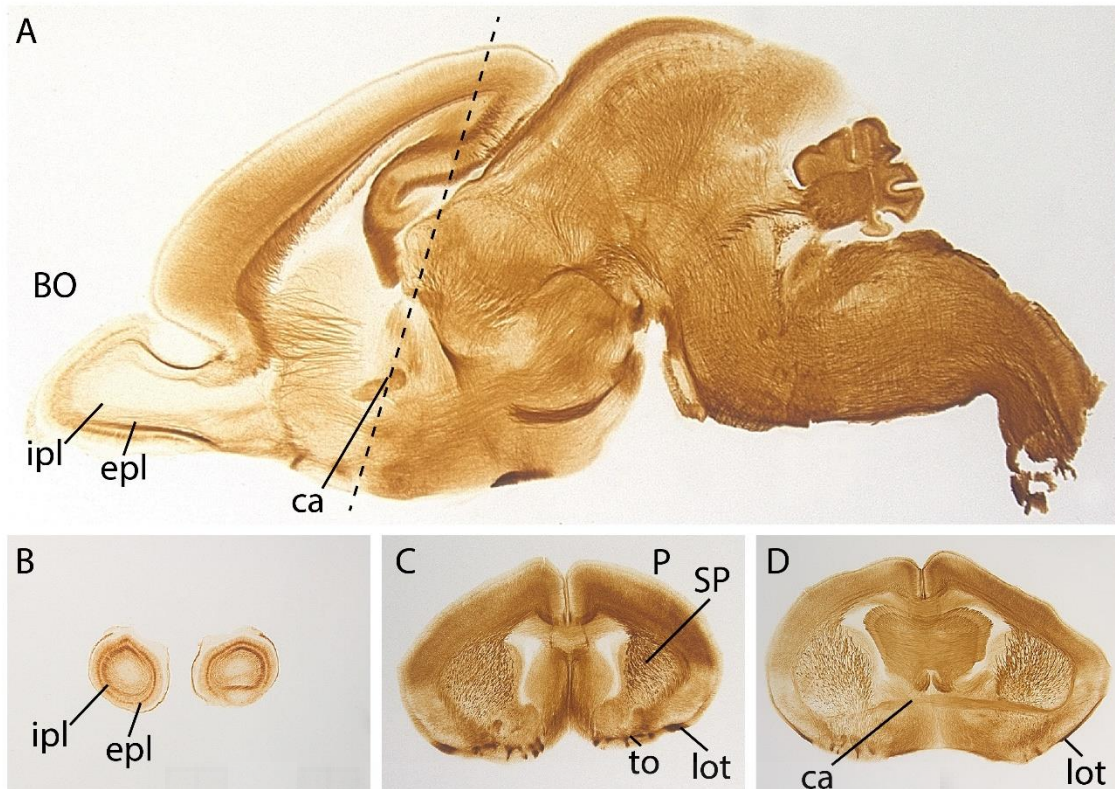


Figura 6. Inmunohistoquímica con α NF en cortes de cerebros de embreros (E18.5). La línea punteada en la Fig. 6A nos indica el plano de corte A: Corte sagital; B-E: corte coronal de rostral a caudal. Abreviaciones: BO: bulbo olfatorio; P: palio; SP: subpalio; ipl: capa plexiforme interna; epl: capa plexiforme externa; to: tubérculo olfatorio; lot: tracto olfatorio lateral; ca: comisura anterior.

Para terminar nuestro patrón de expresión de Neurofilamento, procedimos a analizar un estadio postnatal. En concreto, tres días después del nacimiento (P3). Podemos considerar que en este punto todo el sistema olfatorio está plenamente establecido. En un corte sagital podemos ver el bulbo olfatorio plenamente generado y como el espacio ventricular ha desaparecido, ya que ahora está ocupado por las fibras neuronales que se dirigen a la corteza olfatoria (**Fig. 6A**). En un corte transversal del bulbo podemos volver a detectar las capas de este y como la proteína Neurofilamento se distribuye especialmente en las dos capas plexiformes (**Fig. 6B**). En un nivel posterior, vemos el tubérculo olfatorio desarrollado con los islotes de Calleja fuertemente inervados, así como la estría olfatoria lateral, que se dirige caudalmente a la corteza piriforme (**Fig. 6C**). Por último, en el nivel más

caudal podemos ver la comisura anterior marcada, lo que nos indica la participación de las fibras olfatorias (**Fig. 6D**).

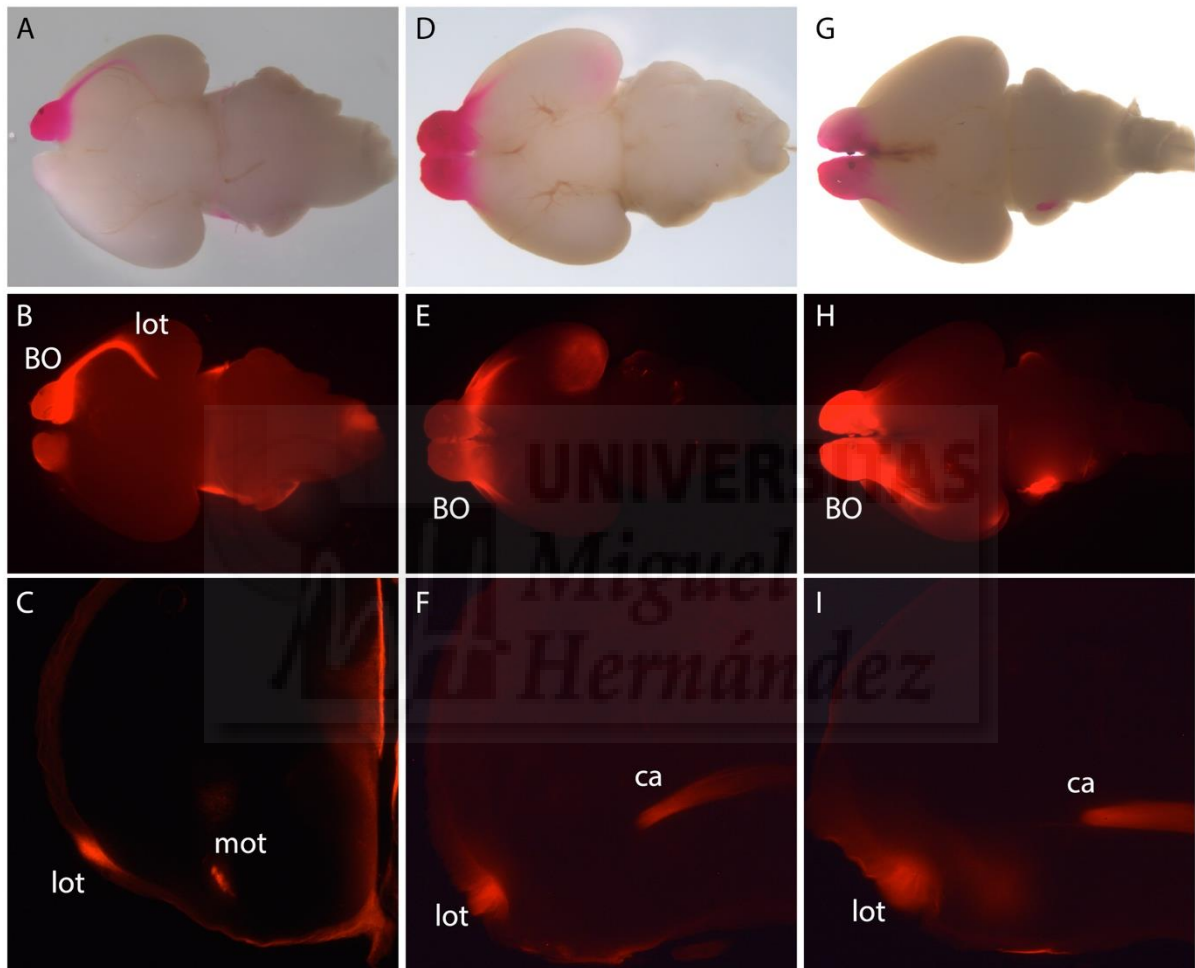


Figura 7. Cristales DiI implantados en bulbo olfatorio. A, B, Vista ventral de embriones (E15.5); C, corte coronal del cerebro mostrado en A. D, E, Vista ventral de embriones (E18.5); F, corte coronal del cerebro mostrado en D. G, H Vista ventral de un encéfalo postnatal (P3); I, corte coronal del cerebro mostrado en G. El marcaje de los bulbos olfatorios nos permite observar el tracto olfatorio lateral, medial y la comisura anterior. Abreviaciones: BO: bulbo olfatorio; to: tubérculo olfatorio; lot: tracto olfatorio lateral; mot: tracto olfatorio medial; ca: comisura anterior.

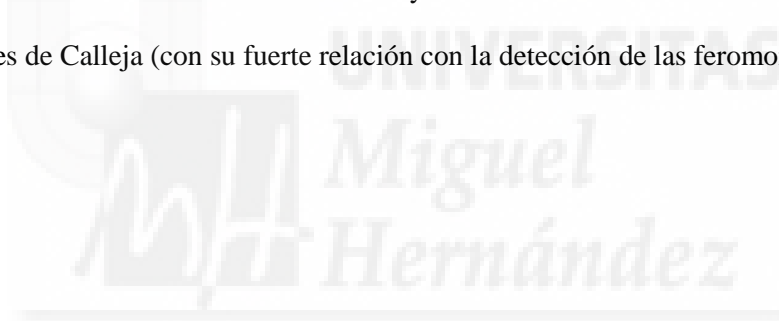
Para concluir la experimentación de este trabajo, procedí a implantar cristales lipofílicos de DiI en los bulbos olfatorios para comprobar como los tractos descritos previamente tienen su origen en dicho bulbo. Implanté los cristales en estadios E15.5, E18.5 y P3. En el primer estadio podemos observar el bulbo fuertemente marcado y como parten de él unas fibras que se corresponden con el tracto olfatorio lateral (**Fig. 7A y B**). En cortes transversales de la misma muestra podemos ver como las fibras del tracto olfatorio medial se van acercando a la línea media para conformar la comisura anterior (**Fig. 7C**). En el estadio E18.5, volvemos a observar claramente el tracto olfatorio lateral (**Fig. 7D y E**) y como en el corte transversal es fácilmente detectable la comisura anterior cruzando al lado contralateral (**Fig. 7F**). Por último, en el estadio postnatal P3 detectamos un tracto olfatorio lateral plenamente desarrollado (**Fig. 7G y H**) y en el corte transversal la dimensión final de este tracto y de la comisura anterior (**Fig. 7I**).



DISCUSIÓN:

A pesar de que ambas herramientas han resultado de gran utilidad, cabe decir que la técnica de inmunohistoquímica es un procedimiento mucho más preciso, ya que al usar un anticuerpo específico contra una proteína localizada de estas proyecciones nos da una identificación precisa. El DiI, en cambio, al ser una sustancia lipofílica es absorbida por todas las células próximas al implante. Esto hace que aparezcan regiones teñidas que no son específicas de este sistema. De hecho, largas incubaciones provocan un gran aumento en el marcaje inespecífico.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido describir en detalle cómo se conectan y en qué momento, los diferentes componentes del sistema olfatorio. Por un lado, hemos observado desde los primeros estadios la aparición del bulbo olfatorio, luego hemos detectado los dos grandes componentes de fibras que parten desde el bulbo (tracto olfatorio medial y lateral). Posteriormente detectamos la formación de la comisura anterior y la fuerte inervación del tubérculo olfatorio, en especial los islotes de Calleja (con su fuerte relación con la detección de las feromonas).



CONCLUSIONES:

Tras la finalización del trabajo, se puede concluir que hemos logrado el objetivo propuesto en el mismo. Las dos técnicas empleadas son válidas para el estudio de la conectividad del sistema olfatorio, ya que, se han podido detectar de forma clara las fibras que lo conforman en todos los estadios estudiados. La inmunohistoquímica realizada contra Neurofilamento presenta una mayor especificidad que el marcador lipofílico DiI.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Morfogénesis temprana del SNC: Inducción neural y neurulación. Cresta neural. Vesiculación y segmentación. Incurvación del eje neural. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p.43-52.
2. Nieuwehuys R, Voogd J, Van Huijzen C. Desarrollo. En: Nieuwehuys R, Voogd J, Van Huijzen C. El sistema nervioso central humano. Madrid: Medica Panamericana; 2009. p.7-52.
3. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Morfogénesis de las vesículas telencefálicas. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p.58-65.
4. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Telencéfalo. Regiones histogenéticas. Palio y subpalio. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. P.193-201.
5. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Corteza cerebral: isocórtex y allocórtex. Tipos y áreas isocorticales. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p.202-210.
6. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Allocórtex olfatorio y su mesocórtex. Vía olfatoria. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p.216-222.
7. Nieuwehuys R, Voogd J, Van Huijzen C. Telencéfalo: introducción y sistema olfatorio. En: Nieuwehuys R, Voogd J, Van Huijzen C. El sistema nervioso central humano. Madrid: Medica Panamericana; 2009. p.337-355.
8. Trastornos del olfato [Internet]. NIDCD. 2018 [cited 19 April 2018]. Available from: <https://www.nidcd.nih.gov/es/espanol/trastornos-del-olfato>.