

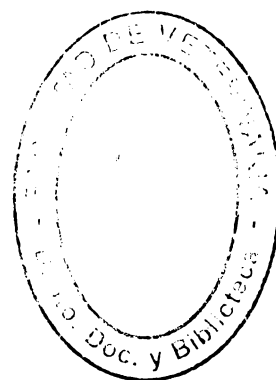
*UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA*

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DESARROLLO Y PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN EN EL  
ÓRGANO VÓMERONASAL Y LA MUCOSA NASAL DE LA RATA: POSITIVIDAD  
AL PAS Y AL ALCIAN BLUE Y PRESENCIA DE MASTOCITOS**

**por**

**María Eugenia NÚÑEZ CHICHET**



TESIS DE GRADO presentada como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias  
Veterinarias (orientación Higiene,  
Inspección, Control y Tecnología de los  
Alimentos de Origen Animal)

MODALIDAD Ensayo experimental

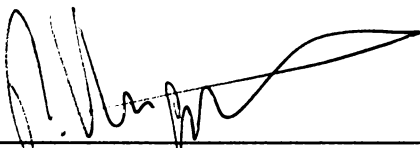


**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2010**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Tesis de Grado aprobada por:**

Presidente de mesa:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rodolfo Ungerfeld

Segundo miembro (Tutor):

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alejandro Bielli

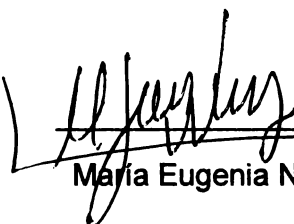
Tercer miembro:

\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo Rodríguez

Fecha:

20 de Diciembre 2010

Autora:

  
\_\_\_\_\_  
María Eugenia Núñez Chichet

RECEBIDA EN LA SECRETARÍA  
ACADÉMICA EL 10 (diez) de

## **DEDICATORIA**

A mi abuelo Raúl, que sé que me hubiera querido ver con el título.

## **AGRADECIMENTOS**

A mis padres, Liliana y Carlos, mi hermano Gervasio y Natalia, a Gabriel, a mis abuelos Daisy, Irma, Raúl y Yoyo, a mis tías, tíos, primos y Francisquito.

A mis amigas Corita, Silvana, Verito, Carolina, Flor y Meche.

A Patricia Davison.

A Natalia y Analía.

A mi Jefa Ruth González y mis compañeros de trabajo.

A Alejandra Berglavaz y Danilo Fila.

A Diana Calero, la Gallega y Javier Iturralde.

A la Universidad de la Republica

A la Facultad de Veterinaria

A CIDEC, por la financiación.

Al Área de Histología y Embriología, donde trabajé por 8 años.

A Patricia Genovese

A Victoria Riaño

A Carolina Pombo

A Rodolfo Ungerfeld, por sugerirnos trabajar en el tema, hace ya unos años.

A Mónica Viqueira

A Adriana Molina

Y por supuesto a mi tutor y amigo Alejandro Bielli, quien aún me hace creer que no todo está perdido en nuestra casa de estudios.

## **TABLA DE CONTENIDO**

	<b>Página</b>
PÁGINA DE APROBACIÓN .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIACIONES .....	viii
RESUMEN .....	ix
SUMMARY .....	x
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1. El órgano vémeronasal .....	2
2.2. Las tinciones de PAS y AB y el VNO .....	6
2.3. Mastocitos .....	8
2.4. El desarrollo normal del VNO .....	12
2.5. La programación fetal y la nutrición .....	13
OBJETIVO GENERAL .....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
HIPÓTESIS .....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
3.1 Animales y Procedimientos de Muestreo .....	15
3.2 Sacrificio de los animales .....	17
3.3 Procesamiento histológico .....	17
3.4 Técnicas empleadas .....	17

3.5 Evaluación de preparados histológicos .....	19
3.6 Evaluación estadística .....	19
4. RESULTADOS .....	20
5. DISCUSIÓN .....	28
6. CONCLUSIONES .....	33
7. BIBLIOGRAFÍA .....	34

## **LISTA DE CUADROS Y FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Corte lateral de cráneo de rata (Vacarezza, 1981) .....	4
<b>Figura 2.</b> Tabique nasal de la rata adulta .....	4
<b>Figura 3.</b> Jaulas con entrepiso, diseñadas por nuestro equipo, para que los cachorros no accedan al alimento .....	15
<b>Figura 4.</b> Diseño experimental, grupos: 5, 15, 25 y 35 días .....	16
<b>Figura 5.</b> Esquema de diseño experimental para los animales de 100 días de edad (Grupos C y T) .....	16
<b>Figura 6.</b> Esquema de paredes y tabique de la cavidad nasal (CN) de la rata adulta .....	19
<b>Figura 7.</b> Pesos corporales al sacrificio de cada grupo experimental .....	20
<b>Figura 8.</b> Imágenes de cortes histológicos de GJ, GVB, GDB .....	21
<b>Figura 9.</b> Imágenes de cortes histológicos de ELR, Sup ELR, NE y Sup NE.....	22
<b>Figura 10.</b> Imágenes de cortes histológicos de mastocitos con azul de toluidina y MTC con AB/safranina .....	23
<b>Cuadro 1.</b> Índices de PAS positividad para cada compartimiento histológico y grupo experimental ..	24
<b>Cuadro 2.</b> Índices de AB positividad para cada compartimiento histológico y grupo experimental ..	24
<b>Cuadro 3.</b> Número de mastocitos evidenciables con azul de toluidina por región histológica y grupo experimental .....	25
<b>Cuadro 4.</b> Número de mastocitos evidenciables con safranina-alcian blue por región histológica y grupo experimental.....	26
<b>Cuadro 5.</b> Coeficientes de correlaciones de Pearson para las distintas variables en el conjunto de grupos experimentales .....	27

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AB** = Alcian Blue

**Bip NE** = Células bipolares del NE del VNO

**ELR** = epitelio libre re receptores del VNO

**ER** = epitelio respiratorio

**GB** = glándulas de Bowman

**GDB** = glándulas dorsales de Bowman

**GJ** = glándulas de Jacobson

**GVB** = glándulas ventrales de Bowman

**IL-4** = interleucina 4

**IL-5** = interleucina 5

**IL-6** = interleucina 6

**IL-13** = interleucina 13

**MM** = mastocitos de la mucosa

**MTC** = mastocitos del tejido conjuntivo

**MPS** = mucopolisacáridos

**MPSA** = mucopolisacáridos ácidos

**MPSN** = mucopolisacaridos neutros

**NE** = Neuroepitelio del VNO

**NE osc** = células oscuras del NE del VNO

**NV**= nervios del VNO

**PAF**= platelet activating factor (factor activador de plaquetas)

**PAS** = ácido peryódico de Schiff

**SOA** = sistema olfatorio accesorio

**Sup NE** = superficie del NE

**Sup ELR** = superficie del ELR

**TN**= tabique nasal

**TNF- $\alpha$**  = factor de necrosis tumoral alfa

**VNO** = órgano vémeronasal



## **RESUMEN**

El órgano vomeronasal (VNO) está vinculado a distintas conductas sociales de los mamíferos a través de la detección de feromonas. Esto incluye la actividad reproductiva. Es un órgano par, en forma de tubo, ubicado a ambos lados de la porción más ventral del tabique nasal. Presenta dos epitelios: neuroepitelio (NE) y epitelio libre de receptores (ELR). Las glándulas de Jacobson (GJ) asociadas al VNO vacían sus secreciones en la luz del órgano. En el tejido conjuntivo de la mucosa del tabique nasal, se encuentran las glándulas de Bowman, dorsales (GDB) y ventrales (GVB). Para estudiar el desarrollo normal del VNO, se utilizaron ratas de 5, 15, 25 y 35 días de edad ( $n = 5$  para cada grupo). Para estudiar la influencia de la subnutrición fetal a puberal en animales de 100 días, se utilizó: 1) 4 madres alimentadas *ad libitum*, cuyos crías macho ( $n=7$ ) formaron el grupo C, 2) madres alimentadas al 40% de los requerimientos nutricionales de gestación (primera restricción: *in utero*) de donde se obtuvieron los animales del grupo T ( $n=7$ ). Del parto al destete se realizó la segunda restricción para las crías del grupo T, por camada grande ( $n=14$ ), las madres fueron alimentadas *ad libitum*. En todos los grupos experimentales fueron evaluados: positividad a las técnicas de PAS y Alcian Blue (AB) en epitelios y glándulas con un método semicuantitativo. Fueron contados los 2 tipos de mastocitos: de la mucosa (MM) y del tejido conjuntivo (MTC), en la cavidad nasal. Las medias fueron comparadas por ANOVA, se calcularon correlaciones entre variables ( $p \leq 0.05$ ). Este es el primer estudio semicuantitativo sobre la positividad a las técnicas PAS y AB y la densidad de mastocitos en el VNO, la mucosa nasal y las glándulas asociadas. En términos generales, la secreción de MPSN (PASpositividad) y MPSA (ABpositividad) aumentó con la edad. En algunas variables, los valores máximos se encontraron en la vida adulta, mientras que en la mayoría de las variables, los valores fueron máximos en la postpubertad o las primeras etapas de la vida adulta y disminuyeron a los 100 días de edad. La mayor parte de las variables fueron afectadas por el tratamiento experimental. Esto indica un efecto importante de programación fetal por subnutrición sobre la intensidad secretora del VNO y de la mucosa nasal, y sobre la densidad de mastocitos en la mucosa nasal. Esto último sugiere programación de la intensidad de las reacciones alérgicas. La correlación entre la densidad de mastocitos y los índices de PAS positividad en las células bipolares y oscuras del neuroepitelio del VNO sugiere que existe cierta relación entre la densidad de mastocitos y la actividad del neuroepitelio del VNO.

**Palabras clave** – VNO, programación fetal, subnutrición, histoquímica, mastocitos.

## **SUMMARY**

The vomeronasal organ (VNO) is related to various social interactions in mammals, though pheromone detection. This includes reproductive activity. The VNO is a tubular, paired organ, located on both sides of the ventral portion of the nasal septum. It is lined by two epithelia: the neuroepithelium (NE) and the receptor-free epithelium (ELR). Jacobson glands (GJ) are associated with the VNO, and discharge their secretions into the lumen of the organ. In the tissue of the nasal septal mucosa, there are dorsal (GDB) and ventral (GVB) Bowman's glands. Rats 5, 15, 25 and 35 days old (n = 5 for each group) were used to study the normal development of the VNO. In order to study the influence of undernutrition from fetal to pubertal life in 100 days old animals: 1) 4 mothers were fed *ad libitum*, whose male offspring (n = 7) formed the group C (control). 2) 4 mothers were fed 40% of pregnancy nutritional requirements (first restriction: *in utero*) whose male offspring (n = 7) formed the group T (n = 7). Group T was restricted from birth to weaning with large litters (n = 14), and mothers fed *ad libitum*. In all experimental groups we evaluated: positivity to PAS and Alcian Blue (AB) in epithelia and glands with a semiquantitative method. Two types of mast cells: the mucosal mast cells (MM) and connective tissue mast cells (MTC) were counted in the nasal cavity. Means were compared by ANOVA, We calculated correlations between variables ( $p \leq 0.05$ ). This is the first semiquantitative study of the positivity to PAS and AB techniques and density of mast cells in the VNO, the nasal mucosa and associated glands. Most of the variables were affected by the experimental treatment, indicating a significant effect of fetal programming by undernutrition on VNO and nasal mucosa secretory activity and the density of mast cells in the nasal mucosa, which suggests programming of allergic reactions intensity. In summary, the secretion of neutral and acidic mucopolisaccharides increased with age. For some variables, maximum values were reached in puberty or early adult life, and diminished later at 100 days of age. Most variables were affected by the experimental treatment, indicating fetal programming by early life subnutrition on VNO secretory activity and mastocyte density in the nasal mucosa. This suggests fetal programming of allergic reaction intensity. The correlation between mastocyte density and PAS positivity indexes in bipolar and dark cells of the VNO neuroepithelium suggest some relationship between mastocytes and VNO function.

**Key words** – VNO, fetal programming, undernutrition, histochemistry, mast cells.

# **1. INTRODUCCIÓN**

La reproducción es un factor fundamental que incide directamente en la producción animal. El órgano vomeronasal (VNO) está vinculado a la actividad reproductiva de los mamíferos, y a otras actividades de interacción social. Los estudios que se realicen sobre este órgano y sus glándulas asociadas, y la información generada puede llegar a ser de utilidad para optimizar el manejo o la reproducción animal.

La nutrición es el factor limitante más importante en los sistemas de producción animal. En nuestro país, ocurren periodos de subnutrición en los sistemas extensivos de producción ovina y de ganado de carne, agravándose por las sequías esporádicas. Por otra parte, en el ganado lechero, cuando las hembras están gestando y tienen que producir leche, puede que ocurra estrés nutricional tanto en la madre como en el feto, aún si la madre está al límite de su capacidad de consumo de alimento de buena calidad.

La programación fetal refiere a las consecuencias permanentes en la vida adulta del animal, generadas a partir de la exposición a determinados efectos en etapas claves en el desarrollo animal.

La subnutrición fetal a puberal puede “programar”, por lo tanto, el desarrollo de un órgano o sistema, afectando de forma duradera aspectos esenciales como intensidad y tipo de secreciones glandulares, o densidad de una determinada célula, con la consiguiente consecuencia funcional para el animal adulto.

La rata es un animal bastante sensible a los efectos de la nutrición y en esa especie se ha demostrado programación fetal. Es un animal utilizado para este tipo de experimentos por su gestación y crecimiento rápidos.

Es posible que la limitación nutricional sufrida por las ratas que se utilizaron en este trabajo, durante su desarrollo tanto pre como postnatal, pueda generar alteraciones definitivas, alterando tejidos morfológicamente y tal vez con consecuencias fisiológicas.

La densidad de mastocitos, habla de la tendencia a sufrir reacciones alérgicas por los animales. El efecto de la programación fetal por subnutrición en el número y distribución de estas células, genera información interesante en el aspecto inmunológico y patológico de la vida del animal. Los mastocitos de la mucosa nasal están relacionados con las reacciones alérgicas nasales, y los mastocitos asociados al VNO, pueden tener una relación funcional con dicho órgano. Las eventuales diferencias observadas entre animales programados y sin programar (con desarrollo normal) pueden generar información interesante a este respecto.

## **2. REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **2.1. El órgano vomeronasal**

El órgano vomeronasal (VNO) es un órgano quimiorreceptor que detecta feromonas en el medio ambiente. Es un órgano vinculado a la actividad reproductiva normal de los mamíferos (Keverne, 2004). Se acepta que el VNO está especializado para la detección de ciertos tipos de sustancias odoríferas, que se caracterizan por la baja volatilidad y un peso molecular de hasta 66 kDa (Wysocki y col., 1985). Por lo tanto el VNO y las estructuras nerviosas asociadas pueden ser considerados como un sistema olfatorio secundario o accesorio (SOA) (Keverne, 1978).

El SOA se compone de neuronas bipolares quimiorreceptoras (Bip NE) en el VNO y su vía central neuronal transcurre a través del bulbo olfatorio accesorio (BOA), la amígdala y el cerebro anterior basal (Meredith, 1991).

El VNO es un órgano par, en forma de tubo, que se encuentra a ambos lados del tabique nasal en la zona ventral de la cavidad nasal y su luz tiene, al corte transversal, forma de media luna (Vacarezza y col., 1981). Fue descrito por primera vez en 1809, por el anatomista danés Ludwig Jacobson (Jacobson, 1809). La luz del VNO está tapizada por dos tipos de epitelios: en su cara cóncava, un neuroepitelio (NE), que contiene neuronas con función quimiorreceptora. El otro epitelio, llamado epitelio libre de receptores (ELR), es un epitelio pseudoestratificado ciliado, similar al epitelio respiratorio, de forma convexa.

En el extremo rostral del VNO, el cartilago vomeronasal cubre sólo las caras inferior y medial del órgano vomeronasal. Más caudalmente el cartilago rodea el VNO y los vasos relacionados, formando junto con el tabique nasal, una cavidad tubular donde se ubican estas estructuras.

El VNO de la rata es una estructura tubular de 6-7 mm de longitud y 1 mm de ancho. El tamaño y el contorno interno del VNO varían a lo largo de su eje longitudinal. En la parte rostral del VNO, la luz está limitada por dos paredes planas. Hacia caudal, el VNO comienza a aumentar de diámetro, la pared lateral del tubo se vuelve convexa y la pared medial pasa a ser cóncava. Posteriormente, el extremo caudal del VNO se va estrechando y termina ciego. La luz del VNO se comunica con la fosa nasal a través de un orificio situado en el extremo rostral del órgano en la rata (Vacarezza y col., 1981; Meredith, 1991). Tres a cuatro nervios surgen del VNO. Estos nervios se encuentran en la submucosa del tabique nasal, atraviesan la lámina cribosa y, después de correr a lo largo de la cara medial del bulbo olfatorio principal, llegan finalmente al bulbo olfatorio accesorio (Vacarezza y col., 1981).

Vacarezza y col. (1981) hicieron una descripción histológica detallada del VNO de la rata. Distinguieron tres segmentos a lo largo de este órgano tubular, entre los extremos rostral y caudal del VNO.

**1) El segmento rostral** es la porción que se abre a la cavidad nasal: está cubierto por un epitelio estratificado plano en su primera parte y después se continúa hacia caudal como un tubo aplanado lateralmente, de aproximadamente 1 mm de largo, cubierto por epitelio pseudoestratificado cilíndrico.

**2) El segmento medio** (alrededor de 5 mm de largo) en su extremo rostral se inicia de forma aplanada, pero continúa hacia caudal con la típica forma de media luna. Al principio, la luz en media luna apunta con sus extremos hacia lateral, y el neuroepitelio (NE) se encuentra en el lado medial, junto al tabique nasal. A medida que se avanza hacia caudal a lo largo del segmento medio, el VNO va rotando, de tal manera que la luz en media luna apunta con sus extremos hacia dorsal, y el neuroepitelio (NE) se encuentra ventralmente, cercano al piso de la cavidad nasal. Por lo tanto, el segmento medio del VNO presenta los 2 tipos de epitelio que estudiamos en el presente trabajo: el ELR, de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de altura, cubre la pared lateral en la parte rostral del segmento. En su parte caudal, cubre la pared superior. El neuroepitelio (NE), de alrededor de 140  $\mu\text{m}$  de altura, en la porción caudal del segmento medio cubre toda la pared medial, mientras que en el extremo caudal cubre la pared ventral. Dentro del neuroepitelio (NE) puede reconocerse tres sectores:

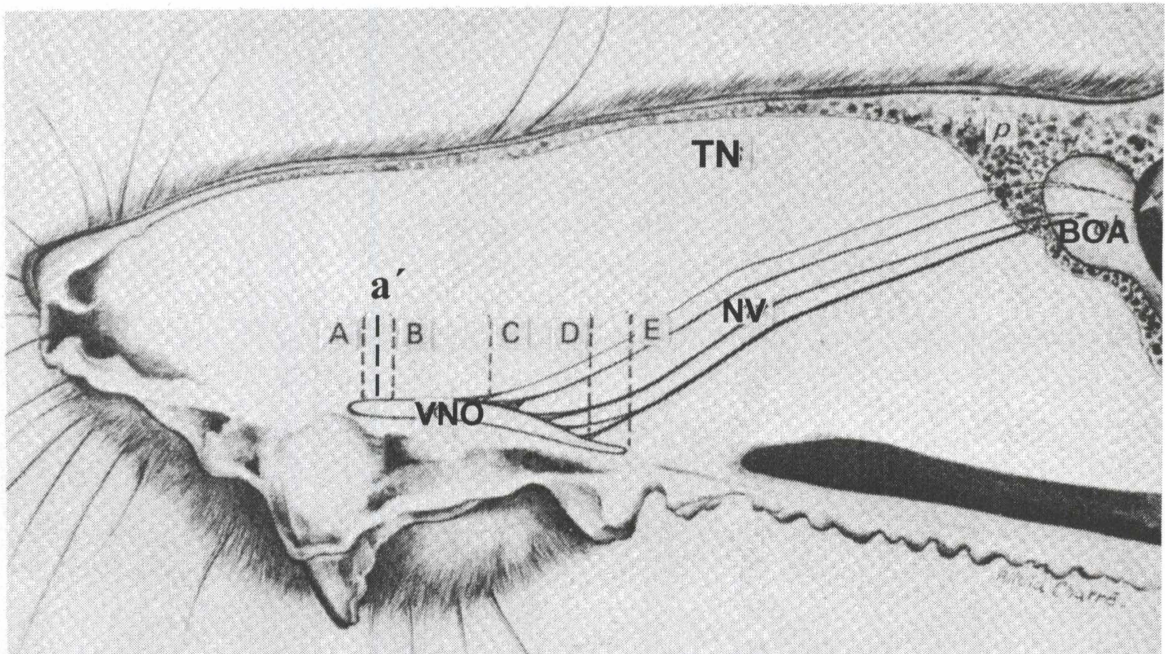
(1) una capa superficial formada por las prolongaciones de las células subyacentes;

(2) varias capas de células bipolares con núcleos redondeados y claros. A diferencia de lo que ocurre en la rata, Tanigachi (2007) describió núcleos alargados en las células sensoriales del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*). Hay pocas células basales dispersas entre las células bipolares más profundas, sin que lleguen a formar una capa distinta. Es interesante, que un número importante de capilares sanguíneos, penetran en el espesor de este grueso epitelio, alcanzando su capa más superficial.

(3) Por último, y más profundamente, una capa de células de soporte, alargadas y con núcleos ovales oscuros, hacen contacto con la lámina basal. Este epitelio desaparece en el extremo caudal del segmento medio y el epitelio seudoestratificado cambia gradualmente a un epitelio cilíndrico simple.

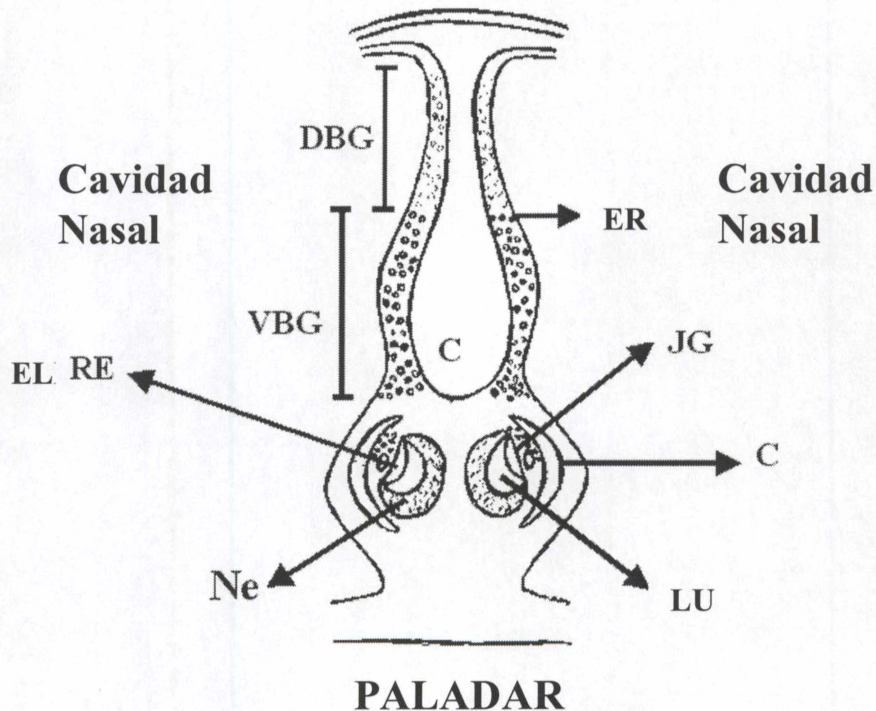
**3) El segmento caudal** del VNO, de 0-5mm de largo, muestra un epitelio cilíndrico simple en toda su luz (Vacarezza y col., 1981) y carece de neuroepitelio (NE), por lo que no cumpliría funciones de recepción de estímulos.

Aunque son tres los segmentos histológicos, desde el punto de vista microanatómico, el VNO puede dividirse a lo largo de su eje longitudinal en cuatro cuartos diferentes, de longitud aproximadamente igual, de acuerdo a lo que se describe en la figura 1, ya que el segmento medio del VNO puede subdividirse en dos regiones, según la rotación de la luz en forma de medialuna: región 1 y 2 (rostral), 3 (media - anterior), 4 (media - caudal) y 5 (caudal). Las regiones 3 y 4 son las que contienen quimiorreceptores.



**Figura 1.** Cráneo de rata, corte lateral (Vacarezza y col., 1981). TN: tabique nasal. NV: nervios del VNO. **Zona entre A y a' = región 1.** Primera porción del segmento rostral, cubierta por un epitelio estratificado plano. **Zona entre a' y B = región 2.** Segunda porción del segmento rostral: tubo aplanado lateralmente, cubierto por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico. **Zona entre B y D: segmento medio.** **Entre B y C = región 3:** el ELR está ubicado dorsalmente; **entre C y D = región 4:** el ELR está ubicado lateralmente. **Zona entre D y E = región 5.** Segmento caudal.

### ZONA DORSAL DEL HOCICO



**FIGURA 2.** Tabique nasal de la rata adulta. Se describe la ubicación del epitelio respiratorio (ER), el cartílago (C) del tabique nasal, el VNO cortado transversalmente en su región 4 (la región estudiada en esta tesis), donde se encuentra la típica forma de media luna, con el epitelio libre de receptores (ELR) ubicado lateralmente, la luz en forma de media luna (LU) y el neuroepitelio (NE) ubicado a medial con el cartílago (C) en forma de media luna a lateral. Se observa las diferentes ubicaciones de

las glándulas del complejo VNO, glándulas de Jacobson (GJ) y del tabique nasal glándulas ventrales y dorsales de Bowman (GVB, GDB).

El VNO tiene asociadas glándulas exocrinas llamadas glándulas de Jacobson (GJ) que se encuentran en el tejido conjuntivo que rodea al ELR (Taniguchi y col., 1996). Las GJ vacían sus secreciones en la luz del VNO, a través de conductos cortos, en lugares variados alrededor del epitelio VNO (Roslinski y col., 2000; Salazar y col., 1997). Las glándulas producen un líquido en el cual se disuelven sustancias odoríferas no volátiles (Mendoza, 1986). Estas secreciones son probablemente necesarias para facilitar la recepción de las sustancias odoríferas (Eccles, 1982). La secreción de las GJ es esencial para que el epitelio quimiorreceptor contacte con las feromonas (Eccles, 1982; Mendoza, 1986; Taniguchi y col., 1993). En el tejido conjuntivo de la mucosa del tabique nasal, se encuentran las glándulas de Bowman (GB), glándulas túbuloacinares similares a las GJ (Taniguchi y col., 1996). Las GB pueden subdividirse en porciones dorsal (GDB) y ventral (GVB).

El conjunto de VNO, glándulas de Jacobson (GJ), cartílago, venas y nervios asociados forman el complejo VNO (Vacarezza y col., 1981). Para que las sustancias odoríferas sean detectadas por las neuronas sensoriales que se encuentran ubicadas en el VNO, generalmente se requiere que los animales entren en contacto entre sí y acerquen los fluidos que contienen estímulos externos, tales como orina y otras secreciones corporales, que son ricos en señales químicas (Novotny, 2003). Existe un mecanismo de bombeo que facilita la entrada de estas sustancias en el VNO (Meredith, 1994) de modo que el tejido que rodea al VNO tiene un papel clave en su funcionamiento. Las glándulas segregan su contenido a la luz del VNO en los momentos apropiados, y la dilatación de los vasos sanguíneos confiere erectilidad al complejo (Salazar y col., 1998). Estos procesos son controlados por el sistema nervioso autónomo (Meredith, 1994) por estímulos vasomotores de las venas cavernosas que provocan la entrada de los fluidos (Meredith y col., 1980; Eccles, 1982). Las estructuras que encierra el tejido blando del VNO, que en la mayoría de especies son cartilaginosos, actúan para proteger esa bomba (Salazar y col., 1995).

Los estímulos pueden ser acercados por los movimientos de la lengua o la nariz en algunas especies. En muchas especies de mamíferos, el órgano se abre en el canal nasopalatino, que conecta la nariz y la boca, por lo tanto pueden recibir estímulos o de la cavidad nasal o de la cavidad bucal. En varias especies, la lengua puede ser utilizada para introducir materiales en los orificios nasopalatinos, para que los estímulos químicos hagan contacto con el VNO. El "flehmen" parece movilizar el tejido alrededor de los conductos para ayudar en la entrega de estímulos al VNO (Meredith, 1991).

La influencia del VNO sobre la actividad reproductiva puede evidenciarse, por ejemplo, en el aumento del rendimiento sexual de carneros estimulados por feromonas de ovejas en celo. Los carneros normales montan y eyaculan más veces que los carneros cuyo VNO fue inactivado, y las feromonas de oveja están implicadas en la elección de pareja por parte del carnero (Ungerfeld y col., 2006). Por otra parte, el VNO tiene un papel en el comportamiento agresivo que contribuye a establecer y mantener la jerarquía social de la especie bovina (Klemm y col., 1984). De manera similar, los conejos sin actividad del VNO presentan una reducción de la capacidad de reproducción y un aumento de la agresividad (Aron,

1979; Gaafar y col., 1998). En ciertas especies de roedores cricétidos (*Microtus pennsylvanicus*) la información sensorial mediada a través del VNO no es necesaria para la inducción del estro (Meek y col., 1994) mientras que en otras especies de cricétidos el VNO sí es importante para la inducción del estro (*Microtus ochrogaster*, Curtis y col., 2001), lo que sugiere funciones distintas del VNO según el estilo de vida y la organización social de cada especie.

## 2.2. Las tinciones de PAS y AB y el VNO

Las tinciones de PAS (ácido periódico de Schiff) y Alcian Blue (AB) son métodos histoquímicos ampliamente utilizados para demostrar las características de las secreciones mucosas. La técnica de PAS oxida grupos 1,2-glicoles a grupos aldehído, que entonces reaccionan con el reactivo de Schiff produciendo una coloración magenta.

Los mucopolisacáridos neutros (MPSN) son positivos para la técnica de PAS. Los mucopolisacáridos ácidos (MPSA) son polisacáridos que no contienen grupos alcohólicos en posición 1,2 glicerol, sino grupos carboxílicos o sulfatados (PAS negativos). Por otro lado, la técnica de AB evidencia polisacáridos ácidos, produciendo una coloración cian (AFIP, 1995; García del Moral, 1996; Spicer, 1960). El AB es un compuesto químico derivado del grupo de las ftalocianinas (moléculas que tienen un átomo de cobre central, en torno al que se disponen 4 anillos aromáticos nitrogenados) sustancias básicas que se ligan a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos (MPS) dando lugar a un compuesto salino entre ellos. A pH 2,5 el AB colorea los MPSA sulfatados, más los grupos carboxílicos de los ácidos urónicos. Con el AB a pH 1,0, los MPSA sulfatados siguen siendo ionizables (esta es la variante particular de la técnica de AB que hemos utilizado en esta tesis). Los MPSA no sulfatados pierden esta capacidad y no se colorean con el AB pH 1,0. Con el AB a pH 0,5, reaccionan positivamente los MPSA sulfatados más fuertes (García del Moral, 1996).

Los hidratos de carbono o glúcidos, son polialcoholes oxidados (polihidroxialdehídos y polihidroxicetonas) compuestos por carbono, oxígeno e hidrógeno. Las macromoléculas contenidas en las secreciones mucosas se subdividen en 3 grandes grupos: MPS, mucoproteínas y mucolípidos.

### 1. Los MPS

Pueden ser ácidos o neutros:

1.1. MPSN: constituidos por un azúcar (generalmente galactosa) y acetilglucosamina, pueden estar unidos a una proteína formando: glucoproteínas o mucoproteínas. Son Pas positivos.

1.2. MPSA: por hidrólisis originan monosacáridos, hexosaminas (glúcidos aminados), a veces ácido urónico (monosacárido con un grupo carboxílico en posición 6: ácido glucurónico, ácido galacturónico, etc) y casi siempre ácido sulfúrico o fosfórico. El mucopolisacárido ácido mas simple (y el más abundante en el organismo de los mamíferos) es el ácido hialurónico, constituido por unidades de disacáridos polimerizadas (ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina, García del



Moral, 1996).

Los MPSA se clasifican en:

1.2.1. MPSA sencillos: carboximucopolisacáridos o mucopolisacáridos no sulfatados (carboximucopolisacáridos), y

1.2.2. MPSA complejos o sulfatados (sulfomucopolisacáridos).

Los MPSA sencillos se clasifican en:

1.2.1.1. carboximucopolisacáridos epiteliales o sialomucinas, ricas en ácido siálico como radical en combinación con los grupos carboxílicos propios. Son PAS positivos, se colorean con AB a pH 2,5, son metacromáticos con la técnica azul de toluidina.

1.2.1.2. carboximucopolisacáridos conjuntivos, ricos en ácido hexurónico y que pueden contener ácido siálico. Son PAS negativos, se colorean con AB a pH 2,5 y son metacromáticos con la técnica azul de toluidina.

1.2.2. Los MPSA sulfatados se clasifican en:

1.2.2.1. epiteliales: contienen ésteres sulfatados (glándulas salivales y células caliciformes del colon) son PAS negativos, se colorean con AB a pH 1,0, son metacromáticos con la técnica azul de toluidina.

1.2.2.2. conjuntivos: ácidos glucurónicos sulfatados (como el condroitin sulfato, el heparán sulfato y el queratosulfato) poseen mayor carácter ácido. Se encuentran en cartílago, válvulas cardíacas, aorta y piel). Son PAS negativos, reaccionan con AB a pH 0,5, son metacromáticos con la técnica azul de toluidina.

2. Mucoproteínas: complejos de proteínas y polisacáridos. Son similares a glucoproteínas pero contienen más hexosamina. Son PAS positivas (células beta de la hipófisis, láminas basales, fibras colágenas y reticulina).

3. Mucolípidos: mezcla de polisacáridos y ácidos grasos complejos. Son PAS positivos (gangliósidos y cerebrósidos, García del Moral, 1996).

Los compuestos PAS positivos existentes en los tejidos son: polisacáridos simples (glucógeno, celulosa, etc.), mucopolisacáridos neutros (glándulas submucosas duodenales, epitelio gástrico y cápsulas bacterianas), mucoproteínas (mucinas de tipo digestivo y respiratorio, cuerpos de Russell de células plasmáticas y megacariocitos), glucoproteínas (del suero, lámina basal y fibras de reticulina, tiroglobulina, hormona TSH, gonadotropinas), glucolípidos (gangliósidos y cerebrósidos) y determinados pigmentos (ceroide, lipofuscinas, García del Moral, 1996).

La positividad observada para las técnicas de PAS y AB varía según la región y entre las especies: todas las GJ son positivas con la técnica de PAS en las ratas de más de 7 días, mientras que las glándulas GJ son negativas para la técnica de AB en ratas pre y postnatales (Garrosa, 1986). Oikawa y col., (1994) encontraron en la chinchilla (*Chinchilla laniger*) que las GJ son positivas para el PAS y negativas con la técnica de AB. Sin embargo, las glándulas de Bowman son positivas a la técnica de AB a partir de los 7 días de edad (Garrosa y col., 1986). Las GJ en humanos, primates (*Microcebus murinus*) y algunos roedores (*Microtus* spp.) son negativas para la técnica de AB (Roslinski y col., 2000). Sin embargo, las GJ son PAS positivas a la reacción en las tres especies. En los seres humanos, las GB dorsales en el tabique nasal (GDB) son negativas a la técnica de PAS (Katz y Merzel, 1977), pero

la mayoría de los acinos son PAS positivos en la zona ventral (GVB) y en todas las glándulas GJ. En consecuencia, parece que hay un cierto grado de especialización regional en la secreción de las glándulas GJ y GB, con diferencias entre las especies.

### 2.3. Mastocitos

Son las células libres más grandes del tejido conjuntivo (de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro). Se distribuyen por todo el organismo y se encuentran inmersos en el tejido conjuntivo (Tizard, 1996). Son más abundantes en zonas cercanas a pequeños vasos sanguíneos y bajo el epitelio del sistema respiratorio e intestinal. Actúan como centinelas, para que el sistema inmunitario pueda detectar la presencia de proteínas extrañas e inicie una respuesta inflamatoria local (Bloom, 1996).

Poseen numerosos gránulos basófilos en su citoplasma. Estos gránulos inducen metacromasia (capacidad de adquirir un color distinto al de la tinción con la que entran en contacto) con el colorante azul de toluidina. Esto se produce por la presencia de glucosaminoglucano sulfatado (heparina) en su interior. También contienen histamina, proteasas neutras (triptosa y quimasa) y un factor quimiotáctico para eosinófilos (Bloom, 1996), así como el factor quimiotáctico para los neutrófilos y factor de inmovilización de los neutrófilos (detiene la migración de las células una vez que han sido atraídas a la zona, no interfiere en la actividad fagocitaria). En algunas especies poseen, además, serotonina (Tizard, 1996).

Los mastocitos derivan de precursores hematopoyéticos, cumplen un papel principal en enfermedades alérgicas y en otras respuestas IgE dependientes. Participan en reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I), así como en otros procesos patológicos de hipersensibilidad retardada (tipo IV), cicatrización de heridas, fibrosis, y desórdenes neuroinmunológicos (esclerosis múltiple en humanos) (Galli 1993).

Los plasmocitos son los responsables de la producción de grandes cantidades de anticuerpos humorales, están ampliamente distribuidos en los tejidos conjuntivos, se originan de la diferenciación de los linfocitos B. La IgE se distingue porque no se introduce a la circulación (Bloom, 1996). La IgE es una inmunoglobulina termolábil con una estructura convencional de cuatro cadenas. Su cadena pesada contiene cuatro regiones  $C_H$  y un dominio  $V_H$ , lo que le da un peso molecular de 200 kDa. La mayor parte se encuentra unida a los receptores  $Fc\epsilon$  ( $Fc\epsilon RI$ ) con alta afinidad, en mastocitos, eosinófilos y basófilos. Cuando se fija a una célula tiene una vida media de 11 a 12 días. Algunas subclases de IgG pueden unirse también a los mastocitos, esta afinidad es menor, pueden considerarse de menor importancia (Tizard, 1996). Las IgE se unen también a otro receptor ( $Fc\epsilon RII$ ) con baja afinidad, que se encuentra en NK, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, plaquetas y células B (Tizard, 2006).

La respuesta de los mastocitos a los antígenos, se produce cuando la IgE unida al  $Fc\epsilon RI$  del mastocito se enlaza con un antígeno estableciendo un enlace cruzado, se desencadenan una serie de reacciones que culminan con la liberación del contenido de sus gránulos. También se inicia la producción de muchos mediadores inflamatorios y citocinas. El enlace cruzado con el  $Fc\epsilon RI$  activa cinasas de tirosina.

Esto activa a la fosfolipasa C, lo que conduce a la producción de diacilglicerol y trifosfato de inositol, estos últimos aumentan los niveles intracelulares de calcio y activan cinasas de proteínas. Estas enzimas, junto a la miosina fosforilada de los filamentos intracelulares, hacen que los gránulos se muevan a la superficie celular, se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido en el líquido extracelular. El enlace cruzado, también activa una fosfolipasa que actúa en los fosfolípidos de la membrana para producir ácido araquidónico; otras enzimas metabolizan este ácido hasta obtener leucotrienos y prostaglandinas. Las cinasas de proteína promueven la traducción y expresión de los genes, lo que conduce a la síntesis y secreción de muchas citocinas. La extrusión de los gránulos puede darse en unos segundos después de que el antígeno se une al anticuerpo en la superficie celular (Tizard, 2006).

Los mastocitos liberan el contenido de sus gránulos a través de un proceso llamado exocitosis compuesta. En dicho proceso los gránulos se unen entre sí y por una abertura que se crea en la superficie de la célula (un canal limitado por membrana celular que se introduce profundamente en la célula) se libera el contenido de sus gránulos. Las células sobreviven a esta degranulación masiva y pueden volver a formar nuevos gránulos (Bloom, 1996).

Las lesiones inflamatorias características de la hipersensibilidad de tipo I ocurren cuando las sustancias contenidas dentro de los gránulos son liberadas. La histamina produce contracción del músculo liso en los bronquios, tracto gastrointestinal, útero y vejiga. Es un estímulo potente para las secreciones exocrinas (moco bronquial, saliva, lágrimas). Asimismo, los perros con tumores de mastocitos pueden desarrollar úlceras gástricas, por el estímulo de secreción gástrica mediada por la histamina. La serotonina liberada por los mastocitos de algunos roedores produce vasoconstricción que se traduce en un aumento de presión arterial. Por el contrario, en los grandes herbívoros domésticos, la serotonina mastocitaria produce vasodilatación. En ratas y ratones esta sustancia induce la formación de ronchas. Las proteasas neutras pueden destruir a las células vecinas y activar los componentes C3 y C5 del sistema del complemento para producir anafilatoxinas, así como las cininas. Las prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos y leucotrienos (formados a partir del ácido araquidónico) tienen efecto en el tono y la permeabilidad de los vasos. Los mastocitos son la fuente principal de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y TNF- $\alpha$  (Tizard, 1996).

La hipersensibilidad de tipo I son las reacciones inflamatorias agudas mediadas por moléculas de IgE, se deben a la acción de las moléculas liberadas por los mastocitos. Es probable que la reacción inflamatoria aguda desempeñe una función importante en la eliminación del patógeno. Este tipo de hipersensibilidad se vincula con la presencia de antígenos provenientes de helmintos y parece contribuir a la resistencia a esos parásitos (Tizard, 1996).

Los mastocitos y basófilos son células que juegan un papel importante en la iniciación y mantenimiento de la inflamación alérgica, y en particular en el asma y la rinitis (Braunstahl, 2001). La mucosa nasal de los niños alérgicos contiene mayor número de mastocitos que la de niños sanos (Vinke, 1999).

En los mastocitos existen 2 tipos de adrenoreceptores,  $\alpha$  y  $\beta$ . Tienen efectos

opuestos. Los fármacos  $\alpha$ -adrenérgicos (p. ej. noradrenalina, fenilefrina) o  $\beta$ -bloqueantes (p. ej. propanolol), estimulan la degranulación de los mastocitos. Los fármacos  $\beta$ -adrenérgicos inhiben la degranulación (p. ej. adrenalina, salbutamol, Tizard, 1996). Los  $\alpha$ -bloqueantes tales como la fentolamina, producen degranulación de mastocitos y bloquean los canales de  $K^+$  (Mc. Pherson, 1993).

Patógenos de la vía respiratoria como *Bordetella pertussis* o *Haemophilus influenzae*, producen bloqueo  $\beta$ . Las vías respiratorias de los animales afectados presentan inflamación intensa por la degranulación de los mastocitos. Además, estas afecciones pueden predisponer al desarrollo de alergias respiratorias (Tizard, 1996).

Existen datos que afirman que los sistemas inmunológico y nervioso no son entidades independientes (Ottaway, 1991; Cohen y col., 1994). Existe comunicación bidireccional entre los nervios y las células inmunes (McKay y col., 1994). Muchos estudios han demostrado que los neurotransmisores (p. ej. neuropéptidos) de los nervios pueden provocar la degranulación de los mastocitos (Shanahan y col., 1985) y que los mediadores de mastocitos (por ejemplo, histamina, serotonina y factor activador de plaquetas) modulan la neurotransmisión (Weinreich y col., 1992; Willard, 1992). Existe considerable evidencia de una asociación anatómica consistente entre los mastocitos y los nervios en los tejidos en todo el cuerpo (Stead y col., 1990). La yuxtaposición morfológica de los mastocitos y los nervios, por sí mismo, es de poco interés, si no fuera por la evidencia de la conexión fisiológica. La activación de los mastocitos da como resultado la liberación de una variedad de moléculas efectoras (metabolitos como el ácido araquidónico, 5-hidroxitriptamina, la histamina, las citoquinas) que pueden modular la actividad neuronal. Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que los neurotransmisores, tales como neuropéptidos, pueden regular la activación y/o degranulación de los mastocitos. En cuanto a la vía de comunicación recíproca, en estudios *in vitro* se demostró que los neurotransmisores, tales como neuropéptidos, pueden regular la activación de los mastocitos y/o su degranulación (Susuki y col., 1999). Siendo el NE (neuroepitelio del VNO) una estructura histológica con células receptoras neuronales, los cambios que sufra la población mastocitaria en la vecindad más próxima al VNO podrían tener algún vínculo con la morfología o función de dicho órgano.

Los mastocitos parecen tener diferentes morfologías, características bioquímicas y funcionales en diferentes partes del cuerpo (Rogers 1996; Noviana y col., 2001). Los mastocitos pueden diferenciarse en 2 tipos: mastocitos de la mucosa (MM) y mastocitos del tejido conjuntivo (MTC) (Tizard, 2006). En roedores y seres humanos, los mastocitos MTC pueden tener muchos gránulos uniformes, son ricos en histamina y heparina y son células que permanecen en niveles constantes en el organismo. Los mastocitos MM tienden a tener pocos gránulos que contienen sulfato de condroitina en lugar de heparina, contienen poca histamina (Befus, 1982; Enerbäck, 1981) y producen diferentes prostaglandinas y leucotrienos, así como factor activador plaquetario (*platelet-activating factor*, PAF). Estas células proliferan en respuesta a IL-3 e IL-4. Los animales con deficiencia de linfocitos T también tienen deficiencia en mastocitos MM. Se ha sugerido que los mastocitos MM responden de manera específica a los antígenos de los nematodos. La heparina de los mastocitos MTC y el sulfato de condroitina de los MM se liberan en el momento de la degranulación. La heparina tiene propiedades anticoagulantes (Tizard, 1996).

Maximow fue, probablemente, el primero en reconocer a los mastocitos MM como un tipo distinto de mastocito, al establecer que los mastocitos de la mucosa intestinal de la rata son atípicos, ya que sus características de coloración difieren de las de los mastocitos observados en otros sitios anatómicos (Maximow, 1906). Los mastocitos MTC se encuentran en la piel y también en el peritoneo (Enerbäck, 1981).

Los MM son muy sensibles a la regulación de las células T. La proliferación de mastocitos MM se produce durante las respuestas de las células T a ciertos parásitos intestinales en ratones y ratas (Galli y col., 1984; Mayrhofer, 1980; Jarrett y col., 1982; Guy-Grand y col., 1984). En ratones atímicos falta la respuesta de los mastocitos MM (Ruitenbergh y col., 1976). La mucosa intestinal de ratón atímico contiene precursores de mastocitos MM (Guy-Grand y col., 1984), sin embargo, y la proliferación de mastocitos MM se produce si los ratones atímicos son reconstituidos con células T antes de una infección intestinal experimental con nematodos (Ruitenbergh y col., 1976).

Estos dos tipos de mastocitos se diferencian fácilmente en roedores, utilizando diferentes técnicas de coloración, además de ubicarse en diferentes tejidos. Los mastocitos pueden tener diferentes contenidos granulares, que resultan en características histoquímicas heterogéneas con la técnica AB/safranina. La combinación de estos 2 colorantes hace que podamos distinguir mastocitos MM (azules), que contienen glicosaminoglicanos levemente sulfatados. Los mastocitos MTC (rojos) contienen glicosaminoglicanos altamente sulfatados. Los mastocitos MM difieren de los mastocitos MTC por el contenido de mucopolisacáridos, el contenido de IgE y la capacidad de respuesta para la degranulación de la célula (Karaca y col., 2008).

Los mastocitos identificados en la mucosa de las glándulas del estómago tienen características de mastocitos MM. Estos resultados sugieren que el fenotipo de los mastocitos puede ser notablemente influido por factores microambientales locales. Los mastocitos AB-positivos (MM) en la mucosa gástrica derivaron en realidad de los mastocitos peritoneales por vía parenteral y en virtud de determinadas circunstancias, los mastocitos MTC podrían dar lugar a células con al menos algunas de las características de mastocitos MM (Nakao y col. 1985).

Karaca y col. (2008), describe la presencia de mastocitos MM en el útero y ovarios de las cabras de Angora. Los 2 tipos de mastocitos (MM y MTC) se han descrito en la tráquea de la rata, los mastocitos MM son más numerosos que los MTC. Los mastocitos MM contienen un 10% de la histamina de los mastocitos MTC (Ikawati, 2001). También describieron MM en pulmones de rata (Ikawati, 2001). Los mastocitos MTC tienen una función significativa en la contracción de la tráquea, que es una de las respuestas inmediatas del asma (Ikawati, 2000). Los mastocitos MM por sí solos, no son suficientes para proporcionar condiciones adecuadas para inducir una contracción significativa de la tráquea (Ikawati, 2001). Se demostró que a pesar de que hay más mastocitos MM que mastocitos MTC, la capacidad de los mastocitos MM para producir leucotrienos, contribuye menos a la contracción de la tráquea en ratas (Ikawati, 2001).

La mucosa nasal está continuamente expuesta al aire y por lo tanto a patógenos y otros inmunógenos. Para lidiar con esto, está equipada con una compleja barrera de defensa que incluye componentes inmunes: linfocitos B que secretan principalmente inmunoglobulina (Ig) A o G; linfocitos T que secretan una variedad de citocinas; leucocitos, mastocitos, macrófagos, y los factores de defensa no específicos como la lactoferrina y la lisozima que son secretadas por inmunocitos de ciertas glándulas (Kraehenbuhl y Neutra, 1992). Se encontraron mastocitos MM en la mucosa nasal en humanos, y ocurriría una migración intraepitelial de los mastocitos MM como parte de la respuesta alérgica de la mucosa. Esta reacción se asemeja a la respuesta de ciertos roedores a nematodos (Enerbäck y col, 1986).

Getchell y Kulkarni (1995) encontraron mastocitos de la mucosa (MM) coloreados con AB, situados en el interior de la lámina propia del epitelio respiratorio (ELR) del VNO en ratas libres de anticuerpos contra virus. En este mismo epitelio también se describió la presencia de neutrófilos (Getchel, 1995).

Los mastocitos peritoneales de ratas Sprague-Dawley de 4, 12 y 40 semanas de edad, aumentan en número absoluto con la edad y casi en paralelo con el aumento en el peso corporal (Oudaira y col., 1980); esto además se acompaña de aumento de los niveles de histamina dentro de los mastocitos. Sin embargo, el aumento no es continuo, y se reportó un pico de mastocitos las 12 semanas de edad en ratas (Ahlfstedt y Håård 1987).

#### **2.4. El desarrollo normal del VNO**

A los 13 días de edad embrionaria de la rata, se observa un esbozo del VNO, que consiste en un grupo de células que proliferan de la placa olfatoria hacia la línea media (Garrosa, 1986).

En el hamster sirio, a los 11 días de gestación, la masa del epitelio de revestimiento separa una hendidura de la pared medial de la fosa olfativa para formar el VNO. A los 13 días de gestación, el epitelio respiratorio se encuentra en desarrollo, se observan figuras basales y la capa basal, en esta especie. Al primer día de nacido (1 día postparto), el NE se encuentra casi diferenciado (Taniguchi, 2008).

Hacia el final de la gestación, el VNO tiene ya un desarrollo completo de la estructura, mostrando la misma relación entre el NE y el ELR que existe en el animal adulto. Pero el pleno desarrollo de los epitelios, recién se produce hacia el final de la segunda semana postparto (14 días de vida) en la rata. En cuanto a las glándulas accesorias, existen rudimentos glandulares en la zona del VNO en los fetos de rata de 17 días, pero la glándula no manifiesta ningún signo de actividad hasta el séptimo día de vida postnatal, en que se observó PAS positividad. Esta positividad aumenta hacia los 14 días de vida postparto y continúa hasta la vida adulta de la rata. El cartílago en forma de media luna, que se encuentra protegiendo el complejo VNO, se osifica casi completamente, por el inicio de la tercera semana postparto, con la excepción de algunas regiones que se mantienen cartilaginosas en la rata adulta. Algunos capilares, que formarán parte del complejo VNO, ya se observan en los fetos de 17 días de edad, y también a los 20 días de vida fetal en la rata (Garrosa, 1986).

Este es el primer trabajo en que se usa un método semicuantitativo para la evaluación del desarrollo del complejo VNO en la vida postnatal por medio de técnicas histoquímicas, así como la primera vez que se cuantifican mastocitos a lo largo del desarrollo en la mucosa nasal.

## 2.5. La programación fetal y la nutrición

El estatus nutricional de una hembra durante la preñez tiene gran importancia para el crecimiento postnatal y el desarrollo de sus crías, y frecuentemente determina efectos permanentes en ellas ("programación fetal", revisión: Desai y Hales, 1997). Este concepto abarca los efectos de la malnutrición fetal sobre el desarrollo pre y postnatal y hasta la vida adulta (Engelbregt y col., 2000; Rhind y col., 2001). Una de las adaptaciones del feto del mamífero a la falta de nutrientes u oxígeno es la disminución de la tasa mitótica, especialmente en aquellos tejidos que están en rápida división celular en el momento de la carencia del nutriente. El efecto estaría mediado ya sea como efecto directo de la subnutrición, ya sea por concentraciones alteradas de factores de crecimiento u hormonas. Aún períodos cortos de malnutrición pueden así reducir permanentemente el número de células de un órgano en particular. Este es uno de los mecanismos por los cuales la subnutrición energética puede "programar" el organismo a largo plazo. También puede actuar a través de cambios en la distribución de tipos celulares, la retroalimentación hormonal, la actividad metabólica o, directamente, la estructura macroscópica de un órgano (Cooper y col., 2002).

La nutrición es el factor limitante más importante en los sistemas de producción animal (Brown, 1994, Kolver, 2003). Nuestro equipo ha encontrado efectos de la subnutrición sobre el desarrollo reproductivo, tanto en ovinos como en ratas. En los corderos Corriedale criados extensivamente a pastura natural en nuestro país, su pubertad se retrasa con respecto a animales mejor alimentados (Castrillejo y col., 1995). Las restricciones nutricionales a una oveja preñada pueden afectar la capacidad secretora de gonadotrofinas de la hipófisis en sus corderos neonatos ante un desafío de GnRH (Deligeorgis y col., 1996). Utilizando como modelo la rata (Genovese y col., 2010) encontramos que los machos adultos jóvenes (100 días) nacidos de madres que fueron subnutridas a lo largo de la gestación (40% del consumo *ad libitum* de sus controles), tienen menor número de células de Sertoli, ( $p=0,03$ ) y por lo tanto menor producción máxima de espermatozoides.

En base a todo esto, nos hemos planteado estudiar las posibles variaciones en la positividad a las técnicas de PAS y de AB durante el desarrollo del VNO, las glándulas exócrinas asociadas y la mucosa nasal, así como los posibles efectos de la programación fetal por subnutrición en las antedichas estructuras.

## **OBJETIVO GENERAL**

- 1) Determinar la distribución e intensidad de la presencia de mucopolisacáridos neutros y ácidos en el VNO, así como la distribución y tipo de mastocitos en la mucosa nasal de ratas macho desde la etapa neonatal hasta la vida adulta.
- 2) Determinar si la programación fetal por subnutrición durante la vida fetal a puberal influye sobre la distribución e intensidad de la presencia de mucopolisacáridos neutros y ácidos en el VNO, así como la distribución y tipo de mastocitos en la mucosa nasal de ratas macho adultas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Estudiar la distribución e intensidad de la positividad a la técnica de PAS en la zona 4 del VNO, las glándulas asociadas y las glándulas de la mucosa del tabique nasal en la rata macho a los 5, 15, 25, 35 y 100 días de edad y en machos adultos con subnutrición embrionaria a puberal.
- 2) Estudiar la distribución e intensidad de la positividad a la técnica de Alcian Blue en la zona 4 del VNO, las glándulas asociadas y las glándulas de la mucosa del tabique nasal en la rata macho a los 5, 15, 25, 35 y 100 días de edad y en machos adultos con subnutrición embrionaria a puberal.
- 3) Estudiar la distribución de los 2 tipos de mastocitos (MM y MTC), en 5 diferentes zonas de la cavidad nasal, con las técnicas de Azul de Toluidina y de Alcian-Safranina.

## **HIPOTESIS**

- 1) La distribución e intensidad de la presencia de mucopolisacáridos neutros y ácidos en el VNO, así como la distribución y tipo de mastocitos en la mucosa nasal de ratas macho varía desde la etapa neonatal hasta la vida adulta.
- 2) La programación fetal por subnutrición durante la vida fetal a puberal influye sobre la distribución e intensidad de la presencia de mucopolisacáridos neutros y ácidos en el VNO, así como la distribución y tipo de mastocitos en la mucosa nasal de ratas macho adultas.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Animales y Procedimientos de Muestreo**

**1) Para estudiar el desarrollo normal del VNO en ratas macho**, fueron utilizadas cinco ratas hembras vírgenes Sprague-Dawley, de 2 meses de edad, que fueron cubiertas por el mismo macho. Luego del parto, las crías fueron intercambiadas hasta organizar cinco camadas de 8 cachorros (numero estándar de camada), en las que al menos 7 crías eran machos.

El total de cachorros obtenidos fue de  $n = 56$ , obtenidos de las 5 ratas, fueron destetados a los 25 días de edad y alimentados con ración estándar para rata. Los cachorros machos se pesaron cada dos días y fueron sacrificados ( $n = 5$ ) a los 5, 15, 25 y 35 días de edad, (fueron sacrificados un total de 20 animales). A medida que se sacrificaban animales, se cubría la falta de estos con otro cachorro, para que no disminuyera el número de la camada ( $n = 8$ ). Las ratas fueron decapitadas, sus hocicos recortados, la piel y los tejidos superficiales blandos fueron retirados, el resto de la muestra fue fijada por inmersión en formol buffereado (Fig = 4). El manejo de estos animales se realizó en el Bioterio del Instituto Clemente Estable (2006).



**Figura 3.** Jaulas con entrepiso, diseñadas por nuestro equipo, para que los cachorros no accedan al alimento.

**2) Para estudiar la influencia de la subnutrición fetal a puberal** en la estructura del VNO y sus glándulas anexas, en la rata adulta, se utilizaron 8 ratas Sprague-

Dawley que fueron cubiertas por un único macho. La gestación se diagnosticó por el método de frotis vaginal (Marcondes y col., 2002).

Fueron alimentadas según grupo experimental:

1) *ad libitum*: grupo Control: C, el número de las madres fue de 4 (Fig. 5).

2) 40% de los requerimientos nutricionales de gestación, grupo Tratamiento: T, el número de las madres fue de 4 (**restricción *in utero***). El 40% del consumo *ad libitum* diario fue obtenido en un experimento preliminar ajustado diariamente a lo largo de la gestación (Fig. 5).

Del parto al destete (25 días de edad), las madres se alimentaron *ad libitum*, los cachorros no accedían a la ración. Se diseñaron jaulas, especialmente confeccionadas para evitar que las crías lleguen al alimento (Fig. 3).



Figura 4. Esquema de diseño experimental para los Grupos 5, 15, 25 y 35 días

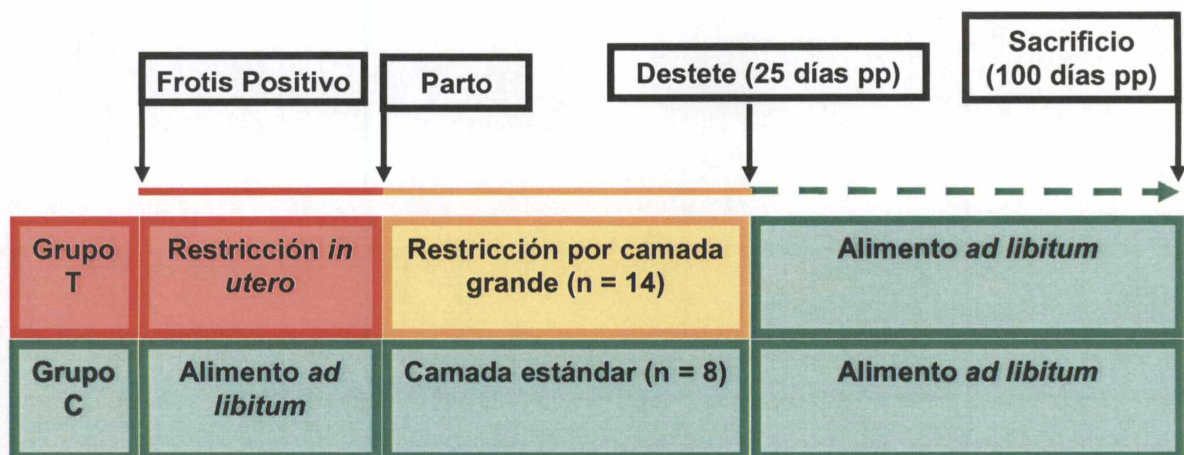


Figura 5. Esquema de diseño experimental para los animales de 100 días de edad (Grupos C y T).

Todos los cachorros machos (grupo C, n = 7 y Grupo T, n = 7) fueron alimentados *ad libitum* post destete hasta los 100 días de edad. A esa edad fueron pesados, sacrificados, los hocicos fueron muestreados, la piel y los tejidos superficiales

blandos fueron retirados, el resto de la muestra fue fijada por inmersión en formol buffereado.

### **3.2. Sacrificio de los animales**

Los animales fueron anestesiados (Ketamina i.m, 50 mg/kg) y decapitados con guillotina, según recomendación de la CHEA (Cursos organizados por la CHEA "Uso y manejo de Animales" año 2004, "Técnicas de Experimentación Animal" año 2007).

### **3.3. Procesamiento histológico**

Las muestras tomadas fueron sometidas a 20 días de fijación por inmersión (formol buffereado al 4% pH = 7,2), descalcificadas posteriormente por inmersión y agitación en solución tamponada de ácido fórmico (35 ml de ác. fórmico al 90%, 65 ml de solución acuosa de citrato al 20%) hasta que los huesos quedaran flexibles. Las muestras fueron deshidratadas y puestas en cloroformo y posteriormente embebidas en parafina, para formar el bloque. Las muestras fueron seccionadas en serie.

### **3.4. Técnicas empleadas**

**PAS-H:** Se utilizó una solución de ácido periódico al 1% (1g periodato de sodio, agua destilada hasta 100 ml) sobre las láminas, luego se lavó con agua destilada, y se sumergieron las láminas en el reactivo de Schiff (10 min). Se lavaron nuevamente y se sumergieron en una solución de hematoxilina de Meyer, luego fueron deshidratadas (concentraciones crecientes de etanol), aclaradas (xilol) y por último montadas (AFIP, 1995; García del Moral, 1996).

**Alcian Blue:** Para estudiar la distribución de su positividad, los cortes histológicos se colorearon con una solución de AB pH 1,0 (1,0 g Alcian blue 8GX, en 100 mL de ácido clorhídrico 0,1N), durante 30 min, con las láminas previamente desparafinadas y deshidratadas, y por último fueron montadas (AFIP, 1995; García del Moral, 1996; Spicer, 1960).

**Azul de toluidina:** Para estudiar la presencia de mastocitos, se utilizó la técnica de azul de toluidina al 1% en solución acuosa, pH 1,0 en 5 cortes de cavidad nasal de cada animal, durante 5 minutos (Karaca y col., 2008).

**Alcian Blue/Safranina:** Para estudiar la presencia y diferenciar los mastocitos del tejido conjuntivo (MTC) y los de la mucosa (MM), se colorearon 5 cortes de cavidad nasal por animal. La solución de AB/safranina se preparó con 0,9g de AB, 0,045g de safranina, 1,2g de sulfato amonio férrico, a un pH 1,0 ajustado con HCl 0,1 N. Se coloreó con la solución de AB/Safranina durante 30 minutos. Con esta técnica se evaluó la distribución de los mastocitos en la cavidad nasal (Karaca y col., 2008).

### 3.5. Evaluación de preparados histológicos

#### 3.4.1. Evaluación de preparados histológicos de PAS y AB:

Las láminas histológicas fueron evaluadas a ciegas por un observador experimentado (EN). Se evaluaron 500 células en cada uno de los compartimientos histológicos antedichos con un microscopio de luz (Olympus BX 50, Tokio, Japón) a 400x. La positividad al PAS y al AB fue clasificada (sistema semicuantitativo) según la intensidad de la tinción en una escala de: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado, (+++) intenso para cada una de las 500 células de cada compartimiento histológico. La positividad a la tinción fue evaluada en las siguientes estructuras histológicas: glándulas de Jacobson (GJ), glándulas ventrales de Bowman (GVB), glándulas dorsales de Bowman (GDB), neuroepitelio (NE) con sus dos tipos celulares (células oscuras=NEosc y células bipolares=BipNE), el ELR, las superficies del neuroepitelio del VNO (SupNE) y del epitelio libre de receptores (SupELR) para las dos técnicas utilizadas.

La cantidad de células identificadas en su positividad como negativas, leves, moderadas e intensas, en cada compartimiento histológico, fue expresada como porcentaje. Se calculó un índice de positividad (SI) para cada compartimiento histológico, en base a la siguiente ecuación:

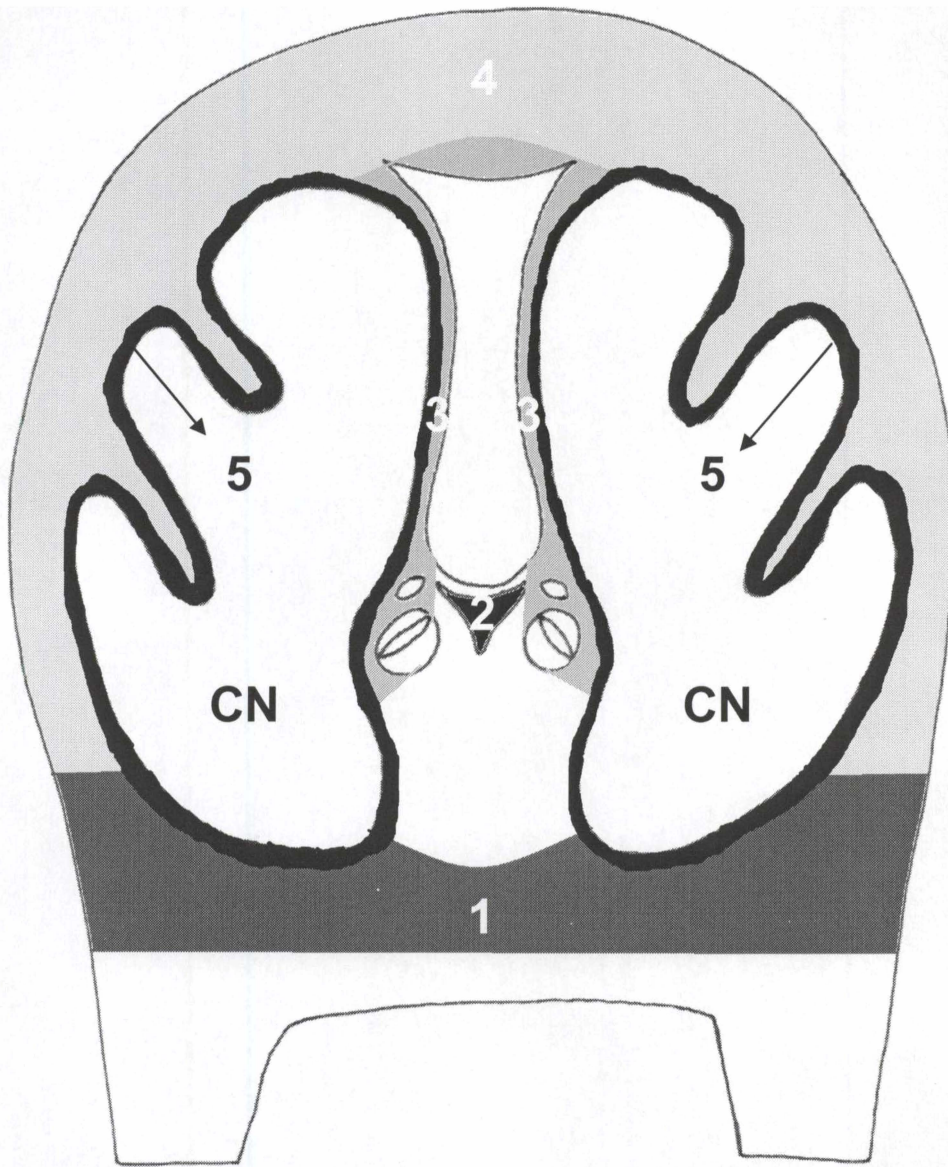
$$\text{Índice de positividad} = 1 \times n \text{ (SI1)} + 2 \times n \text{ (SI2)} + 3 \times n \text{ (SI3)}$$

donde  $n$  representa el número de células identificadas como negativas (no se les asigna valor en la fórmula), leve (SI1), moderada (SI2) o intensamente positivas (SI3), expresadas en porcentajes (Boos y col., 1996).

El cálculo del SI para cada compartimiento histológico y en las distintas regiones histológicas nos permitió generar una variable que cumple con los requisitos para ser tratada por análisis de varianza (ANOVA). Se transformó una variable semicuantitativa en una variable cuantitativa numérica continua.

#### 3.4.2. Evaluación de preparados histológicos de Azul de Toluidina y Alcian/Safranina:

Se evaluaron 5 secciones histológicas por animal. Se contaron los mastocitos presentes en las cinco diferentes zonas que se observan en la figura 6. Para la técnica de Azul de Toluidina se contaron todos los mastocitos encontrados, y para la técnica de Alcian/Safranina se contaron los mastocitos coloreados con safranina (MTC) o con alcian (MM).



**Figura 6.** Esquema de paredes y tabique de la cavidad nasal (CN) de la rata adulta, donde se observa las cinco diferentes zonas en que fueron evaluados los dos diferentes tipos de mastocitos. 1: piso de cavidad nasal, 2: conjuntivo interno de cavidad nasal. 3: corion mucosa de tabique nasal 4: corion del techo y pared de la cavidad nasal. 5: corion de la mucosa, techo y pared de la cavidad nasal.

### 3.6. Evaluación Estadística

El análisis estadístico se realizó con el software Statistica versión 6 (2007). Los resultados están expresados como media  $\pm$  DS. Las medias grupales fueron comparadas por ANOVA dentro de cada compartimiento histológico. Se calcularon correlaciones entre variables, analizando todos los grupos en su conjunto. En todos los casos, el nivel de significancia fue de  $P \leq 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Los pesos corporales al sacrificio de todos los grupos experimentales fueron diferentes entre sí (Fig. 7).

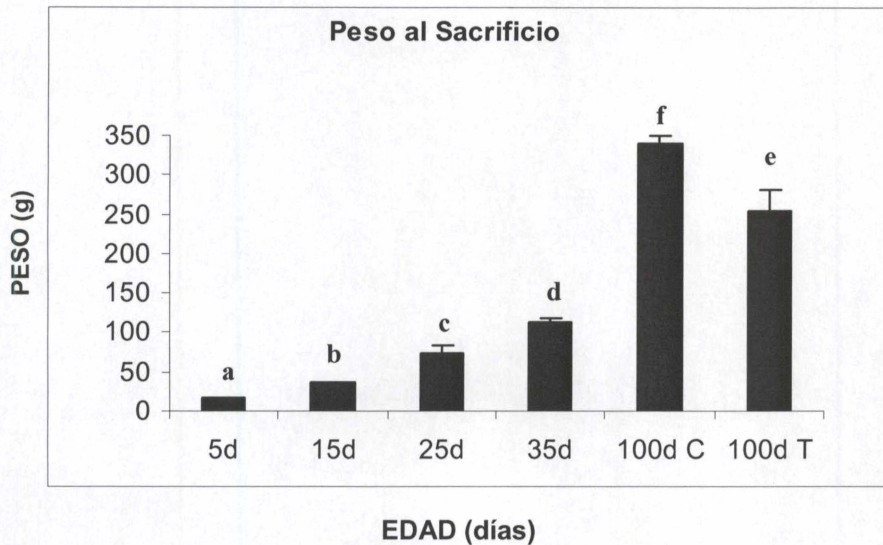
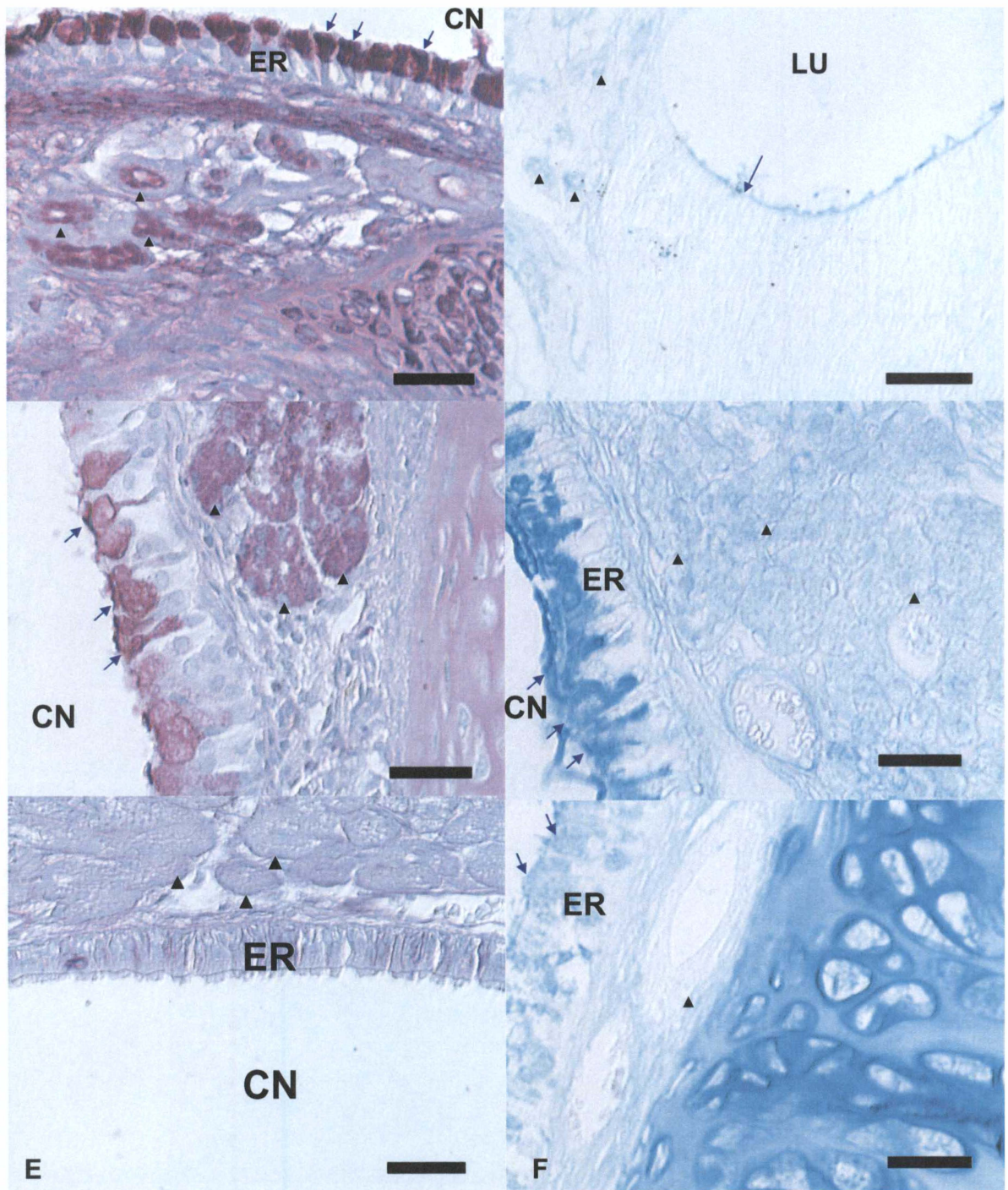


Figura 7. Pesos corporales al sacrificio (g, media  $\pm$  DS) de cada grupo experimental.

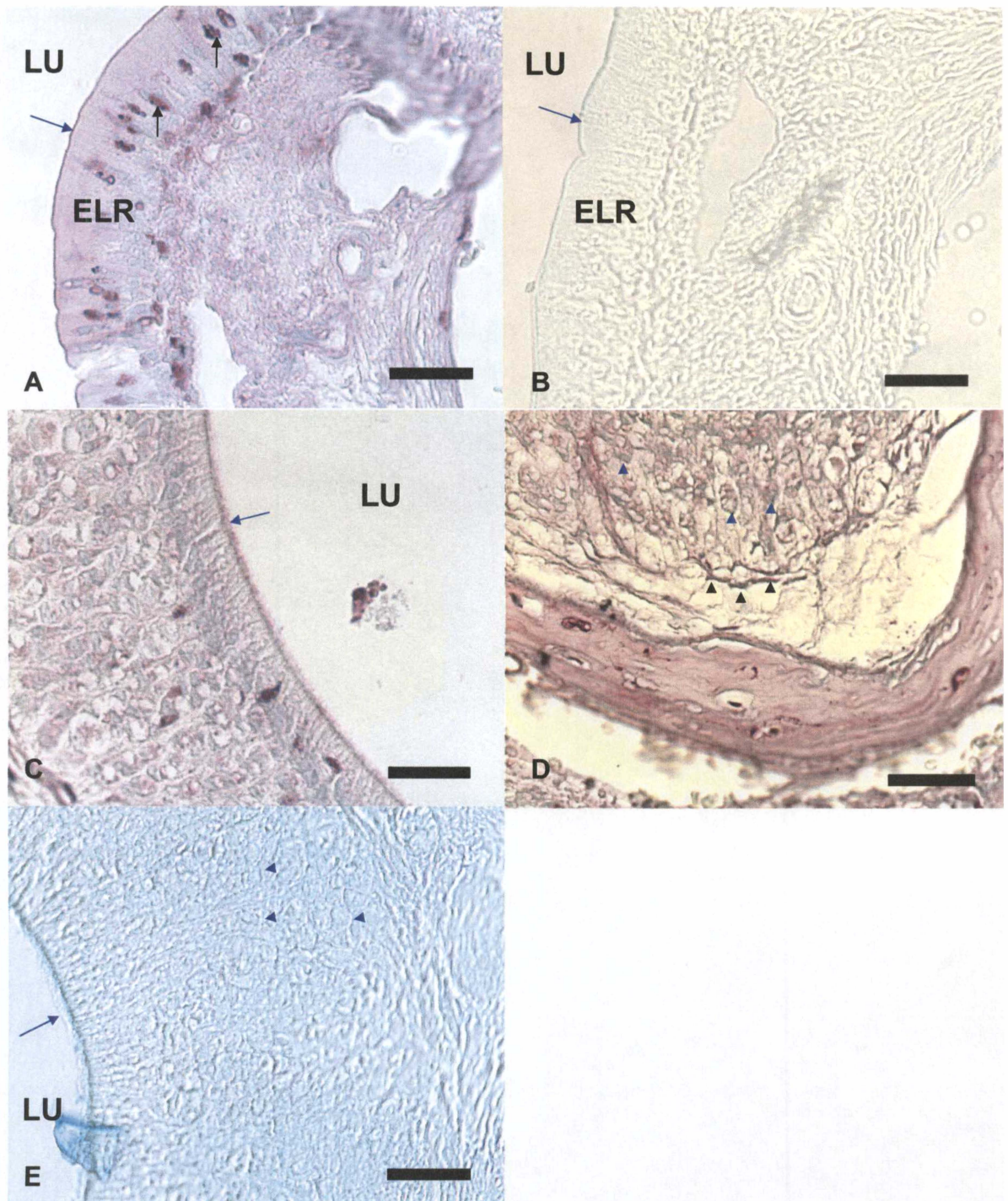
En el ELR, encontramos células caliciformes que presentaron PAS y AB positividad. Solo las células caliciformes fueron positivas a estas técnicas en el ELR. Estas células fueron más pequeñas que las células caliciformes del epitelio de la mucosa nasal en todos los animales estudiados (ver Figura 9).

A la inspección histológica cualitativa, los acinos de las GJ de todos los grupos experimentales, resultaron más pequeños en comparación con los de las GB tanto ventrales como dorsales (GVB y GDB).

Los índices de PAS positividad para los distintos compartimientos histológicos, están presentados en el Cuadro 1. Para las GJ y las GVB, los valores a los 5 días fueron menores que en el resto de los grupos. No hubo diferencias entre grupos en la Sup ELR. En las GDB, no hubo positividad ni a los 5 ni a los 15 días, los valores fueron máximos a los 25, 35 y 100 días C, y menores a los 100 días T. En el ELR, los valores a los 5 y 15 días y a los 100 días T fueron menores que a los 25, 35 y 100 días C, con los valores a los 25 días menores que a los 35 y 100. En las NE Osc sólo hubo positividad en el grupo 100 días T. En las Bip NE los valores fueron mínimos a los 5 y 15 días y máximos a los 100 días C. Los valores a los 100 días T fueron menores que a los 100 días C pero mayores que a otras edades. La Sup NE tuvo valores mínimos a los 35 días y máximos a los 100 días C, con valores intermedios en los otros grupos.

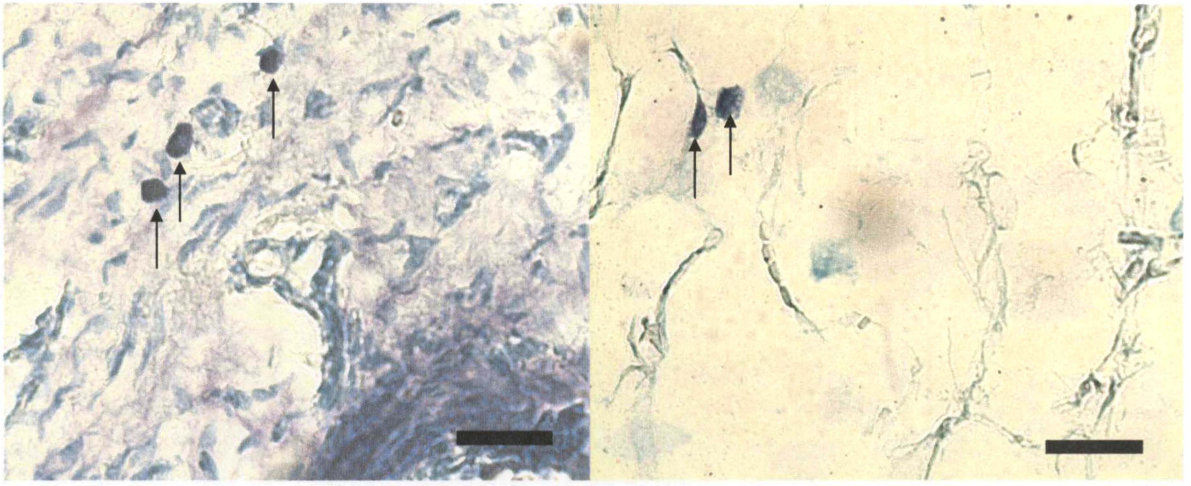


**Figura 8.** A y B: animal del grupo 5 días. A: mucosa del tabique nasal (zona 3) en su región más ventral (vecina al VNO), técnica de PAS. B: mucosa del tabique nasal (zona 3) en su región más ventral y NE del VNO, técnica de AB. Puntas de flechas negras: GJ; puntas de flechas azules: células caliciformes en el ER; flecha azul: Sup NE.  
 C y D: animal del grupo 15 días, porción media de la mucosa del tabique nasal, técnicas de PAS (C) y AB (D). Puntas de flechas negras: GVB; puntas de flechas azules: células caliciformes en el ER.  
 E y F: animal del grupo 25 días, porción dorsal de la mucosa del tabique nasal, técnicas de PAS (E) y AB (F). Puntas de flechas negras: GDB; puntas de flechas azules: células caliciformes en el ER.  
 Barras negras = 50µm.



**Figura 9.** A y B: VNO, ELR de un animal del Grupo C, técnicas de PAS (A) y AB (B). Flecha azul: Sup ELR; puntas de flechas negras: células caliciformes del ELR. C, D y E: VNO, NE de un animal del Grupo T, técnicas de PAS (C y D) y AB (E). Flechas azules: Sup NE; puntas de flechas azules: Bip NE; puntas de flechas negras: NE osc. Barras negras = 50 $\mu$ m.





**Figura 10:** Animal del grupo 35 días, mucosa nasal, zona 1 (ver Fig. 6). Flechas negras: mastocitos. A: técnica de azul toluidina. B: técnica de AB-safranina. Barras negras = 50 $\mu$ m.

Técnica PAS	5 días	15 días	25 días	35 días	100 días C	100 días T
GJ	129,1±72,7a	264,1±3,9b	269,8±2,0b	264,3±3,1b	268,7±12,0b	253,5±6,1b
GVB	188,3±105,1a	252,9±3,9b	289,8±2,5b	264,3±2,8b	271,2±10,6b	258,0±6,9b
GDB	0,0±0,0a	0,0±0,0a	98,7±0,9d	102,0±1,6d	75,5±9,6b	85,8±11,6c
ELR	48,6±30,6a	42,6±8,5a	73,1±3,8b	87,2±3,6bc	95,4±9,6c	40,4±5,0a
Sup ELR	3,4±1,7a	4,0 ±0,2a	4,6±0,4a	4,6±1,7a	5,9±0,2b	4,3±1,3a
NE Osc	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bip NE	46,9±27,5a	47,8±20,7a	75,0±8,3b	86,3±2,9b	159,0±5,4d	124,2±12,6c
Sup NE	3,3 ±1,8bc	4,0 ±1,1c	2,2±0,6a	2,8±0,3b	5,8±0,2d	3,7±0,7bc

**Cuadro 1.** Índices de PAS positividad para cada compartimiento histológico y grupo experimental. Valores seguidos de un mismo literal dentro de una misma fila no son diferentes ( $P<0,05$ ).

Los índices de AB positividad para los distintos compartimientos histológicos, están presentados en el Cuadro 2. Para las GJ los valores fueron menores a los 5 días y 100 días de edad (grupo T + grupo C). El valor máximo fue a los 25 días, un poco menor a los 35 días y menor aún a los 15 días. Para las GVB los menores valores se obtuvieron en los grupos C, 5 y 15 días. El grupo 25 días y el grupo T fueron iguales, el valor máximo fue a los 35 días. En las GDB los grupos 5, 15, 25 y 35 días fueron los valores menores. El grupo T fue de valor intermedio, y el valor mayor fue el grupo C. El ELR tuvo valores mínimos en el grupo de 5 días y a los 100 días de edad. Los valores fueron aumentando desde el grupo 15 días al de 35 días. En la Sup ELR los valores menores fueron en el grupo de 5 días y grupo T. Los valores mayores los obtuvieron los demás grupos. No se obtuvo positividad en las NE Osc. Las Bip NE tuvieron valores menores a los 5, 15 y 100 días. El valor mayor fue a los 25 días. Para la Sup NE el menor valor fue para el grupo T, luego grupo C y 5 días, y los valores máximos fueron 15, 25 y 35 días.

Técnica AB	5 días	15 días	25 días	35 días	100 días C	100 días T
GJ	0,5±0,5a	41,8±2,9b	146,0±6,1d	72,3±4,5c	0,1±0,2a	0,0±0,0a
GVB	1,0±0,5a	3,2±3,2a	20,0±6,3b	69,8±6,7c	1,8±1,2a	16,8±3,1b
GDB	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	31,5±14,0c	12,3±6,1b
ELR	0,0±0,0a	3,3±2,1b	12,8±0,5c	21,9±4,1d	0,0±0,0a	0,8±0,6a
Sup ELR	3,34±1,8ab	4,2±0,8b	3,8±0,6b	3,8±0,5b	4,3±0,5b	2,7±0,3a
NE Osc	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bip NE	0,0±0,0a	0,0±0,0a	34,6±4,1c	16,2±6,1b	0,0±0,0a	1,6±0,9a
Sup NE	4,2±2,4c	6,0±0,3d	6,2±0,5d	5,1±1,1cd	2,9±0,4b	1,5±0,5a

**Cuadro 2.** Índices de AB positividad para cada compartimiento histológico y grupo experimental. Valores seguidos de un mismo literal dentro de una misma fila no son diferentes ( $P<0,05$ ).

El número de mastocitos metacromáticos encontrados en la Zona 1 fue máximo a los 35 días, mínimo a los 5 días. El número obtenido a los 25 días fue mayor que a los 15 días. A los 100 días fue menor, el grupo T fue menor que el C. En la Zona 2, el número máximo fue a los 15 días. Valores medios fueron obtenidos a los 25 y 35 días. Los valores menores fueron a los 5 días y grupo T, mientras que el grupo C fue mayor que el T. En la Zona 4 se encontraron mastocitos metacromáticos a los 35 días de edad. Para los grupos 15, 25, 35 y C, en cada uno de ellos, los valores mas bajos fueron en las zonas 3, 4 y 5. El valor medio fue la zona 2 y el mayor en la zona 1. En el grupo T las zonas 2, 3, 4 y 5 fueron iguales y la zona 1 fue la del valor mayor. A los 5 días no se encontraron mastocitos.

Azul de Toluidina	5 días	15 días	25 días	35 días	100 días C	100 días T
Zona 1	0,0±0,0 a	40,7±2,2 dIII	43,5±1,5 eIII	55,0±1,8 fIII	4,0±1,0 cIII	1,8±1,6 bII
Zona 2	0,0±0,0 a	3,5±1,0 dII	1,0±0,0 cII	1,2±0,4 cII	0,4±0,5 bII	0,1±0,3 aI
Zona 3	0,0±0,0	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I
Zona 4	0,0±0,0a	0,0±0,0 aI	0,0±0,0 aI	0,3±0,5 bI	0,0±0,0 aI	0,0±0,0 aI
Zona 5	0,0±0,0	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I

**Cuadro 3.** Número de mastocitos evidenciables con azul de toluidina por región histológica y grupo experimental. Valores seguidos de un mismo literal dentro de una misma fila no son diferentes ( $P < 0,05$ ).

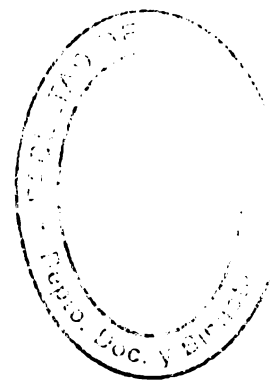
El número de MTC coloreados con Safranina – Alcian Blue, en la zona 1, fue máximo a los 35 días, y fue mayor a los 15 días que a los 25 días. Fue menor que en los grupos anteriores a los 100 días de edad, siendo a su vez menor en el grupo T que en el C. En la Zona 2, el valor menor fue a los 100 días, a los 25 y 35 días hubo valores intermedios y a los 15 días ocurrió el valor máximo. En la zona 3 el valor máximo fue a los 35 días. Para los grupos 15, 25 y C, en cada uno de ellos, los valores mas bajos fueron en las zonas 3, 4 y 5. El valor medio fue la zona 2 y el mayor en la zona 1. En el grupo T las zonas 2, 3, 4 y 5 fueron iguales y la zona 1 fue la del valor mayor. A los 35 días los valores menores fueron en las zonas 3 y 5, le siguió la zona 4 y luego 3, y el valor máximo fue en la zona 1.

No se encontraron MM en ninguna de las zonas estudiadas, en ningún grupo experimental.

Safranina- Alcian Blue	5 días	15 días	25 días	35 días	100 días C	100 días T
Zona 1 MTC	0,0±0,0 a	46,6±6,3 eIII	43,7±1,3 dIII	55,0±1,6 fIV	4,0±1,1 cIII	1,9±1,6 bII
Zona 2 MTC	0,0±0,0a	2,0±1,4 cII	1,1±0,4 bII	1,2±0,4 bIII	0,2±0,4 aII	0,1±0,3 aI
Zona 3 MTC	0,0±0,0	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,1 I
Zona 4 MTC	0,0±0,0a	0,1±0,3 aI	0,0±0,0 aI	0,4±0,5 bII	0,0±0,0 aI	0,0±0,1 aI
Zona 5 MTC	0,0	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,0 I	0,0±0,1 I
Zona 1 MM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zona 2 MM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zona 3 MM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zona 4 MM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zona 5 MM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Cuadro 4.** Número de mastocitos evidenciables con safranina-alcian blue por región histológica y grupo experimental. Valores seguidos de un mismo literal dentro de una misma fila no son diferentes ( $P < 0,05$ ).

En el cuadro 5 se presentan los coeficientes de correlaciones de Pearson, entre las variables estudiadas y todos los grupos experimentales. Las correlaciones significativas ( $P < 0,05$ ) se ven en color rojo, y las tendencias en color naranja.



General	Grupo	Edad	Animal	Pesos	mast A toluidina	MTC	GJ PAS	GVB PAS	GDB PAS	ELR PAS	supELR PAS	Neosc PAS	BipNE PAS	SupNE PAS	GJ AB	GVB AB	GDB AB	ELR AB	Sup ELR AB	NE Bip AB
Edad	-0.7254 p=0.000																			
Animal	.3755 p=0.029	-0.2323 p=0.186																		
Pesos	-0.6615 p=0.000	.9604 p=0.000	-0.2291 p=0.193																	
mast A toluidina	.9162 p=0.000	-0.5440 p=0.001	.3844 p=0.025	-0.5421 p=0.001																
MTC	.9176 p=0.000	-0.5478 p=0.001	.3834 p=0.025	-0.5467 p=0.001	.9987 p=0.000															
GJ PAS	.1407 p=0.428	.4283 p=0.012	.1084 p=0.542	.3966 p=0.020	.4459 p=0.008	.4444 p=0.008														
GVB PAS	.2457 p=0.161	.2679 p=0.125	.0771 p=0.665	.2964 p=0.089	.3830 p=0.025	.3848 p=0.025	.7769 p=0.000													
GDB PAS	.0893 p=0.615	.5262 p=0.001	.1120 p=0.528	.4953 p=0.003	.2085 p=0.237	.2085 p=0.237	.6110 p=0.000	.7209 p=0.000												
ELR PAS	.3084 p=0.076	.1452 p=0.413	.0812 p=0.648	.3353 p=0.053	.1605 p=0.364	.1564 p=0.377	.2745 p=0.116	.4455 p=0.008	.4246 p=0.012											
supELR PAS	-0.1434 p=0.419	.3968 p=0.020	-0.1042 p=0.558	.5183 p=0.002	-0.1850 p=0.295	-0.1856 p=0.293	.2386 p=0.174	.3405 p=0.049	.2551 p=0.145	.5333 p=0.001										
NEosc PAS	-0.4054 p=0.017	.3632 p=0.035	-0.1091 p=0.539	.2132 p=0.226	-0.2871 p=0.100	-0.2871 p=0.101	.0156 p=0.930	-0.1070 p=0.547	.1430 p=0.420	-0.3759 p=0.028	-0.1392 p=0.433									
BipNE PAS	-0.5941 p=0.000	.9181 p=0.000	-0.2128 p=0.227	.9576 p=0.000	-0.5136 p=0.002	-0.5169 p=0.002	.3619 p=0.035	.3158 p=0.069	.5415 p=0.001	.4176 p=0.014	.5405 p=0.001	.1488 p=0.401								
SupNE PAS	-0.5738 p=0.000	.4662 p=0.005	-0.2359 p=0.179	.5726 p=0.000	-0.6185 p=0.000	-0.6199 p=0.000	-0.0624 p=0.726	-0.1868 p=0.290	-0.2716 p=0.120	.2493 p=0.155	.6476 p=0.000	-0.0124 p=0.945	.5538 p=0.001							
GJ AB	.7848 p=0.000	-0.4910 p=0.003	.3503 p=0.042	-0.4940 p=0.003	.8102 p=0.000	.8150 p=0.000	.3639 p=0.034	.6156 p=0.000	.3668 p=0.033	.1816 p=0.304	-0.1232 p=0.488	-0.2296 p=0.191	-0.4287 p=0.011	-0.6907 p=0.000						
GVB AB	.6260 p=0.000	-0.1213 p=0.494	.2839 p=0.104	-0.1477 p=0.405	.6461 p=0.000	.6455 p=0.000	.2748 p=0.116	.2153 p=0.221	.5670 p=0.000	.2702 p=0.122	-0.0667 p=0.708	-0.0330 p=0.853	-0.1000 p=0.574	-0.5322 p=0.001	.4242 p=0.012					
GDB AB	-0.6394 p=0.000	.8392 p=0.000	-0.2520 p=0.151	.9140 p=0.000	-0.5846 p=0.000	-0.5901 p=0.000	.3082 p=0.076	.2460 p=0.161	.2723 p=0.119	.4285 p=0.011	.5617 p=0.001	.0966 p=0.587	.8937 p=0.000	.7388 p=0.000	-0.5300 p=0.001	-0.3671 p=0.033				
ELR AB	.8557 p=0.000	-0.3705 p=0.031	.3471 p=0.044	-0.3653 p=0.034	.8482 p=0.000	.8495 p=0.000	.3260 p=0.060	.3944 p=0.021	.4913 p=0.003	.3370 p=0.051	-0.0511 p=0.774	-0.2006 p=0.255	-0.2853 p=0.102	-0.6093 p=0.000	.7305 p=0.000	.8943 p=0.000	-0.4873 p=0.000			
Sup ELR AB	.3339 p=0.054	-0.3752 p=0.029	.2420 p=0.168	-0.1853 p=0.294	.1587 p=0.370	.1611 p=0.363	-0.1318 p=0.457	-0.0282 p=0.874	-0.3465 p=0.045	.4120 p=0.015	.2335 p=0.184	-0.5603 p=0.001	-0.1740 p=0.325	.3176 p=0.067	.1042 p=0.558	-0.1725 p=0.329	.0545 p=0.760	.0416 p=0.816		
BipNE AB	.6624 p=0.000	-0.3319 p=0.055	.3498 p=0.043	-0.3383 p=0.050	.6526 p=0.000	.6578 p=0.000	.3093 p=0.075	.6510 p=0.000	.5369 p=0.001	.2579 p=0.141	-0.0674 p=0.705	-0.1578 p=0.373	-0.2563 p=0.144	-0.6740 p=0.000	.9430 p=0.000	.4566 p=0.007	-0.4174 p=0.014	.7107 p=0.000	.0320 p=0.857	
SupNE AB	.7806 p=0.000	-0.7722 p=0.000	.2416 p=0.169	-0.7054 p=0.000	.6995 p=0.000	.7046 p=0.000	.0593 p=0.739	.1877 p=0.288	-0.2355 p=0.180	.1478 p=0.404	-0.2359 p=0.179	-0.3654 p=0.034	-0.6768 p=0.000	-0.4183 p=0.014	.6623 p=0.000	.1626 p=0.358	-0.5860 p=0.000	.4780 p=0.004	.3527 p=0.041	.5127 p=0.002

Cuadro 5. Coeficientes de correlaciones de Pearson para las distintas variables y el conjunto de grupos experimentales.

## **5. DISCUSIÓN**

### **Pesos Corporales**

El peso corporal al sacrificio (g) de cada grupo experimental fue diferente al de los demás grupos, por tratarse de animales de diferentes edades y estar por lo tanto en diferentes etapas del crecimiento. Es digno de señalar que hubo diferencia en los pesos corporales entre los grupos C y T (ambos de 100 días de edad), siendo los controles más pesados que los restringidos. Esto evidencia que el efecto del tratamiento experimental aplicado tuvo efectos importantes y duraderos sobre el peso corporal, que se prolongaron desde los 25 a los 100 días de edad: a dos meses y medio de terminado el tratamiento diferencial, aún persistían sus efectos sobre el peso corporal.

Los pesos corporales se correlacionaron con la mayor parte de las variables estudiadas. La correlación entre el peso corporal y muchas de estas variables, probablemente respondió a las diferencias en edad entre los grupos experimentales (ver Cuadro 5).

### **Glándulas acinares del tabique nasal: GJ, GVB y GDB**

#### **PAS POSITIVIDAD**

Con respecto a la PAS positividad de las GJ, el grupo 5 días fue menor que los demás grupos. El índice de PAS positividad de las GVB se comportó de manera similar al de las GJ. En las GDB los valores menores fueron a los 5 y 15 días, y los máximos a los 25 y 35 días, con los grupos C y T en valores intermedios, siendo el grupo T mayor que el C. Es posible que la programación por subnutrición incida sobre esta variable aumentando la secreción en las GDB y disminuyéndola en las GJ y GVB. Es de tener en cuenta que la funcionalidad es distinta en estos tipos de glándulas, y las GDB están ubicadas más lejos del VNO, por lo que no tendrían efectos tan importantes sobre la percepción feromonas por parte del VNO.

#### **AB POSITIVIDAD**

El índice de positividad de las GJ a la técnica de AB, fue máximo a los 25 días de edad, seguido por el grupo 35 días y luego el grupo 15 días, los valores menores fueron a los 5 días y 100 días de edad. Estos datos pueden ser interpretados como una evolución en la AB positividad de las GJ a lo largo de la vida del animal, con valores crecientes hasta la postpubertad (25 días de edad) y una progresiva disminución a lo largo de la vida adulta. La AB positividad en las GVB tiene una evolución similar, pero con un apogeo a los 35 y no a los 25 días de edad. Es interesante que, mientras que para las GJ no hubo diferencias en AB positividad entre los grupos C y T, e incluso en el grupo T no se detectó positividad en ningún adenómero evaluado, para las GVB los valores fueron menores en el grupo C que en el T. Las GDB mostraron AB positividad a los 100 días de edad únicamente, siendo esta mayor en el grupo C que en el T.

Nuestros resultados son diferentes a los obtenidos por Garrosa (1986), quien no

encontró positividad a la técnica de AB en ratas pre y postnatales. Roslinski (2000) encontró reacción positiva al AB en GJ en humanos pero no en *Microcebus murinus* (lémur ratón gris) ni en los roedores del género *Microtus*. Estas diferencias son difíciles de interpretar, y probablemente estén debidas a que ni Garrosa ni Roslinski describen a qué pH trabajaron el AB, por lo que los mucopolisacáridos detectados por estos autores no tienen por qué haber sido los mismos mucopolisacáridos ácidos que hemos detectado nosotros en la presente tesis.

## CORRELACIONES

Los índices de positividad a la técnica de PAS en los tres grupos de glándulas se correlacionaron positivamente entre sí, al considerar todos los grupos experimentales. Esto probablemente indica que existe un comportamiento general que es común a los tres tipos de glándulas, en cuanto a la intensidad de secreción de mucopolisacáridos neutros, en función de la edad y el peso de los animales.

En cuanto a los índices de positividad a la técnica AB, hubo correlación positiva entre las GJ y las GVB pero la correlación fue negativa entre GDB y GJ, así como entre GDB y GVB. Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurre con la positividad a la técnica de PAS, la positividad a la técnica de AB no presenta un comportamiento homogéneo entre los distintos compartimientos glandulares.

También puede ser digno de destacar que el índice de positividad de las GJ y de las GVB a las técnicas de PAS y de AB se correlacionaron positivamente, indicando que la secreción de mucopolisacáridos neutros y ácidos se comportan de manera similar en estos dos compartimientos glandulares. Es interesante que esto no ocurrió en las GDB, en las cuales los índices de positividad a las técnicas de PAS y de AB sólo tendieron a correlacionarse moderadamente (ver Cuadro 5).

Un dato relevante es que nuestros resultados son diferentes a los obtenidos por Garrosa (1986), quien no encontró positividad a la técnica de AB en ratas pre y postnatales. Lamentablemente, Garrosa no indica cuál variante de la técnica de AB fue utilizada, es decir, a qué pH se trabajó el AB, por lo que resulta difícil comparar directamente los datos entre Garrosa (1986) y esta tesis. Roslinski (2000) encontró reacción positiva al AB en GJ en humanos pero no en *Microcebus murinus* (lémur ratón gris) ni en los roedores del género *Microtus*. Es posible que estas diferencias se expliquen por la existencia de muchas variantes en la técnica de AB, cada una trabajada a un pH distinto, y por lo tanto evidenciando mucopolisacáridos ácidos de de distinto tipo, tal como surge de los antecedentes que presentáramos. Al no estar explicada cuál variante se utilizó por parte de Garrosa (1986) y Roslinski (2000), no es posible interpretar con total seguridad las diferencias obtenidas en los resultados.

## Epitelios del VNO: ELR, Bip NE y NE osc

### PAS POSITIVIDAD

Las células caliciformes del ELR fueron marcadamente positivas a la técnica de PAS. En todos los grupos, la positividad siempre fue menor en las células caliciformes del ELR que en las células caliciformes de la mucosa nasal. Esto

sugiere diferencias entre ambos tipos de células caliciformes, que son respaldadas por la evidente diferencia de tamaños (menores en el ELR) que también fuera observada entre células caliciformes en ambas ubicaciones. Al comparar los índices de positividad a la técnica de PAS entre grupos, los grupos que mostraron mayor positividad fueron el grupo C (100 días de edad) y el grupo de 35 días. Los índices menores fueron los de los grupos 5 y 15 días, así como el grupo T de 100 días de edad. Según lo que se pudo observar al realizar la evaluación, la positividad en esta variable está estrechamente vinculada a la proporción de células caliciformes en el epitelio, ya que sólo dicho tipo de células fue positiva. En resumen, encontramos que el índice de positividad al PAS en el ELR aumentó con la edad del grupo estudiado y, por otra parte, el grupo T tuvo valores similares al grupo de 5 días de edad, indicando un fuerte efecto del tratamiento experimental, inhibiendo la secreción de mucopolisacáridos neutros. Es interesante que, en todos los casos, los índices de positividad fueron menores en el grupo T que en el grupo C.

## AB POSITIVIDAD

Las células caliciformes del ELR fueron marcadamente positivas a la técnica de PAS, y bastante menos positivas a la técnica de AB. En todos los grupos, se observó positividad en las células caliciformes de la mucosa nasal y no se observó AB positividad en las células caliciformes del ELR. Los índices de positividad a la técnica de AB en el ELR aumentaron con la edad, pero sólo hasta los 35 días: a los 100 días de edad la positividad fue mínima en ambos grupos (control y tratamiento). Esto indica que la secreción de mucopolisacáridos ácidos decae en la vida adulta, si se lo compara con la intensidad que ocurre en las primeras etapas de la vida reproductiva (25 y 35 días de edad, animales postpuberales o adultos muy jóvenes), y muestra una evolución muy similar a la que ocurre con la AB positividad en las GJ y las GVB.

En las células bipolares del neuroepitelio, los índices de positividad a las técnicas de PAS y de AB tuvieron un comportamiento muy similar entre sí y a lo ocurrido en el ELR, lo que nuevamente indica niveles máximos de secreción en la postpubertad y la primera etapa de la vida adulta, con niveles menores tanto antes de la pubertad como ya entrada la adultez.

## CORRELACIONES

Los índices de positividad a las técnicas de PAS y de AB en ELR y Bip NE se correlacionaron positivamente, lo que indica que el contenido de mucopolisacáridos neutros y ácidos en las células caliciformes del ELR está correlacionado con el contenido de material PAS positivo (probablemente glucógeno) en las células bipolares: estas últimas son células del tejido nervioso, tanto quimiorreceptores, es decir, neuronas sensitivas, como probablemente también células gliales.

Roslinski (2000) observó que en el ELR de humanos había glándulas mucosas unicelulares con cilios (positivas tanto a la técnica de AB como a la de PAS). Sin embargo, no encontró estas células - similares a las de los epitelios de las vías respiratorias - en *Microcebus murinus* ni en *Microtus* spp. Nosotros las hemos encontrado en la rata. Hasta donde sabemos, este es el primer informe al respecto.



## Secreciones presentes en las superficies apicales de los epitelios del VNO: SupNE y SupELR

### PAS POSITIVIDAD

El índice de positividad a la técnica de PAS en la SupELR fue mayor en el grupo C que en los restantes grupos. Esto evidencia un efecto del tratamiento experimental sobre la secreción de mucopolisacáridos en el epitelio libre de receptores, y confirma la interpretación que hacemos de las diferencias en los índices de positividad a la técnica de PAS en el propio ELR, discutidos anteriormente. En cuanto a la SupNE, el índice de positividad con la técnica de PAS fue mayor en el grupo C que en el T, y no fue distinto que los grupos de 5, 15 y 35 días. Tenemos así otro ejemplo de inhibición de la secreción por efecto del tratamiento experimental.

### AB POSITIVIDAD

Con respecto a los índices de positividad a la técnica de AB en la SupELR, todos los grupos fueron iguales, excepto el Grupo T, que fue menor. Esto representa otro caso de inhibición de la secreción debida al tratamiento experimental. El índice de positividad al AB en la SupNE, mostró que el grupo más bajo fue el grupo T, lo que indica un efecto similar.

Es interesante que Roslinski y col., (2000) describieron positividad tanto al AB como al PAS en SupNE y SupELR, para *Microtus* y *Microcebus* y también en los seres humanos, donde las secreciones son más abundantes (Roslinski y col., 2000). Sin embargo, no hicieron un análisis semicuantitativo como el que se presenta en esta tesis, y simplemente hicieron una descripción cualitativa. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que hace un análisis semicuantitativo de las PAS y AB positivities en el VNO y sus glándulas anexas.

### CORRELACIONES

El estudio de los coeficientes de correlación en los índices de positividad de las superficies resulta más difícil de interpretar que en el caso de los epitelios vecinos, ya que los comportamientos son más heterogéneos. Las variables SupNE y SupELR representan el acúmulo de la secreción de las GJ que se vuelcan dentro del conducto del VNO, así como también, probablemente la secreción de las células caliciformes del ELR, por lo que resulta lógico que exista correlación positiva entre los índices de positividad de las secreciones que se encuentran en las superficies de los epitelios y el índice del ELR, así como la tendencia entre GJ y ELR con PAS, lo que implica que cuando aumenta el índice de positividad en una de las variables, aumenta (o tiende a aumentar) en la otra. Cuanto más positivos sean los índices de positividad dentro de las células secretoras de GJ y ELR, más positivas serán las secreciones que, producidas por estas glándulas, se encuentran en la superficie de los epitelios. Sin embargo, no siempre ocurrió así, probablemente variaciones locales en la distribución de las secreciones, incluso durante la manipulación del animal previo al muestreo (factores mecánicos y de gravedad sobre un fluido que está en una superficie libre, así como tal vez, las reacciones del animal previas a la captura y sacrificio) posiblemente expliquen estos comportamientos inconstantes en

los índices de positividad de las superficies epiteliales, cuando se los compara con lo discutido para los epitelios en sí.

## **Mastocitos**

Hemos evaluado la presencia de mastocitos en las distintas regiones de la mucosa nasal de la rata, a distintas edades y en adultos con o sin tratamiento experimental. El número de mastocitos que se observaron con la técnica de azul de toluidina (metacromáticos) fue muy similar al número de mastocitos que se observaron coloreados con safranina, los MTC (técnica de Safranina-Alcian blue, ver Cuadros 3 y 4). No se observaron mastocitos MM con la técnica de Safranina-Alcian blue, en ninguno de los grupos de experimentales. Dado que los mastocitos MM están vinculados a reacciones alérgicas (Nakao y col., 1985; Kraneveld, 1998), esto puede interpretarse probablemente como que los animales estudiados en este experimento no presentaron reacciones alérgicas, y por ello no detectamos mastocitos MM (estaban probablemente presentes, pero en número muy bajo).

No se observó presencia de mastocitos, en ninguno de los animales del grupo de 5 días, con ninguna de las 2 técnicas utilizadas. La presencia de mastocitos en animales neonatos ha sido demostrada en ratas (Marshall y col., 1990), corderos (Ramirez-Romero y col., 2000) y humanos (Thrap y col., 1988). Sin embargo, no los hemos encontrado en nuestras ratas neonatales. La única especulación que se nos ocurre es que la superficie total evaluada (que aumenta con la edad, y por lo tanto el tamaño del corte transversal de hocico) no haya sido lo suficientemente grande en ratas de 5 días para que aparezcan mastocitos. La mayor densidad de mastocitos se observó en los animales de 15, 25 y 35 días. A los 100 días de edad la cantidad de mastocitos observada fue menor que a las 3 edades antedichas. Esto último es coherente con la conocida característica de los animales puberales y adultos jóvenes de tener reacciones alérgicas más intensas que aquellos ya avanzados en su vida adulta (Ahlstedt y Håård, 1987). En los grupos experimentales en donde encontramos mastocitos, las zonas 1, 2 y 4 fueron las únicas que presentaron mastocitos. La zona 1, cercana al paladar, fue la que presentó mayor proporción de estas células. Únicamente en el grupo 35 días, encontramos mastocitos en la zona 4, este grupo, es el que presentó mayor cantidad de mastocitos en total (todas las zonas sumadas).

Esta es, por lo tanto, otra variable histológica que muestra sus mayores valores en la postpubertad y la etapa adulta inicial, para disminuir luego ya entrada la adultez. Por otra parte, nuevamente encontramos diferencia en la densidad de mastocitos entre los grupos 100 días C y 100 días T. Esto constituye otro caso de efecto del tratamiento experimental sobre la variable estudiada. En esta variable en particular, sugiere que la intensidad de las posibles reacciones alérgicas en la cavidad nasal es menor en los animales que sufrieron programación fetal por subnutrición durante su vida fetal y de lactancia.

Encontramos una tendencia a tener una correlación inversa entre el número de mastocitos (tanto con azul de toluidina como los MTC) y el índice de PAS positividad de las células oscuras del NE (NEosc). Además, hubo correlación inversa entre el número de mastocitos evidenciados con ambas técnicas y el índice de PAS positividad de las células bipolares del NE. Por el contrario, el número de mastocitos

evidenciados con ambas técnicas se correlacionó positivamente con el índice de AB positividad en las células bipolares del NE. Aunque la existencia de correlaciones significativas no implica relaciones causales entre las variables, es interesante que sí indica algún tipo de comportamiento similar (correlación positiva) u opuesto (correlación inversa). Esto sugiere algún tipo de cambio correlacionado entre la intensidad potencial de las reacciones alérgicas (número de mastocitos) y el glucógeno acumulado en las células del NE (PAS positividad). Los presentes resultados no permiten extraer ninguna conclusión definitiva, pero sí sugieren (junto con los antecedentes bibliográficos que vinculan número de mastocitos y actividad de distintas estructuras del sistema nervioso; Shanahan y col., 1985; Stead y col., 1990; Ottaway, 1991; Weinreich y col., 1992; Willard, 1992; Cohen y col., 1994; McKay y col., 1994; Susuki y col., 1999) futuras líneas de trabajo sobre los posibles vínculos entre densidad de mastocitos y actividad del VNO.

## **6. CONCLUSIONES**

- Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio que se hace en forma semicuantitativa estudiando la positividad a las técnicas de PAS y AB y la densidad de mastocitos en el VNO, la mucosa nasal y las glándulas exócrinas asociadas.
- Por lo que sabemos, este es también el primer informe sobre la presencia de células caliciformes en el ELR del VNO de la rata. Estas células fueron de menor tamaño y menor cantidad de secreción almacenada que las células caliciformes de la mucosa nasal, y fueron las únicas células positivas a las técnicas de PAS y AB.
- En términos generales, la secreción de MPSN (PASpositivad) y MPSA (ABpositividad) aumentó con la edad. En algunas variables, los valores máximos se encontraron en la vida adulta (100 días de edad) mientras que en la mayoría de las variables, los valores fueron máximos en la postpubertad o las primeras etapas de la vida adulta y disminuyeron a los 100 días de edad.
- La mayor parte de las variables fueron afectadas por el tratamiento experimental. Esto indica un efecto importante de programación fetal por subnutrición sobre la intensidad secretora del VNO y de la mucosa nasal, y sobre la densidad de mastocitos en la mucosa nasal y por lo tanto, sobre la intensidad de las reacciones alérgicas. Una menor secreción en animales programados por subnutrición podría indicar una menor capacidad para presentar información química al VNO.
- La correlación entre la densidad de mastocitos y los índices de PAS positividad en las células bipolares y oscuras del neuroepitelio del VNO sugieren que existe cierta correlación entre la densidad de mastocitos y la actividad del neuroepitelio del VNO.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. AHLSTEDT, S., HÅÅRD, J. (1987). Age-dependent bone marrow mast cell maturation in specific pathogen-free rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 84:359-362.
2. ARON, C. (1979). Mechanisms of control of the reproductive function by olfactory stimuli in female mammals. *Physiol. Rev.*, 59:229-284.
3. BEFUS, A.D., PEARCE, F.L., GAULDIE, J., HORSEWOOD, P., BIENENSTOCK, J. (1982). Mucosal mast cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. *J. Immunol.* 128: 2457-2480.
4. BRAUNSTAHL, G., OVERBEEK, S., FOKKENS, W., KLEINJAN, A., MCEUEN, A., WALLS, A., HOOGSTEDEN, H., and PRINS, J. (2001). Segmental Bronchoprovocation in Allergic Rhinitis Patients Affects Mast Cell and Basophil Numbers in Nasal and Bronchial Mucosa. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:858-865.
5. BOOS, A., MEYER, W., SCHWARZ, R., GRUNERT, E. (1996). Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 44:11-21.
6. BROWN, B.W. (1994). A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reprod. Nutr. Dév.* 34:89-114.
7. CASTRILLEJO, A., MORAÑA, J.A., BIELLI, A., GASTEL, M.T., MOLINA, J.R., FORSBERG, M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1995). Onset of spermatogenesis in Corriedale ram lambs under extensive rearing conditions in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 36:161-173.
8. COHEN, N., MOYNIHAN, J.A., ADER, R. (1994). Pavlovian conditioning of the immune system. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105:101-106.
9. COOPER, C., JAVAID, M.K., TYLOR, P., WALKER-BONE, K., DENNISON, E., ARDEN, N. 2002. The fetal origins of osteoporotic fracture. *Calcif. Tissue Int.* 70:391-394.
10. CURTIS, J.T., LIU, Y., WANG, Z. (2001). Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Res.* 901:167-74.
11. DELIGEORGIS, S.G., CHADIO, S., MENEGATOS, J. (1996). Pituitary responsiveness to GnRH in lambs undernourished during fetal life. *Anim. Reprod. Sci.* 43:113-121.
12. DESAI, M. AND HALES, C.N. (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol. Rev.* 72:329-348.

13. ECCLES, R. (1982). Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. *Physiol. Behav.* 28:1011-1015.
14. ENERBÄCK, L. (1981). The gut mucosal mast cell. *Monogr. Allergy* 17:222-232.
15. ENERBÄCK, L., PIPKORN, U., GRANERUS, G.. (1986). Intraepithelial Migration of Nasal Mucosal Mast Cells in Hay Fever. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 80: 44-51.
16. ENGELBREGT, M.J., HOUDIJK, M.E., POPP-SNIJDERS, C., DELEMARRE-VAN DE WAAL, H.A. (2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr Res.* 48:803-807.
17. FAWCETT D.W. (1995). Bloom Fawcett: Tratado de Histología. 12<sup>a</sup> ed. Madrid. Interamericana McGraw-Hill. 1044p.
18. GAAFAR, H., TANTAWY, A., HAMZA, M., SHAABAN, M. (1998). The effect of ammonia on olfactory epithelium and vomeronasal organ neuroepithelium of rabbits. A histological and histochemical study. *Journal for Otorhinol.*, 60:88-91.
19. GALLI, S.J., DVORAK, A.M., DVORAK, H.F. (1984). Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. *Prog. Allergy.* 34:1-141.
20. GALLI, S.J. (1993). New concept about the mast cells (Review). *N. Engl. J. Med.* 328:257-265.
21. GARCÍA DEL MORAL R, 1996. Laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid. Interamericana Mc Graw-Hill. 696p.
22. GARROSA, M., COCA, S., MORA, O.A. (1986). Histological development of the vomeronasal complex in the pre- and postnatal rat. *Acta Otolaryngol.* 102:291-301.
23. GENOVESE, P., NÚÑEZ, M.E., POMBO, C., BIELLI, A. (2010). Undernutrition During Foetal and Post-Natal Life Affects Testicular Structure and Reduces the Number of Sertoli Cells in the Adult Rat. *Reprod. Dom. Anim.* 45:233-236.
24. GETCHELL, M.L., KULKARNI, A.P. (1995). Identification of neutrophils in the nonsensory epithelium of the vomeronasal organ in virus-antibody-free rats. *Cell Tissue Res.* 280:139-51.
25. GUY-GRAND, D.M., LUFFAU, D.G., AND VASSALI, P. (1984). Gut mucosal mast cells: origin, traffic, and differentiation. *Exp Med.* 160:12-28.
26. IKAWATI, Z., HAYASHI, M., NOSE, M., AND MAEYAMA, K. (2000). The lack of compound 48/80-induced contraction on isolated trachea of mast cells

deficient Ws/Ws rats in vitro: the role of connective tissue mast cells. *Eur. J. Pharmacol.* 402:297-306.

27. IKAWATI, Z., NOSE, M. AND MAEYAMA, K. (2001). Do Mucosal Mast Cells Contribute to the Immediate Asthma Response?. *Jpn. J. Pharmacol.* 86:38-46.
28. JACOBSON, L. (1809). Description anatomique d'un organe observé dans les mammifères. *Ann. Mus. Hist. Nat.* 18:412-423.
29. JARRETT, E., MILLER, H. (1982). Production and activities of IgE in helminth infections. *Prog. Allergy.* 31:178-233.
30. KARACA, T., ARIKAN, S., KALENDER, H., YORUK, M. (2008). Distribution and Heterogeneity of Mast Cells in Female Reproductive Tract and Ovary on Different Days of the Oestrus Cycle in Angora Goats. *Reprod. Dom. Anim.* 43:451-456.
31. KATZ, S., MERZEL, J. (1977). Distribution of epithelia and glands of the nasal septum mucosa in the rat. *Acta Anat. (Basel).* 99:58-66.
32. KEVERNE, E.B. (1978). Olfaction and taste-dual systems for sensory processing. *TINS.* 8:32-35.
33. KEVERNE, E.B. (2004). Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiol. Behav.* 83:177-87.
34. KLEMM, W.R., SHERRY, C.J., SIS, R.F., SCHAKE, L.M., WAXMAN, A.B. (1984). Evidence of a role for the vomeronasal organ in social hierarchy in feedlot cattle. *Applied Anim. Behav. Sci.* 12:53-62.
35. KOLVER, E.S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc. Nutr. Soc.* 62:291-300.
36. KRAEHENBUHL, J.R., NEUTRA, M.R. (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72:853-879.
37. KRANEVELD, A.D., MUIS, T., KOSTER, A.S., NIJKAMP, F.P. (1998). Role of mucosal mast cells in early vascular permeability changes of intestinal DTH reaction in the rat. *Am. J. Physiol.* 274:G832-G839.
38. MARCONDES, F.K., BIANCHI, F.J. & TANNO, A.P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats : some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62:609-614.
39. MARSHALL, J.S., STEAD, R.H., MCSHARRY, C., NIELSEN, L., BIENENSTOCK, J. (1990). The role of mast cell degranulation products in mast cell hyperplasia. I. Mechanism of action of nerve growth factor. *J. Immunol.* 144:1886-1892.
40. MAXIMOW, A. (1906). Über die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Arch.*

41. MAYRHOFER, G. (1980). Thymus-dependent and thymus-independent subpopulations of intestinal intraepithelial lymphocytes. A granular subpopulation of probable bone marrow origin and relationship to mucosal mast cells. *Blood*. 55:532- 535.
42. MCKAY, D.M., BIENENSTOCK, J. (1994). The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol. Today*. 15:533-538.
43. MC PHERSON, G.A. (1993). Corrent trends in the study of potasium channel openers gen. *Pharmacol*. 24:275-281.
44. MEEK, L.R., LEE, T.M., ROGERS, E.A., HERNANDEZ, R.G. (1994). Effect of vomeronasal organ removal on behavioral estrus and mating latency in female meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Biol Reprod*. 51:400-404.
45. MENDOZA, A. (1986). The mouse vomeronasal glands: a light and electron microscopical study. *Chem. Senses* 11:541-555.
46. MEREDITH, M., MARQUES D.M., O'CONNELL, R.O., STERN, F.L. (1980). Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science* 207:1224–1226.
47. MEREDITH, M. (1991). Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *Steroid Biochem. Molec. Biol*. 39:601 - 614.
48. MEREDITH, M. (1994). Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiol. Behav*. 56:345–354.
49. NAKANO, T., SONODA, T., HAYASHI, C., YAMATODANI, A., KANAYAMA, Y., YAMAMURA, T., ASAI, H., YONEZAWA, T., KITAMURA, Y., AND GALLI, S.J. (1985). Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient *W/W<sup>v</sup>* mice. Evidence that Cultured Mast Cells Can Give Rise to Both Connective Tissue Type and Mucosal Mast Cells. *J. Exp. Med*. 162:1025-1043.
50. NOVIANA, D., KONO, F., NAGAKUI, Y., SHIMIZU, H., MAMBA, K., MAKIMURA, S., HORII, Y. (2001). Distribution and enzyme histochemical characterisation of mast cells in cats. *Histochem. J*. 33:597-603.
51. NOVOTNY, M.V. (2003). Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents. *Biochem. Soc. Trans*. 31:117–122.
52. OIKAWA, T., SHIMAMURA, K., SAITO, T.R., TANIGUCHI, K. (1994). Fine structure of the vomeronasal organ in the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Jikken Dobutsu*. 43:487-497.



53. OKUDAIRA, H., SUZUKI, T., MORITA, Y., MIYAMOTO, T., HORIUCHI, Y. (1980). Age-dependent increase of histamine content in rat mast cells. *Exp. Gerontol.* 15:195-199.
54. OTTAWAY, C.F. (1991). Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 20:511-529.
55. PROPHET, E.D., MILLS, B., ARRIGTON, J.B., SOBÓN, L.H. (1995). *Métodos Histológicos*. Washington, D.C. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 280p.
56. RAMÍREZ-ROMERO, R., GALLUP, J.M., SONEA, I.M., AND ACKERMANN, M.R. (2000). Dihydrocapsaicin treatment depletes peptidergic nerve fibers of substance P and alters mast cell density in the respiratory tract of neonatal sheep. *Reg. Pept.* 91:97-106.
57. RHIND, S.M., RAE, M.T., BROOKS, A.N. (2001). Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction.* 122:205-214.
58. ROGERS, K.S. (1996). Mast Cells Tumor: dilemmas of diagnosis and treatment. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 26:87-102.
59. ROSLINSKI, D.L., BHATNAGAR, K.P., BURROWS, A.M., SMITH, T.D. (2000). Comparative morphology and histochemistry of glands associated with the vomeronasal organ in humans, mouse lemurs, and voles. *Anat. Rec.* 260:92-101.
60. RUITENBERG, E.J., ELGERSMA, A. (1976). Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature (Lond.)*. 264:258- 260.
61. SALAZAR, I., SÁNCHEZ QUINTEIRO, P., CIFUENTES, J.M. (1995). Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: Mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Ann. Anat.* 177:475–481.
62. SALAZAR, I., SANCHEZ QUINTEIRO, P., CIFUENTES, J.M. (1997). The soft-tissue components of the vomeronasal organ in pigs, cows, and horses. *Anat. Histol. Embryol.* 26:179-186.
63. SALAZAR, I., SANCHEZ QUINTEIRO, P. (1998). Supporting tissue and vasculature of the mammalian vomeronasal organ: The Rat as a Model. *Micros. Res. Tech.* 41:492–505.
64. SHANAHAN, F.J., DENBURG, A., FOX, J., BIENENSTOCK, J., BEFUS, D. (1985). Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J. Immunol.* 135:1331-1337 .
65. SPICER, S. S. (1960). A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* 8:18-35.

66. STEAD, R.H., BIENENSTOCK J. (1990). Cellular interactions between the immune and peripheral nervous systems: a normal role for mast cells?. En: Burger M. M., Sordat B., and Zinkernagel, R. M. (editors). Cell to Cell Interaction: a Karger symposium, Basel. 170–187.
67. SUZUKI, R., FURUNO, T., MCKAY, D.M., WOLVERS, D., TESHIMA, R., NAKANISHI, M., AND BIENENSTOCK, J. (1999). Direct Neurite-Mast Cell Communication In Vitro Occurs Via the Neuropeptide Substance P1. *J. Immuno.* 163:2410-2415.
68. TANIGUCHI, K., ARAI, T., OGAWA, K. (1993). Fine Estructure of Septal Olfactory Organ of Mase and its Associated Gland in the Golden Hamster. *J. Vet. Med. Sci.* 55:107-116.
69. TANIGUCHI, K., TANIGUCHI, K. (2008). Embryonic and postnatal differentiation of olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Syrian hamster. *J. Vet. Med. Sci.* 70:57-64.
70. TANIGUCHI, K., TOSHIMA, Y., SAITO, T.R., TANIGUCHI, K. (1996). Development of the Bowman's and Jacobson's glands in the Japanese reddish frog, *Rana japonica*. *J. Vet. Med. Sci.* 58:17-22.
71. THARP, M.D., GLASS M.J., SEELIG L.L. (1988). Ultrastructural morphometric analysis of human mast cells in normal skin and pathological cutaneous lesions. *J. Cut. Pathol.* 15:78-83.
72. TIZARD, I.R. (1996). *Inmunología Veterinaria*. 5ª ed. Mexico. Interamericana McGraw Hill. 567p.
73. UNGERFELD, R., RAMOS, M., MÖLLER, R. (2006). Role of the vomeronasal organ on ram's courtship and mating behaviour, and on mate choice among oestrous ewes. *Appl. Animal Behav. Sci.* 99:248-252.
74. VACCAREZZA, O., SPICH, L., TRAMEZZANI, J. (1981). The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.* 132:167-185.
75. VINKE, J.G., KLEINJAN, A., SEVERIJNEN, L.W., HOEVE, L.J., FOKKENS, W.J. (1999). Differences in nasal cellular infiltrates between allergic children and age-matched controls. *Eur. Respir. J.* 13:797-803.
76. WEINREICH, D., UNDEM, B.J., LEAL-CARDOSO, J.H. (1992). Functional effects of mast cell activation in sympathetic ganglia. *Ann NY Acad. Sci.* 664: 293-308.
77. WILLARD, A.L. (1992). Excitatory and neurotoxic actions of platelet-activating factor on rat myenteric neurons in cell culture. *Ann NY Acad. Sci.* 664: 284-292.

78. WYSOCKI, C.J., BEAUCHAMP, G.K., REIDINGER, R.F., WELLINGTON, J.L. (1985). Access of large and non-volatile molecules to the vomeronasal organ of mammals during social and feeding behaviors. *J. Chem. Ecol.* 11: 1147–1159.