

PUESTA A PUNTO DE MARCADORES CELULARES PARA EL ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL BULBO OLFATIVO HUMANO

Elsa Núñez Rodríguez

e-mail: elsnunez@hotmail.com

Resumen

Trabajo Fin de Grado

Tutor

Manuel Megías Pacheco

Departamento de Biología

Funcional y ciencias de la Vida

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

En este estudio se llevó a cabo la puesta a punto de marcadores celulares (lectinas e inmunoglobulinas), herramientas que permitieron identificar las distintas partes del bulbo olfativo humano. Para ello, se realizaron pruebas de concentración y tiempo de revelado hasta conseguir las condiciones óptimas de empleo de cada uno de ellos.

A continuación, se hizo un estudio completo de las distintas partes o zonas que fueron marcadas con cada uno de ellos, clasificando los marcadores en grupos, en función de las zonas de marcaje y de la información aportada.

El objetivo es que estos marcadores puedan ser empleados en un estudio posterior en el que se tratará de establecer si existen diferencias morfológicas entre bulbos controles y bulbos de individuos que presenten un historial de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, para intentar determinar si estas diferencias son la base de alteraciones patológicas.

Palabras clave: *bulbo olfativo, enfermedades neurodegenerativas, Alzheimer, Parkinson, lectinas, inmunoglobulinas*

INTRODUCCIÓN

El sistema olfativo tiene como función principal captar los estímulos químicos, convertirlos en señales eléctricas y químicas, y enviarlos a distintas áreas encefálicas para integrar la información olorosa con el resto de la información nerviosa.

La ruta que sigue la información olorosa está constituida por tres etapas que se identifican con tres estructuras nerviosas. La primera es el epitelio olfativo, donde los receptores reconocen las moléculas químicas olorosas y transducen ese reconocimiento en impulso eléctrico. La segunda etapa es el bulbo donde se procesa la información del epitelio olfativo y se envía a una tercera etapa, las diferentes áreas encefálicas (áreas olfativas secundarias), entre las que destacan la amígdala, el tálamo, el hipotálamo y la corteza perirrinal.

En enfermedades neurodegenerativas se produce una afectación de distintas áreas cerebrales, produciéndose un deterioro cognitivo y funcional progresivo, asociado con alteraciones claras de las estructuras nerviosas como el bulbo olfativo (Ruan *et al.*, 2012). Citando un ejemplo más concreto, en el Alzheimer una de las alteraciones estructurales más conocidas es la aparición de placas seniles de manera no uniforme en las distintas regiones del cerebro (Dickson *et al.*, 1988).

En la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas, los trastornos olfativos se consideran síntomas precoces, frecuentes y no claramente relacionados con los signos motores de la enfermedad, que empeoran a medida que esta va progresando. Desde hace varias décadas, y en especial desde hace unos años, ha aumentado el interés en valorar las alteraciones del olfato como indicadores precoces de estas enfermedades neurodegenerativas (Miranda & Pérez, 2006).

Las deficiencias en la olfacción se pueden clasificar en dos tipos: las hiposmias, en las que hay una disfunción parcial del umbral olfativo y la pérdida olfativa no es completa, y las anosmias, en las que se

produce una ausencia completa de dicha capacidad. La edad es el principal factor que influye en el déficit del sistema olfativo, aunque pueden aparecer otras causas asociadas.

En relación con las enfermedades neurodegenerativas, hay evidencias clínicas de hiposmia o anosmia en el proceso de olfacción de algunos pacientes con enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer. Los síntomas del déficit olfatorio son previos a la manifestación de los deterioros motores o de pérdida de memoria que ocurren respectivamente en dichas enfermedades, llegando a aparecer incluso décadas antes del manifiesto completo de las alteraciones físicas o cognitivas (Miranda y Pérez, 2006).

En general el trastorno olfativo es frecuente, precoz y grave, por lo que una de las ideas más en auge en la actualidad es considerar dicho trastorno como marcador de pronóstico y evolución de esas enfermedades neurodegenerativas (Ropper & Brown, 2007). Tanta importancia se le da al déficit olfativo como marcador precoz que incluso algunos autores plantean la biopsia de bulbo olfativo como prueba diagnóstica (Santos *et al.*, 2010).

Descripción del bulbo olfativo

El bulbo olfativo, una estructura par, es un componente del prosencéfalo que se localiza sobre la placa cribiforme del hueso etmoides. Anatómicamente se divide en varias capas definidas por la organización de sus neuronas y fibras. Los axones de las células receptoras del epitelio olfativo forman el nervio olfativo, y terminan en la capa glomerular del bulbo olfativo formando los glomérulos olfativos (Soriano *et al.*, 2007). Cada glomérulo olfativo lleva la información de cada receptor.

En la capa glomerular los axones del nervio olfativo hacen sinapsis con las dendritas de dos tipos de células: las células mitrales y las células bipenachadas. Las células mitrales sitúan sus cuerpos celulares en la capa de células mitrales. Entre la capa glomerular y la de las células mitrales se extienden las dendritas apicales de las propias células mitrales, en un espacio denominado capa plexiforme externa. Inmediatamente debajo, más profundas en el bulbo, se encuentran las capas plexiforme interna y capa granular. Estas dos capas están formadas por un gran número de interneuronas que agrupan sus cuerpos celulares en la capa granular y sus dendritas en la capa plexiforme interna. Los axones de las células mitrales abandonan el bulbo formando el tracto olfativo, el cual se divide en distintas ramas que inervan las áreas olfativas secundarias (Figura 1).

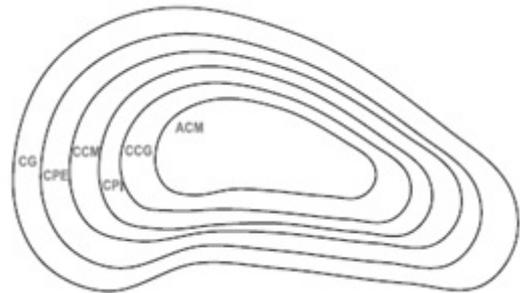


Figura 1. Esquema en el que se representa la organización del bulbo olfativo, así como diferentes estructuras características. Abreviaturas: capa glomerular (GC), capa plexiforme externa (CPE), capa de células mitrales (CCM), capa plexiforme interna (CPI), capa de células granulares (CCG) y zona de axones de las células mitrales (ACM).

Marcadores. Lectinas e inmunoglobulinas

En el estudio de estructuras nerviosas se pueden emplear tinciones generales pero aporta más información el empleo de herramientas que permitan poner de manifiesto comportamientos o elementos característicos. Entre las herramientas más usadas para ese fin en el sistema nervioso están los anticuerpos o inmunoglobulinas que detectan proteínas (glicoproteínas de membrana), o las lectinas, proteínas ubicuas que detectan glicoconjugados, y que de acuerdo con el monosacárido con el que presentan mayor afinidad fueron clasificadas en 5 grupos por Sharon (Ambrosi *et al.*, 2005). En la actualidad, estos marcadores son un foco de investigación muy importante (Ambrosi *et al.*, 2005), sobre todo en aquellas investigaciones relacionadas con el reconocimiento celular.

Los estudios con estos marcadores y cerebros humanos no son muy abundantes, y menos en aquellos en los que se estudian enfermedades neurodegenerativas. Se puede destacar el llevado a cabo por Nishi y sus colaboradores (Nishi *et al.*, 2003), en el que emplearon las lectinas para estudiar la localización de glicoconjugados en el cerebro de pacientes mayores que presentaban Alzheimer o Síndrome de Down. Por otro lado, un estudio más reciente mostró que la disfunción olfativa está asociada a un trastorno mental,

sobre todo en la producción de nuevas neuronas en el bulbo olfativo humano y en cambios en su morfología (Bedard & Parent, 2004).

El objetivo general del trabajo es poner a punto una serie de marcadores celulares, que se usaran como herramientas en un estudio posterior para realizar una comparación entre bulbos controles y bulbos de pacientes con historial de enfermedades neurodegenerativas.

Para poder testar la utilidad de los diferentes marcadores que se van a estudiar se proponen los siguientes objetivos:

- a) Estudiar el tipo de marcaje que ponen de manifiesto los diferentes marcadores.
- b) Diferenciar y seleccionar los marcadores interesantes para futuros estudios comparativos entre bulbos olfativos controles y bulbos problema.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre bulbos olfativos humanos procedentes de autopsias de individuos sin historial de patologías neurológicas, hombres y mujeres de entre 76 y 77 años. Los bulbos fueron obtenidos en el Hospital Meixoeiro a través del Biobanco del CHUVI y recogidos entre diciembre de 2013 y enero de 2014. El proceso experimental se ha llevado a cabo de acuerdo con el convenio de cesión de muestras y permiso ético por parte del grupo de investigación donde se ha realizado este estudio. Además, durante la manipulación de las muestras se siguieron las normas de trabajo con muestras procedentes de humanos, recogidas en el Real Decreto 1301.

Fijación e inclusión de los tejidos

El objetivo de la fijación es preservar las características morfológicas y moleculares lo más parecidas posibles a las que poseía el tejido en estado vivo. Los bulbos (derecho e izquierdo) fueron extraídos durante una autopsia, y sumergidos inmediatamente en líquido de Bouin durante 24 h a 4 °C.

Tras la fijación se procedió a la inclusión, proceso en el que se sustituye la solución acuosa de las células y tejidos por el medio de inclusión. Se empleó la parafina mediante una deshidratación con alcoholes (etanol) de gradación creciente (desde 50° hasta el de 100°). Posteriormente se transfirió a xileno, sustancia intermedia miscible tanto en alcohol de 100° como en parafina, controlando el tiempo para evitar un endurecimiento excesivo de los tejidos.

A continuación el tejido se sumergió en tres baños sucesivos de parafina líquida (60 °C), controlando el tiempo en función del tamaño de la pieza y del líquido intermediario que hayamos empleado. En nuestro caso consistió en un primer baño de 2 horas, un segundo de 16 h y un último paso de 1 hora. Por último, la muestra se colocó en un molde donde se añadió parafina líquida, que al solidificar a temperatura ambiente formó un bloque con el tejido incluido.

Corte y montaje

Se realizaron cortes de 8 µm de grosor, que se depositaron en unas gotas de agua sobre portaobjetos recubiertos con gelatina colocados sobre una plancha a 37°, para que los cortes se estiraran y se pegaran al portaobjetos al secarse el agua.

Se hicieron cuatro series de cortes de los bulbos olfativos procesados, de manera independiente. El objetivo fue poder estudiar distintos marcadores en secciones contiguas de tejido y destacar posibles diferencias entre ellos.

Tratamiento con lectinas o inmunoglobulinas de las muestras

Las lectinas son unas proteínas que tienen dominios o secuencias de aminoácidos que son capaces de reconocer y unirse a unos hidratos de carbono específicos. Para poder observar el lugar de unión específica de la lectina y su glúcido se une una molécula de biotina y un complejo enzimático, para obtener una señal visible al microscopio óptico.

En el caso de las inmunoglobulinas, para poder detectar una señal visible al microscopio óptico tenemos que conjugar un marcador (la biotina) a la inmunoglobulina. Se une a una inmunoglobulina secundaria, y posteriormente se añade un complejo enzimático.

El procesamiento de las secciones para la detección de glúcidos mediante lectinas o para inmunoglobulinas fue similar, aunque con algunas diferencias.

Las secciones o cortes de bulbo olfativo colocados sobre portaobjetos se desparafinaron con xileno y se hidrataron en una gradación decreciente de etanol de 100° a 80°, y agua destilada. Posteriormente los cortes se pasaron a tampón fosfato salino, 0.1 M y pH 7.4 (PBS).

Como en ambos procedimientos se empleó la enzima peroxidasa como marcador, es necesario inactivar la peroxidasa del propio tejido (evitar falsos positivos). Para ello se incuban los cortes en una mezcla de peróxido de hidrógeno, metanol y PBS (2:2:6). Posteriormente se lavaron las secciones en PBS. Para evitar falsos positivos debidos a la unión inespecífica de las lectinas o de las inmunoglobulinas al tejido se llevó a cabo una incubación en solución de bloqueo. Para ello los cortes se incubaron en albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en PBS.

A continuación se incubaron las secciones en lectina o inmunoglobulina. La concentración de marcador dependió de la prueba que se estaba realizando. Para ello se utilizó un método de incubación tipo sándwich. Se añadieron 150-200 µl de solución y se colocaron en una cámara húmeda para evitar la evaporación durante 18 a 24 h a temperatura ambiente.

Posteriormente la solución con las lectinas y las inmunoglobulinas se eliminó con lavados en PBS. Las secciones destinadas a inmunocitoquímica se incubaron durante 1 h en una inmunoglobulina secundaria anti-Ig-G de conejo conjugado con biotina (Vector Laboratories) diluido 1/100.

Todas las secciones se incubaron en el complejo avidina biotina peroxidasa (ABC; Vector Laboratories) diluido 1/200 en PBS. La avidina de este complejo reconoce a la biotina y se une fuertemente a ella, permitiendo su posterior observación.

El revelado de la peroxidasa del complejo ABC se llevó a cabo mediante el empleo de la 3-3' diaminobencidina (DAB; Sigma) y peróxido de hidrógeno. Se produce una reacción de óxido-reducción en la que la DAB se reduce y adquiere una coloración marrón visible al microscopio óptico. El tiempo de revelado fue controlado mediante observación al microscopio óptico en función de la prueba que se estuviese llevando a cabo (entre 1 y 5 min en todos los casos) y se detuvo con varios lavados de PBS. Tras el proceso de revelado algunas secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer durante 1 a 2 min para obtener una tinción de contraste de los núcleos de todas las células. A continuación las secciones se deshidrataron en una gradación creciente de etanol (80° a 100°), se aclararon en xileno y por último se montaron con DPex (Gurr).

Las secciones procesadas se estudiaron con un microscopio Olympus (BX51) y se fotografiaron con una cámara digital (DP71) adaptada a dicho microscopio.

En algunas pruebas realizadas el marcaje final obtenido no fue satisfactorio, bien por un exceso de marcaje o por una señal débil. Así, en pruebas sucesivas se siguió el protocolo anterior pero variando la concentración inicial de lectina o inmunoglobulina, o bien el tiempo de revelado.

RESULTADOS

Empleando diversos marcadores, lectinas e inmunoglobulinas, se pusieron de manifiesto distintas estructuras presentes en el bulbo olfativo de humanos. El tipo celular y las fibras marcadas, así como el nivel de marcaje en cada compartimento dependieron del marcador usado.

Se emplearon dos inmunoglobulinas y nueve lectinas. De estas últimas, salvo la GSL-1, todas revelaron la presencia de fibras, células y capilares en los distintos compartimentos bulbares, unas con un marcaje más nítido y otras con marcajes más generales.

Para distintos marcadores se hicieron pruebas de concentración y tiempos de revelado para obtener la mejor relación señal-ruido. La descripción de las estructuras positivas para cada lectina o inmunoglobulina

está basada en aquellas concentraciones y tiempos de revelado óptimos.

Los distintos marcadores se agruparon en cuatro categorías según las estructuras que pusieron de manifiesto y la intensidad del marcaje de las mismas. El principal criterio de clasificación vino determinado por la intensidad y variedad de estructuras observadas en la capa glomerular, aunque los distintos marcadores también presentaron diferencias sobre el marcaje en otros niveles y estructuras.

A continuación se describe de forma detallada el resultado obtenido en los grupos.

Grupo I. UEA-I

La UEA-I se caracteriza por llevar a cabo un excelente marcaje de los glomérulos y las fibras nerviosas de la capa glomerular (Figura 2.A). En este caso, la concentración óptima de marcaje se corresponde con 10 µg/ml y a un tiempo de revelado de 5 min. Se observaron claramente los glomérulos olfativos (abundantes en la parte más externa del bulbo) y numerosas fibras positivas entre ellos. También se detectaron fibras positivas más débiles en la capa de células granulares y células marcadas de pequeño diámetro de manera dispersa en todas las capas del bulbo. Aparecen algunos vasos sanguíneos de distinto calibre.

Grupo II. Con A, WGA, PNA, Anti-Calretinina

Este grupo de marcadores se caracterizó por marcar algunos glomérulos olfativos en la capa glomerular y por marcar de forma excelente las fibras nerviosas (Figura 2.B). Las condiciones de marcaje son muy similares para todas las lectinas (concentración de 5 µg/ml y tiempo de revelado de 1-2 min, salvo en el caso de la PNA, que necesitó un tiempo de revelado de 5 min) y de una concentración 1/500 con un tiempo de revelado de 5 min para la anti-calretinina.

Estos marcadores permitieron una visualización clara de toda la periferia bulbar. En la capa glomerular se pudieron localizar glomérulos olfativos (dispersos y poco numerosos). Por otro lado, las fibras nerviosas se pudieron observar de forma nítida, sobre todo en la capa glomerular. Cabe destacar que, dentro de este grupo, la calretinina es el marcador que permitió una diferenciación más nítida de esas fibras.

Se diferenciaron también fibras nerviosas positivas, con un marcaje más débil, en la capa de células granulares y células positivas dispuestas en los diferentes compartimentos bulbares.

Grupo III. SNA, DBA, RCA-I

El marcaje con las lectinas de este grupo se caracterizó por no poner de manifiesto los glomérulos olfativos y por revelar de manera clara las fibras nerviosas de la capa glomerular (Figura 2.C). La descripción del marcaje de estas lectinas se correspondió con un tiempo de revelado de 1 a 2 minutos, mientras que hubo variaciones en la concentración (5 µg/ml con DBA y 10 µg/ml para la SNA y RCA).

Se pudieron diferenciar fácilmente las fibras nerviosas de la capa glomerular. También marcaron de manera más débil fibras y prolongaciones celulares nerviosas con elevada densidad en el bulbo, pero sobre todo en la capa de células granulares.

Se observaron cuerpos celulares positivos de pequeño diámetro, distribuidos por todos los niveles rostrocaudales del bulbo olfativo. Cabe destacar que la SNA y la RCA-I marcaron vasos sanguíneos de distintos calibres, mientras que no se observó ninguno positivo para la DBA.

Grupo IV. SBA y Anti-G0

Estos dos marcadores se caracterizan por marcar de forma débil las fibras nerviosas presentes en la capa glomerular del bulbo olfativo (Figura 2.D). En este caso, la detección del marcaje para la SBA se corresponde con una concentración de 10 µg/ml y un tiempo de revelado de 1-2 minutos y para el anti-G0, una concentración de 1/500 y un tiempo de revelado similar.

En la capa glomerular, se pudo observar la distribución de las fibras nerviosas de forma débil y

dispersa, pero en ningún caso se observaron glomérulos. Se pudieron distinguir fibras positivas con una intensidad de marcaje muy similar en la capa de células granulares y cuerpos celulares positivos de diámetro medio, en todos los capas del bulbo olfativo. Ni la lectina SBA ni el anti-G0 permitieron marcar vasos sanguíneos.

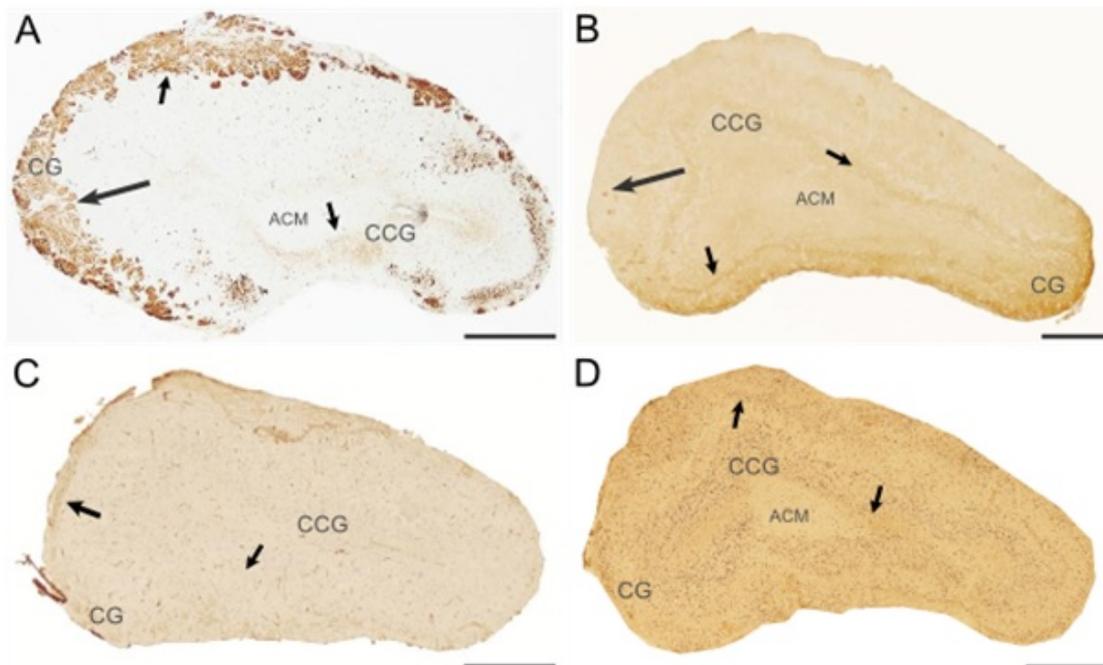


Figura 2. Imágenes de cortes transversales de 8 μm de grosor del bulbo olfativo humano teñidos con los distintos marcadores. (A) Sección procesada con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de UEA y un revelado corto de 1-2 min. (B) Sección procesada con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PNA y un revelado corto de 1-2 min. (C) Sección tratada con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RCA y un tiempo de revelado DE 1-2 min. (D) Sección tratada con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SBA y un tiempo de revelado DE 1-2 min. Abreviaturas: capa glomerular (CG), capa de células granulares (CCG), zona de axones de las células mitrales (ACM). Las flechas grandes representan a los glomérulos olfativos y las flechas pequeñas representan las fibras nerviosas (en la capa glomerular y la capa de células granulares). Barras de escala: A, B, C, D: 1 mm.

DISCUSIÓN

Cuestiones metodológicas

El propósito de este proyecto era poner a punto una serie de marcadores en el bulbo olfativo de humanos y seleccionar aquellos que nos aportasen una mayor cantidad de información. Para ello, en primer lugar se aplicaron una batería de lectinas y dos inmunoglobulinas a las secciones. En aquellos casos en los que los resultados no fueron óptimos se modificaron las condiciones experimentales (concentración y tiempo de revelado) para conseguir la mayor señal con el mínimo ruido posible.

Hay que tener en cuenta otros aspectos a la hora de interpretar los resultados: algunas lectinas pueden reconocer a dos enlaces glucídicos, no pudiendo, en ocasiones, diferenciar cuál de ellos es el que da positivo (Con A, DBA, RCA) (Plendl & Sinowatz, 1998; Salazar *et al.*, 2001). El estudio en humanos de bulbos olfativos, y tejido nervioso en general, presenta limitaciones ya que es obligatorio un estudio postmortem (Santos *et al.*, 2010). El sistema nervioso sufre una rápida degeneración ante la falta de oxígeno (Bédard & Parent, 2004) por lo que el periodo postmortem, entre la muerte y la fijación de la muestra, es un periodo crítico para la preservación de las características moleculares y estructurales del tejido. Por ello es necesario estudiar numerosas muestras y conocer perfectamente las condiciones experimentales para poder obtener conclusiones generales. Por último, hay que destacar que la comparación de los resultados en humanos son difícilmente extrapolables a otras especies, y viceversa, ya que el marcaje de las lectinas varía enormemente según la especie considerada (Salazar & Sánchez, 1998).

Distribución de estructuras positivas

El bulbo olfativo puede dividirse en distintos compartimentos (Bédard & Parent, 2004), cada una de los cuales contiene estructuras propias como los glomérulos olfativos, fibras nerviosas, neuronas, glía y vasos sanguíneos.

Las lectinas e inmunoglobulinas empleadas en este estudio pusieron de manifiesto las diferentes estructuras y zonas del bulbo. Se clasificaron en cuatro grupos en base al tipo de marcaje obtenido (estructuras marcadas e intensidad de dicho marcaje), sobre todo en la capa glomerular donde las diferencias entre marcadores fueron más claras. El grupo I de lectinas, donde solo tenemos la UEA-I, permitió identificar tanto los glomérulos como las fibras presentes en la capa glomerular de forma más intensa. Un marcaje patente se relaciona con una cantidad elevada de carbohidratos presentes. Sin embargo, la WGA, PNA y anti-calretinina, pertenecientes al grupo II, pusieron de manifiesto principalmente las fibras, pero escasamente los glomérulos en dicha capa. Los otros dos grupos, III y IV, no marcaron glomérulos. Esto indica que los glomérulos tienen una diferente composición de glicoconjugados en comparación con el resto de fibras de la capa glomerular. Por ello mediante el uso de lectinas determinadas se podrá estudiar por separado ambos elementos, glomérulos y fibras, para estudios comparativos entre bulbos controles y patológicos.

Todos marcadores utilizados revelaron fibras positivas en las capas más profundas del bulbo olfativo, sobre todo en la capa de células granulares. Estas fibras son identificadas como los axones de las células mitrales, células que reciben en sus dendritas las aferencias olfativas primarias. Por tanto, se puede deducir que alteraciones en el patrón de dichas fibras indicarían alteraciones patológicas. Tal y como se describió en el apartado de resultados el marcaje de fibras nerviosas en la capa granular fue de mayor intensidad en los grupos I y II y menor en el III y el IV. Las otras capas centrales del bulbo olfativo, conocidas como capas plexiformes interna y externa, las cuales contienen fundamentalmente las dendritas de las células mitrales, presentan un marcaje más débil que las otras capas.

Se ha demostrado que en el bulbo olfativo se pueden diferenciar cuatro tipos celulares: periglomerulares, mitrales, bipenachadas y granulares, con diferente distribución según la capa bulbar (Soriano *et al.*, 2007). En la capa glomerular se encuentran los somas de las células periglomerulares. Las lectinas del grupo III marcan numerosas células periglomerulares, mientras que estas células son negativas para las lectinas e inmunoglobulinas de los otros grupos. Los somas de las células mitrales y bipenachadas fueron negativas en todos los casos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es probable que los axones de las células mitrales sean positivos para los marcadores de los grupos I y II. Por último las células granulares fueron positivas para todos los grupos pero destacan la UEA-I, grupo I, y la PNA del grupo de II. Por último, en esta capa de células granulares y en la capa de axones mitrales también aparecen otros tipos de neuronas más grandes de manera dispersa (Nieuwenhuys *et al.*, 2008), que en nuestro se marcaron con la lectina del grupo II, PNA. Por tanto, también en este caso es posible estudiar poblaciones celulares concretas utilizando una u otra lectina o inmunoglobulina.

Por último, la red de vasos sanguíneos se marcó con algunas lectinas, como la UEA-I, grupo I, y con la DBA y RCA-I del grupo III, las cuales pusieron de manifiesto vasos sanguíneos de diferente diámetro. Aparentemente todos los vasos sanguíneos fueron positivos, concretamente destacó la capa endotelial. Estas lectinas pueden ser de gran utilidad para detectar alteraciones en el riego vascular.

Otros estudios del bulbo olfativo humano

Los trabajos donde se utilizan las lectinas como herramientas para estudiar el bulbo olfativo de humanos son escasos. Por ejemplo, en estudios concretos (Nagao *et al.*, 1993) se utilizó la lectina UEA-I con la que se obtuvo un marcaje similar al de este trabajo, sobre todo con fibras y glomérulos marcados en las capa glomerular. Por otro lado, numerosos estudios intentan correlacionar las alteraciones del olfato, en especial el bulbo olfativo, con las enfermedades neurodegenerativas, aunque pocos de ellos utilizan lectinas. Por ejemplo, en relación con las enfermedades neurodegenerativas, (Dickson *et al.*,

1988) empleó la RCA-I como marcador, revelando que en bulbos olfativos de individuos con Alzheimer presentaban mayor densidad de vasos sanguíneos en torno a las placas seniles.

En cuanto a las inmunoglobulinas, algunos autores (Bédard & Parent, 2004) determinaron que un número significativo de las células granulares contienen la calretinina, una proteína de unión a calcio, y la parvoalbumina, otra proteína de unión a calcio asociada a GABA. En nuestro caso la calretinina marcó pocas células granulares y sobre todo marcó fibras positivas en la capa glomerular. Las diferencias pueden ser debidas al tipo de inmunoglobulina usada o las condiciones experimentales.

Seleccionando aquellos marcadores que delimiten de forma nítida compartimentos o subcompartimentos en el bulbo olfativo, se podrán detectar variaciones en la morfología de dichas regiones cuando estén en un proceso general de envejecimiento o durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, lo cual ayudará a interpretar el proceso degenerativo o de envejecimiento y sus efectos en la olfacción.

CONCLUSIONES

Las lectinas son unos buenos marcadores para la detección selectiva de estructuras nerviosas en el bulbo olfativo de humanos. También es el caso de algunas inmunoglobulinas, como la anti-calretinina y la anti-G0. De esa forma, se pueden diferenciar distintas zonas con distintos marcadores, y escoger aquellos que generen un marcaje más nítido y diferencial en cada una de ellas. Esto es particularmente útil en tejidos postmortem puesto que reconocen estructuras moleculares resistentes a la degradación, y pueden ser buenas herramientas para estudiar patologías en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambrosi, M., Cameron, NR., Davis, BG. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org. Biomol. Chem.* 3: 1593-1608
- Bédard, A., Parent, A. (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Dev. Brain Res.* 151:159-168
- Coronas, G., Medina, I., Aguilar, A., Portillo, W., González, I., Paredes, R., Díaz, S. (2011). Conducta olfativa en un modelo murino de Alzheimer. *Rev. Dig. Univ.* 12:3-9
- Dickson, DW., Farlo, J., Davies, P., Crystal, H., Fuld, P., Yen, S. (1988). Alzheimer's Disease. A double labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am. J. Pathol.* 132: 86-101
- Hoyles, K., Sharma, J. (2013). Olfactory loss as a supporting feature in the diagnosis of Parkinson's disease: a pragmatic approach. *J. Neurol.* 260:2951-2958
- Lejarreta, S., Turró, O., Vilanova, J.C., Freixenet, J., Martí, Robert., López, S. (2012). El sistema olfatorio, el envejecimiento y la enfermedad del Alzheimer. *Rev. Alzheimer.* 51:37-43
- Miranda, M., Pérez, C. (2006). ¿Por qué evaluar el olfato? y ¿Cómo evaluarlo? Implicancias en el diagnóstico de la Enfermedad de Parkinson: Aplicación de un práctico test en población adulta y sana y con síntomas parkinsonianos. *Rev. Med. Clin. Condes.* 17:120-123
- Molist, P., Pombal, MA., Megías, M. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo (2014). Atlas de histología vegetal y animal. Recuperado el 3 de junio de 2014 de <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>.
- Navarrete, E., Próspero, O., Hudson, R., Guevara, R. (2000). Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. *Gac. Med. Mex.* 136: 189-200

- Nagao, M., Oka, N., Kamo, H., Akiguchi, I., Kimura, J. (1993). Ulex europaeus I and Glicine max bind to the human olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 164: 221-224
- Nieuwenhuys, R., Voogd, J., Van Huijzen, C. (2008). El sistema nervioso central humano. Tomo II. Madrid, España: Panamericana.
- Nishi, K., Tanegashima, A., Yamamoto, Y., Ushiyama, I., Ikemoto, K., Ymasaki, S., Nishimura, A., Rand, S., Brinkmann, B. (2003). Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Legal Medicine.* 5: 117-131
- Plendl, J., Sinowatz, F. (1998). Glycobiology of the olfactory system. *Acta Anat.* 161: 234-253
- Ropper, AH., Brown, RH. (2007). Trastornos del olfato y el gusto. En: Ropper, AH., Brown, RH. (Eds.). *Principios de Neurología.* México: McGraw-Hill Interamericana, pp.195-202.
- Ruan, Y., Zheng, XY., Zhang, HL., Zhu, W., Zhu, J. (2012). Olfactory dysfunctions in Neurodegenerative Disorders. *J. Neurosci. Res.* 90: 1693-1700
- Salazar, I., Sánchez, P. (1998). Lectin binding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. *Anat. Embryol.* 198:331-339
- Salazar, I., Sánchez, P., Lombardero, M., Cifuentes, JM. (2001). Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mouse using a panel of lectins. *Chem. Senses.* 26: 654-652
- Santos, D., Aneiros, A., Macías, M., Llana, MA., Abella, J., Santos, H. (2010). Síntomas sensoriales en la enfermedad del Parkinson. *Rev. Neurol.* 50: 65-74
- Soriano, C., Guillazo, G., Redolar, DA., Vale, A. (2007). *Fundamentos de Neurociencia.* Barcelona, España: UOC.