

## FORMACIÓN DE GLOMÉRULOS OLFATORIOS EN RATÓN DURANTE EL DESARROLLO *IN SITU*

Delsy Dávila-Vera<sup>a\*</sup>, Zulma Peña-Contreras<sup>a</sup>, Alirio Balza-Quintero<sup>a</sup>, Leisalba Zavala-Morillo<sup>a</sup>,  
Emilitza Labarca-Villasmil<sup>a</sup>, Henry Andrade-Ruiz<sup>b</sup>, Rosa Virginia Mendoza-Briceño<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios-Prü”, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

<sup>b</sup>Dirección General de Planificación y Desarrollo, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

\*Autor de Correspondencia: Delsy Dávila Vera. Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios-Prü”.  
Fax: 0274-2403156. E-mail: [delyda@ula.ve](mailto:delyda@ula.ve)

Recibido: Marzo 2012. Aprobado: Julio 2012

Publicado: Julio 2012

### RESUMEN

Se hace el análisis de diferenciación y maduración de los glomérulos olfatorios de ratones entre 17 días de edad embrionaria y 9 días de edad postnatal, utilizando el método de Golgi y análisis ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión. La capa plexiforme del bulbo olfatorio de ratones E17 tiene una neuropila muy laxa con una alta proporción de elementos gliales y escasa cantidad de trayectos axónicos provenientes del nervio olfatorio. Al día E19, las fibras aferentes a los glomérulos se organizan, logrando su máxima expresión morfológica un día después del nacimiento cuando alcanzan su sitio definitivo. A partir del día P3 se evidencian los primeros indicios de conformación de los glomérulos como expresión de la interacción de los diversos elementos neuronales que lo conforman, observándose una disminución de los elementos gliales; características que se consolidan al día P5 cuando aumenta la densidad de la neuropila y se ven las estructuras neuronales interactuando más estrechamente aunque sin llegar a establecer verdaderas sinapsis. Es a partir del día P7 cuando la estructura glomerular, morfológicamente está bien establecida y al día P9 muestra su capacidad funcional como lo demuestra la presencia de verdaderos contactos sinápticos. Estadísticamente se comprobó que entre los días E17 y P5 el diámetro glomerular aumentó en 60,53%, mientras que entre P5 y P9 fue de 15,7%, corroborando que la primera fase es de crecimiento y diferenciación y la segunda es de maduración y conformación definitiva del glomérulo. El modelo experimental permitió determinar el proceso maduracional citológico del glomérulo olfatorio.

**Palabras claves:** glomérulos, bulbo olfatorio, desarrollo *in situ*.

### DEVELOPMENT OF OLFACTORY GLOMERULI IN NEONATAL MICE FORMED *IN SITU*

#### ABSTRACT

The differentiation and maturation of the olfactory glomeruli of mice from 17 days and 9 days of postnatal age, are here analysed, using the Golgi method and ultrastructural analysis by transmission electron microscopy. Plexiform layer of the mouse olfactory bulb of E17 has a very loose neuropil with a high proportion of glial elements and a limited number of axon routes from the olfactory nerve. On E19, afferent fibers to the glomeruli are better organized, and achieve their best morphology one day after birth, when they reach their final site. From P3, the first signs of glomerulus formation, as a manifestation of interacting the various neural elements that comprise it, are observed, with a decrease in the glial elements; such features are consolidated at P5, when density increases neuropil and neuronal structures can be seen interacting more closely, but without establishing real synapses. It is from P7 when the glomerular structure is well formed morphologically, and on the P9, the functional capacity as demonstrated by the presence of true synaptic, can be observed. Statistically it was found that between days E17 and P5 glomerular diameter increased by 60.53%, while between P5 and P9 was 15.7%, confirming that the first phase is growth and differentiation, and the second is maturing and final form of the glomerulus. The experimental model allowed us to determine the cytological maturational process of the olfactory glomerulus.

**Keywords:** glomeruli, olfactory bulb, formation *in situ*.

### INTRODUCCIÓN

El bulbo olfatorio, centro de enlace entre la periferia y los centros cerebrales superiores, citoestructuralmente está constituido por un circuito neuronal sencillo pero de una alta complejidad funcional determinada por las interacciones establecidas entre las células mitrales, células en penacho, células granulosas anaxónicas y células periglomerulares, además de las fibras nerviosas olfatorias que provienen de la mucosa olfativa y que convergen hacia las dendritas de las células mitrales y células en penacho para formar los denominados glomérulos del bulbo olfatorio. Toda la información procesada por este circuito neuronal bulbar, emerge a través de los axones de las células mitrales que forman la cintilla olfatoria que se dirige a los centros cerebrales [1,2].

A pesar que se ha reportado la existencia de alteraciones del sistema olfatorio en algunas enfermedades, fundamentalmente neurológicas y hepáticas, tales como Parkinson, Alzheimer, síndrome de Korsakoff, síndrome de Down, infecciones por VIH, encefalopatía hepática y síndrome de Kallmann [3-10], son pocos los estudios histológicos y ultraestructurales que existen al respecto y que aportarían información sobre los cambios citológicos que ocurren en estas situaciones patológicas. Esto nos ha motivado a profundizar, experimentalmente, en el estudio del bulbo olfatorio, haciendo énfasis en la etapa de formación o neurogénesis, para tratar de aproximarnos al conocimiento sobre el mecanismo de formación de las conexiones interneuronales y sus procesos de plasticidad en las diferentes etapas del desarrollo del bulbo olfatorio y tener un patrón normal de comparación en casos de enfermedades [11-16].

Histológicamente en el bulbo olfatorio después del nacimiento se distinguen seis capas: la del nervio olfatorio, la glomerular, la plexiforme externa, la de las células mitrales, la plexiforme interna y la de células granulosas. Los axones que llegan desde la periferia al

bulbo olfatorio hacen contacto, a nivel de los glomérulos olfatorios, con las dendritas de las células mitrales y de las células en penacho. Además, el bulbo olfatorio recibe información desde otras zonas del sistema nervioso central como son el locus ceruleus, los núcleos del rafe, el núcleo olfatorio anterior y el bulbo olfatorio contralateral. Por su parte, las células de la corteza olfatoria establecen conexiones con el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme y la corteza entorrinal lateral. Estas fibras de asociación se distribuyen en la corteza olfatoria.

Los glomérulos olfatorios constituyen el primer sitio de relevo del sistema nervioso central para el procesamiento de la información olfativa, al establecerse allí las primeras sinapsis entre los axones de las neuronas sensoriales olfativas del epitelio nasal y las prolongaciones neuronales propias del bulbo olfatorio [17-21]. Según diversos autores, las células periglomerulares cumplen una importante función en la conformación de la información olfativa, ya que ellas son las responsables de modular y transferir la información a las células mitrales [22-30].

El objetivo del presente trabajo es analizar, desde el punto de vista morfo-estructural, el proceso de formación y maduración de los glomérulos olfatorios, utilizando como modelo ratones NMRI de edades prenatal tardías y postnatal tempranas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se extrajeron bulbos olfatorios de ratones NMRI de 17, 19 y 21 días de edad embrionaria (E) y de 0, 1, 3, 5, 7 y 9 días de edad postnatal (P), suministrados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes. Los animales seleccionados para el estudio fueron tratados de acuerdo a la Reglamentación del Comité de Bioética del referido Bioterio, enmarcada en las exigencias establecidas en las Normas para la utilización de

animales en investigación contenidas en el Código de Bioética y Seguridad del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT-Caracas, Venezuela) y por el NIH (National Institute of Health-USA).

Las hembras de ratones en gestación (dos por cada edad gestacional) y los ratones de edad postnatal (cinco por cada edad) fueron anestesiados con Ketamina<sup>R</sup> a una dosis de 240 mg/Kg-peso. A las hembras de ratones con los tiempos de gestación programados, se les practicó una incisión abdominal para exponer el útero y extraer los embriones, los cuales fueron colocados inmediatamente en solución fijadora. Posteriormente, se procedió a extraer los bulbos olfatorios tanto de los embriones como de los ratones de edad postnatal, haciendo una incisión antero-posterior y otra latero-lateral en el tercio anterior del cráneo, lo cual permite la exposición de la región bulbar. Los bulbos olfatorios fueron inmediatamente sometidos al proceso de fijación, siguiendo dos modalidades: impregnación con el método cromo-argéntico de Golgi y estudio ultraestructural.

Para la impregnación cromo-argéntica los bulbos olfatorios fueron transferidos a la mezcla cromante Golgi 44 [31-35], preparada en el momento previo a ser utilizada y compuesta por 44 ml de solución acuosa de dicromato de sodio al 2%, 2 ml de glutaraldehído al 50%, 3ml de formaldehído al 37% y 1 ml de ácido acético glacial. Los tejidos fueron fijados durante un tiempo promedio de 24h, después del cual se lavaron con abundante agua destilada y se incubaron en una solución acuosa de nitrato de plata al 1,5% durante un mínimo de 16h.

Después, los bulbos olfatorios fueron lavados varias veces con agua destilada y sumergidos en alcohol isopropílico al 80%. Se hicieron cortes de un espesor promedio de 50  $\mu$ m utilizando un microtomo Sorvall JB-

4. Se completó la deshidratación de los cortes utilizando alcohol isopropílico al 90% y al 100% y se clarificaron con xilol. La observación se hizo a través de un microscopio fotónico Polyvar Reichert Jung, utilizando un sistema fotográfico con digitalización incorporada.

Para el análisis ultraestructural los bulbos olfatorios fueron seccionados en fragmentos de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup> y sumergidos en mezcla fijadora 3:3 (glutaraldehído al 3% más formaldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3) [36], a 4°C, condiciones en las cuales se preservaron durante 12h, luego fueron lavados con abundante tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3, para después ser postfijados durante 18h en tetróxido de osmio al 1% preparado en la misma solución tampón. Después fueron lavados nuevamente en solución tampón y se realizó el proceso de deshidratación con alcohol etílico a concentraciones ascendentes e infiltración epoxídica.

Posteriormente, el material fue incluido en resina epoxídica y se llevó a una estufa, a 60°C, durante 48h. Se hicieron cortes gruesos de 1 a 2  $\mu$ m de espesor y cortes ultrafinos de 90 nm de espesor, para ser observados con microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión, después de haber sido contrastados con p-fenil-endiamina y con acetato de uranilo y citrato de plomo, respectivamente [37-39]. Las secciones fueron realizadas utilizando un Ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B y fueron observados en un microscopio fotónico Polyvar Reichert Jung y en un microscopio electrónico Hitachi H-7000.

Se realizaron mediciones de los diámetros de los glomérulos olfatorios y los resultados se analizaron aplicando el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) [40] para valorar las diferencias estadísticamente significativas en los promedios de dichos diámetros. Además, se hicieron comparaciones con la prueba de

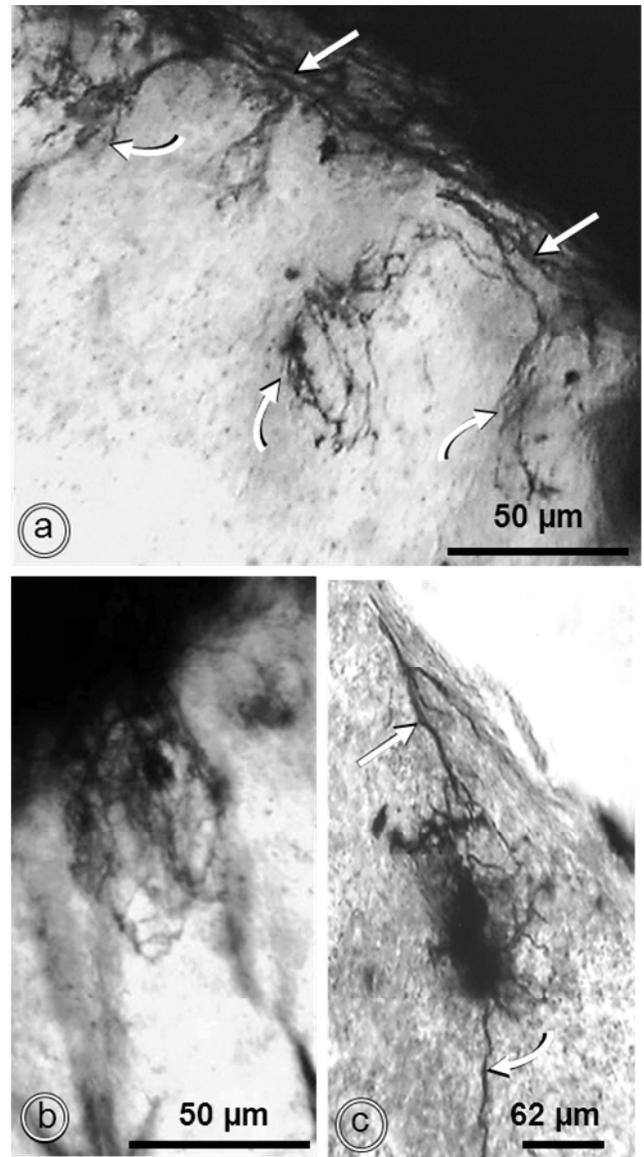
Tukey, para ello fue utilizado el programa estadístico SPSS versión 15.

Los valores obtenidos se expresaron en promedio de media  $\pm$  error estándar (Promedio $\pm$ DE), tomando el 95% como índice de confiabilidad estadística ( $p < 0,05$ ). Se compararon los resultados de los análisis estadísticos para determinar si existía o no relación entre el diámetro de los glomérulos con el incremento de las edades de los ratones estudiados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los glomérulos olfatorios constituyen el primer sitio de relevo del sistema nervioso central para el procesamiento de la información olfativa, al establecerse allí el inicio de las sinapsis entre los axones de las neuronas sensoriales olfativas del epitelio nasal y las dendritas de las células mitrales y células en penacho, moduladas por las prolongaciones neuronales de las células periglomerulares que, rodeando los glomérulos, transfieren señales a las células mitrales, cumpliendo una importante función en la conformación de la información olfativa [1, 14, 22].

En la edad más temprana estudiada (E17) el límite externo del bulbo olfatorio es irregular, la capa plexiforme externa es bastante delgada y destaca la presencia de escasas prolongaciones neuronales que forman una neuropila muy laxa caracterizada por la existencia de abundantes prolongaciones gliales y la ausencia de contactos neuronales. Entre esa región neuropílica se observa un reducido número de incipientes formaciones glomerulares de ubicación y magnitud variables, aunque predomina la localización en el tercio más superficial de la capa plexiforme externa. Estos esbozos glomerulares se originan a partir de las fibras del nervio olfatorio que al ingresar al bulbo olfatorio se distribuyen paralelos al límite bulbar externo, para luego ramificarse perpendicularmente al mismo, formando el elemento aferente del glomérulo (Fig. 1a).



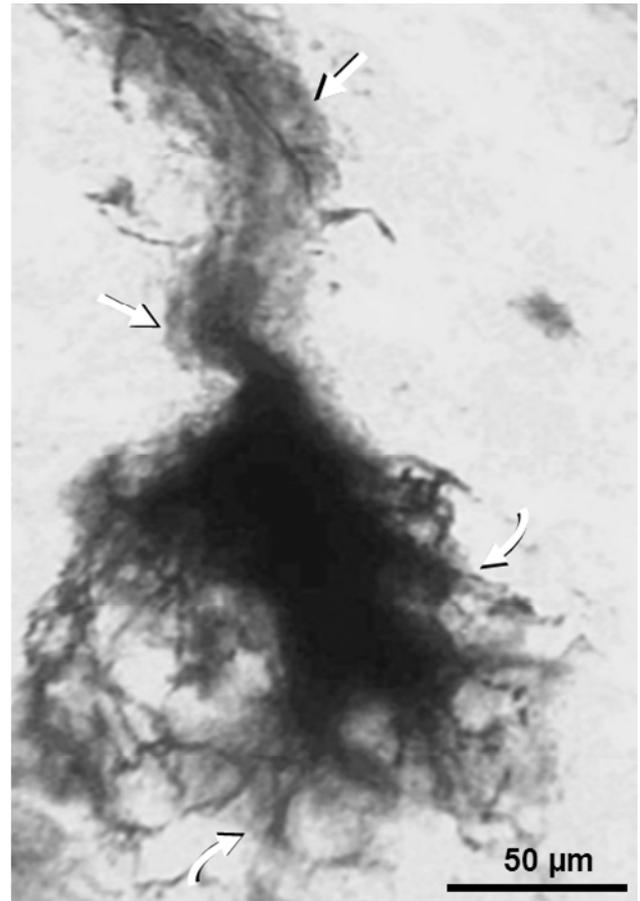
**Fig. 1.** (a) Fibras aferentes del nervio olfatorio (flechas rectas) ramificándose (flechas curvas) para constituir las formaciones glomerulares en el bulbo olfatorio E17. Al día E19 (b) hay una mejor organización de las fibras ramificadas y en el día E21 (c) se observa la interrelación inicial de las fibras que ingresan (flecha recta) con las prolongaciones propias del bulbo olfatorio (flecha curva).

En los embriones de 19 días aumenta la cantidad de fibras que ingresan al bulbo olfatorio, lo cual permite que al ramificarse adquieran una mejor y más densa organización (Fig. 1b) permaneciendo sin embargo, próximos a la región periférica, aumentando la capa

plexiforme externa ligeramente de espesor en función al mayor ingreso de fibras del nervio olfatorio.

Entre los días E21 y P0 se inicia la aproximación entre los axones olfatorios que ingresan y las prolongaciones neuronales propias del bulbo olfatorio que ascienden (Fig. 1c), aun cuando los primeros no han completado su descenso total para ocupar su sitio definitivo en la capa glomerular propiamente dicha, permaneciendo ambas prolongaciones inmersas entre amplios procesos gliales que impiden el contacto entre los componentes neuronales. No es sino hasta después del nacimiento, específicamente en P1, cuando los glomérulos alcanzan su topotipia, para lo cual es necesario que los haces de las fibras olfatorias que descienden después de su ingreso al bulbo, experimenten un proceso de elongación, alejándose de la periferia y formando un grueso pedúnculo antes de ramificarse (Fig. 2).

Al día P3, a pesar que la parte aferente glomerular ha completado su desarrollo morfológico y ocupado su sitio definitivo, aún se encuentra rodeada por prolongaciones gliales (Fig. 3), que hasta esta etapa expresan su función como importante elemento de la plasticidad celular, ya que al día P5 en los sitios ocupados por las glías en edades previas, se observan prolongaciones neuronales que se entremezclan con los axones olfatorios, como se ilustra en la figura 4, visualizándose en esos sitios dendritas de las células mitrales y de las células en penacho en proximidad a los axones aferentes, formando los glomérulos definitivos.

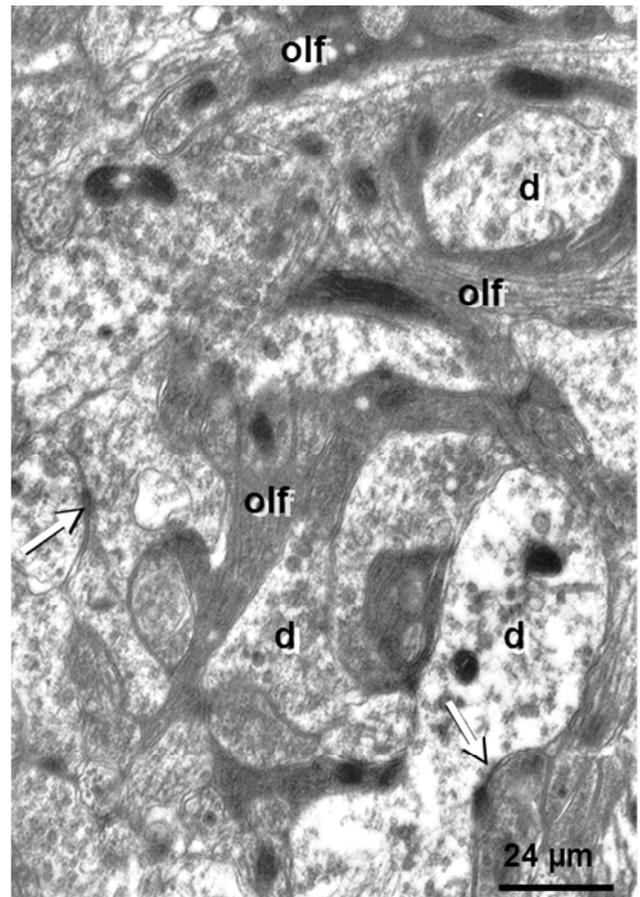


**Fig. 2.** Detalle del ingreso al bulbo olfatorio de los axones olfatorios al día P1. Se nota un aumento del número de fibras axónicas y de la longitud de las mismas al alejarse del límite externo del bulbo (flechas rectas) para ramificarse (flechas curvas) y conformar el glomérulo.

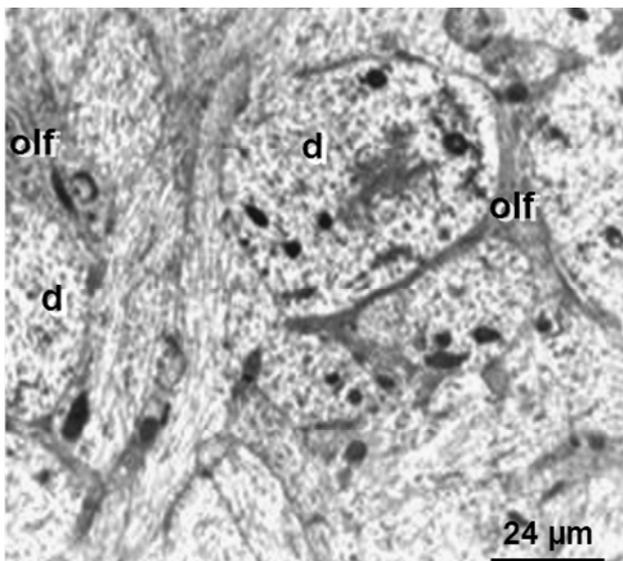
Al analizar el bulbo olfatorio de ratones de edades superiores, ultraestructuralmente se identifican los dos componentes neuronales glomerulares: prolongaciones celulares electrónicamente densas propias de las fibras olfatorias y prolongaciones de menor densidad electrónica correspondientes, las de mayor dimensión a las dendritas de las células mitrales y las de menor tamaño a las dendritas de las células en penacho y a prolongaciones de las neuronas periglomerulares [41, 42]. Al día P7 todas las estructuras glomerulares están interconectadas (Fig. 5) observándose sitios interneuronales de mayor densidad electrónica, que se convierten en verdaderos contactos sinápticos al día P9 (Fig. 6).



**Fig. 3.** Las fibras terminales del nervio olfatorio (olf) se observan rodeadas por amplias prolongaciones gliales (gli) al día 3 postnatal.

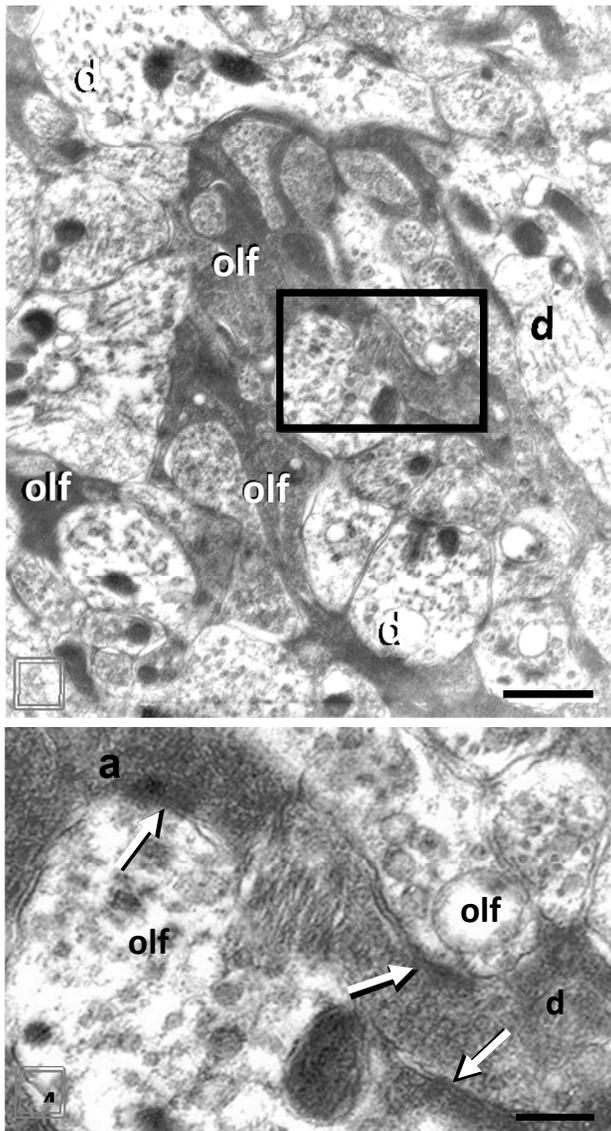


**Fig. 5.** Los axones olfatorios (olf) y las dendritas (d) de las células mitrales y de las células en penacho al día P7 ya están estrechamente relacionados a través de contactos interneuronales (flechas) sin llegar a establecer verdaderas sinapsis.



**Fig. 4.** Al día P5 se observa la relación directa que establecen los axones del nervio olfatorio (olf) con las prolongaciones dendríticas (d) intrínsecas del bulbo olfatorio.

Durante las primeras etapas de desarrollo del bulbo olfatorio, la proporción de ramificaciones neuronales en la capa plexiforme externa es reducida, observándose en la periferia una delgada franja de axones, que a medida que se avanza en edad se hace de mayor espesor. Esto es debido a que inicialmente ingresan escasos axones provenientes de la mucosa olfativa, en parte porque el sistema olfativo externo aun no ha alcanzado la madurez y en parte, porque no existen estímulos suficientes que favorezcan el necesario crecimiento axónico para la formación de los glomérulos olfatorios.



**Fig. 6.** Al día P9 se observan verdaderos contactos sinápticos entre los elementos neuronales que integran los glomérulos. En la imagen (b) que corresponde a una mayor magnificación del recuadro indicado en (a), se observan dos sinapsis (flechas) entre axones del nervio olfatorio (olf) y prolongaciones dendríticas (d).

**Análisis estadístico**

Cuando se comparan los promedios del diámetro de los glomérulos olfatorios en las distintas edades estudiadas, utilizando ANOVA con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ , los resultados muestran un  $p = 0,000$ , lo cual indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los promedios de los diámetros glomerulares (Tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación de los promedios  $\pm$  DE del diámetro de los glomérulos olfatorios desde E17 hasta P9, utilizando ANOVA.

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

Adicionalmente, se aplicó la prueba de Tukey (Tabla 2), revelando que entre E17 y E19 no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,1729$ ), mientras que al comparar E17 con las otras edades estudiadas, tanto embrionarias como postnatales, se evidencian diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,000$ ). Al analizar los resultados de significancia de P7 y P9 se observa que entre ambas edades tampoco existen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,9996$ ), aun cuando si las presentan con las demás edades. Finalmente, al comparar las edades postnatales podemos observar que P0, P1, P3 y P5 tienen diferencias estadísticamente significativas con todas las edades ( $p = 0,000$ ).

**Tabla 2.** Comparaciones múltiples de los diámetros glomerulares utilizando la Prueba de Tukey (n = 50).

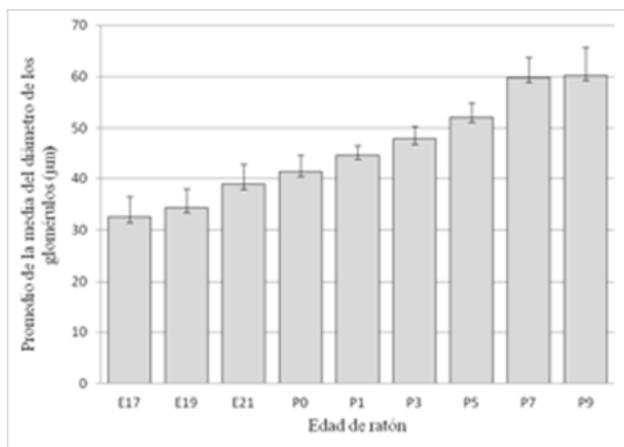
Edad	Edad								
	E17	E19	E21	P0	P1	P3	P5	P7	P9
E17		0,1729	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
E19	0,1729		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
E21	0,000*	0,000*		0,0234*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
P0	0,000*	0,000*	0,0234*		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
P1	0,000*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

\*La diferencia de edades es significativa al nivel .005.

Estos resultados nos indican (Fig. 7) que no hay cambios bruscos en el diámetro de los glomérulos entre las edades

embrionarias E17 y E19, así como tampoco entre las edades postnatales P7 y P9. Como se observa en la figura 7 el aumento en el diámetro de los glomérulos es constante y continuo durante todo el período de desarrollo estudiado. Los resultados estadísticos corroboran lo observado en el análisis histológico y ultraestructural; es decir que en el período embrionario las fibras axónicas y dendríticas del glomérulo aún no han alcanzado su topotipia ni su madurez citológica, ya que las células de las cuales provienen son inmaduras, por lo tanto durante este período la citoarquitectura del glomérulo está en proceso de formación y morfológicamente no ha logrado el diámetro definitivo.

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



**Fig. 7.** Variabilidad de los promedios de las medias de los diámetros de los glomérulos con respecto a la edad.

En nuestro estudio, es entre P7 y P9 cuando se manifiesta el mayor diámetro glomerular ( $59,9 \pm 3,83$  y  $60,32 \pm 5,36$  µm), lo que nos permite inferir, en forma indirecta, que el proceso de maduración neuronal expresado por el desarrollo de axones y dendritas y por la

formación de sinapsis para la conformación de los circuitos olfatorios finales, alcanzan su madurez definitiva en estas últimas edades.

## CONCLUSIONES

Este estudio permitió determinar la manera cómo las estructuras neuronales que conforman los glomérulos olfatorios van interconectándose hasta constituir la sinapsis principal de la vía olfatoria. Es importante señalar que el componente glomerular que primero se desarrolla es el periférico o extrabulbar, sirviendo este de “blanco” para atraer el componente intrabulbar constituido por las prolongaciones de las células mitrales y células en penacho que ascienden en búsqueda de las terminaciones del nervio olfatorio, uniéndose a ellas los procesos neuronales de las células periglomerulares. Estos contactos interneuronales se establecen aproximadamente al día P5, consolidándose la comunicación sináptica al día P9.

Los resultados estadísticos indican que el aumento del diámetro glomerular desde E17 hasta P9 fue de aproximadamente 85,7%, lo cual demuestra que el crecimiento del glomérulo es constante hasta casi duplicar su tamaño a la edad P9 en comparación con E17. Desde E17 hasta P5, el aumento del diámetro fue de 60,53% aproximadamente y en las edades comprendidas entre P5 a P9 fue alrededor de 15,7%. Estos valores confirman que de E17 a P5 el crecimiento del diámetro del glomérulo es mayor que entre P5 y P9, lo cual se puede explicar porque durante el primer período (E17-P5) hay un marcado crecimiento y una alta diferenciación de los elementos neuronales que van a conformar el glomérulo; mientras que entre P5 y P9 la modelación de la citoarquitectura del glomérulo es más lenta, debido a que en esta etapa la maduración y la conformación glomerular definitiva va a depender en gran parte de estímulos externos.

**AGRADECIMIENTOS**

Al Personal del Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Priú” por su desinteresada asistencia en la realización del presente trabajo y al Personal del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes por su invalorable colaboración en el suministro de los animales de experimentación.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Doty R., (2001) “Olfaction” *Annu. Rev. Psychol.* 52:424–452.
- [2] Gregson R., Free M., Abbot M. (1981) “Olfaction in Korsakovs, alcoholics and normal” *Br. J. Clin. Psychol.* 20:3–10.
- [3] Herz R., Engen T. (1996) “Odor memory: review and analysis” *Psychon. Bull. Rev.* 3:300–313.
- [4] Hornung D., Kurtz B., Bradshaw C., Seipel M., Kent P., Blair D., Emko P. (1998) “The olfactory loss that accompanies an HIV infection” *Physiol. Behav.* 64:549–556.
- [5] Jubiz W., Cruz E.A. (2006) “El síndrome de Kallmann: A propósito de un caso” *Colomb. Med.* 37:315-318.
- [6] Lehrner J., Kryspin-Exner I., Vetter N. (1995) “Higher olfactory threshold and decreased odour identification ability in HIV-infected person” *Chem. Senses* 20:325–328.
- [7] Talamo B., Rudel R., Kosik K., Lee V., Neff S., Adelman R., Kauer J. (1989) “Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease” *Nature* 337:736–739.
- [8] Zucco, G., Savoldelli A. (1996) “Deficit olfattivi in soggetti Down: rapporti con il morbo di Alzheimer” *Scienze dell'Interazione* 3:103–109.
- [9] Zucco G., Zeni M.T., Perrone A., Piccolo I. (2001) “Olfactory sensitivity in early stage Parkinson patients affected by more marked unilateral disorder” *Percept. Motor Skills* 92:894–898.
- [10] Zucco G.M., Ingegneri G. (2004) “Olfactory deficits in HIV-infected patients with and without AIDS dementia complex” *Physiol. Behav.* 80:669–674.
- [11] Licht T., Eavri R., Goshen I., Shlomai Y., Mizrahi A., Keshet E. (2010) “VEGF is required for dendritogenesis of newly born olfactory bulb interneurons” *Development* 137:261-271.
- [12] Cummings D.M., Belluscio L. (2010) “Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry” *J. Neurosci.* 30:9172–9180.
- [13] Lipscomb B.W., Treloar H.B., Greer Ch.A. (2002) “Novel microglomerular structures in the olfactory bulb of mice” *J. Neurosci.* 22:766–774.
- [14] De Saint Jan D., Hirnet D., Westbrook G.L., Charpak S. (2009) “External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli” *J. Neurosci.* 29:2043–2052.
- [15] Kiyokage E., Pan Y.Z., Shao Z., Kobayashi K., Szabo G., Yanagawa Y., Obata K., Okano H., Toida K., Puche A.C., Shipley M.T. (2010) “Molecular identity of periglomerular and short axon cells” *J. Neurosci.* 30:1185–1196.
- [16] Keller A., Yagodin S., Aroniadou-Anderjaska V., Zimme L.A., Ennis M., Sheppard Jr N.F., Shipley M.T. (1998) “Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging” *J. Neurosci.* 18:2602–2612.
- [17] Prince J.L., Powell T.P.S. (1970) “The morphology of the granule cells of the olfactory bulb” *J. Cell Sci.* 7:91-123.
- [18] Prince J.L., Powell T.P.S. (1970) “The mitral and short axon cells of the olfactory bulb” *J. Cell Sci.* 7:631-651.
- [19] Takami S., Toida K. (2008) “Structure and function of the olfactory system: overview” *Anat. Sci. Int.* 83:183-185.

- [20] Whitman M.C., Greer C.A. (2009) "Adult neurogenesis and the olfactory system" *Prog. Neurobiol.* 89:162-75.
- [21] Pinching A.J., Powell T.P.S. (1971) "The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb" *J. Cell Sci.* 9:347-377.
- [22] Christie J.M., Schoppa N.E., Westbrook G.L. (2001) "Tufted cell dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is dependent on NMDA receptor activity" *J. Neurophysiol.* 85:169-173.
- [23] Ennis M., Zhou F.M., Ciombor K.J., Aroniadou-Anderjaska V., Hayar A., Borrelli E., Zimmer L.A., Margolis F., Shipley M.T. (2001) "Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals" *J. Neurophysiol.* 86:2986-2997.
- [24] Ennis M., Zhu M., Heinbockel T., Hayar A. (2006) "Olfactory nerve-evoked, metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic responses in rat olfactory bulb mitral cells" *J. Neurophysiol.* 95:2233-2241.
- [25] Hayar A., Karnup S., Ennis M., Shipley M.T. (2004a) "External tufted cells: A major excitatory element that coordinates glomerular activity" *J. Neurosci.* 24:6676-6685.
- [26] Hayar A., Karnup S., Shipley M.T., Ennis M. (2004b) "Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input" *J. Neurosci.* 24:1190-1199.
- [27] Hayar A., Shipley M.T., Ennis M. (2005) "Olfactory bulb external tufted cells are synchronized by multiple intraglomerular mechanisms" *J. Neurosci.* 25:8197-8208.
- [28] McQuiston A.R., Katz L.C. (2001) "Electrophysiology of interneurons in the glomerular layer of the rat olfactory bulb" *J. Neurophysiol.* 86:1899-1907.
- [29] Rubin D.B., Cleland T.A. (2006) "Dynamical mechanisms of odor processing in olfactory bulb mitral cells" *J. Neurophysiol.* 96:555-568.
- [30] Lazarini F., Lledo P.M. (2011) "Is adult neurogenesis essential for olfaction?" *Trends Neurosci.* 34:20-30.
- [31] Golgi C., (1903) "Opera Omnia" Ulrico Hoepli (Ed.) *Milano* 1:99-111.
- [32] Palacios-Prü E.L. (1970) "Two useful variations of the Golgi silver-chromate method" *Acta Cient. Venezolana* 21:105-106.
- [33] Peña-Contreras Z., Mendoza-Briceño R.V., Dávila-Vera D., Rivera-Valecillos S., Palacios-Prü E.L. (2010) "Aplicabilidad del método de Golgi modificado en cultivos de células neuronales" *Acta Microscopica* 19:45 -151.
- [34] Ramón y Cajal S., (1911) "Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres" Paris, Maloine.
- [35] Ramón y Cajal S., Tello y Muñoz J.F. (1966) "Elementos de histología normal y de técnica micrográficas" 12 ed. Editora Nacional. México.
- [36] Palacios-Prü E.L., Mendoza-Briceño R.V. (1972) "An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*" *Brain Res.* 36:404-408.
- [37] Reynolds E. (1963) "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain electron microscopy" *J. Cell Biol.* 17:208-212.
- [38] Sato T., (1967) "A modified method for lead staining of thin sections" *J. Electron Microsc.* 16:133.
- [39] Watson H.L., (1958) "Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals" *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:475-478.
- [40] Hernández R. (2006) "Metodología de la Investigación" (4ª ed.). México: McGraw-Hill Interamericana. 850 p.

- [41] Kosaka T., Kosaka K. (2011) “Interneurons in the olfactory bulb revisited” *Neurosci. Res.* 69:93-99.
- [42] Adam Y., Mizrahi A. (2011) “Development/ plasticity/repair long-term imaging reveals dynamic changes in the neuronal composition of the glomerular layer” *J. Neurosci.* 31:7967-7973.