

UCH-FC  
DOC-BMCN  
F 363  
C. 1

**ONTOGENIA DE LAS VÍAS VOMERONASALES V1R Y V2R: EL CASO  
DEL ROEDOR SOCIAL *OCTODON DEGUS***



**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE EN CUMPLIMIENTO PARCIAL  
DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y  
NEUROCIENCIAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**POR**

**PEDRO FRANCISCO FERNÁNDEZ ABURTO**



**2016**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. JORGE MPODOZIS  
CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. JUAN CARLOS LETELIER**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

**Se informa a la escuela de postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de doctorado presentada por el candidato**

**PEDRO FRANCISCO FERNÁNDEZ ABURTO**

**Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de defensa de tesis rendido el 29 de diciembre de 2016**

**Director de tesis:**

**Dr. Jorge Mpodozis**



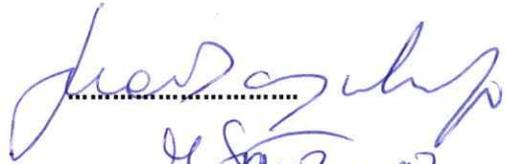
**Co-director de tesis:**

**Dr. Juan Carlos Letelier**

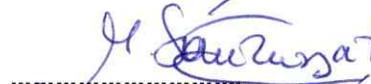


**Comisión de Evaluación de Tesis**

**Dr. Juan Bacigalupo**



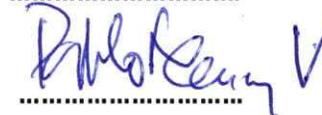
**Dra. Magdalena Sanhueza**

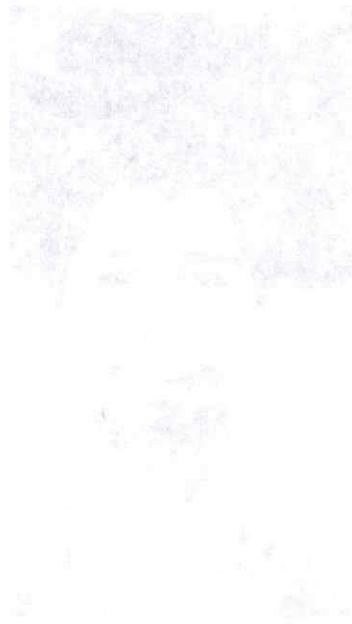


**Dr. Pedro Maldonado**



**Dr. Pablo Henny**





Dedicado a mi familia, mi eterno apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar estas primeras líneas al inmenso apoyo recibido por mis padres durante todo este proceso. Estoy más que seguro que sin su cariño y constante aliento éste camino hubiese sido infinitamente más complejo. A la vez agradezco a mi hermano, por estar siempre presente e inculcarme el cariño por las ciencias.

A mis tutores, por sus innumerables consejos. En particular quisiera agradecer a Jorge, en quien siempre encontré la mejor disposición y apoyo. En esta tesis intenté representar, en gran medida, las innumerables conversaciones y discusiones sostenidas con él, las que siempre estuvieron colmadas de buenas ideas y proyecciones. Un agradecimiento especial a Rodrigo Suárez, ya que bajo su tutela pude dar mis primeros pasos en el mundo del olfato.

A Karina Buldrini y Tatiana Guarnieri, con quienes realicé los primeros experimentos de esta tesis. En especial agradezco a Scarlett Delgado, quien ha trabajado conmigo durante estos años, pudiendo realizar en paralelo una tesis de pregrado relacionada a este tema.

Al Laboratorio de Neurobiología del Conocer, mejor conocido como “El Rayo”. Tuve la fortuna de formarme como científico en este simpático lugar, en donde todos los temas que afloran se discuten con enorme entusiasmo. Agradezco a todos los amigos que hice en estos años de trabajo. En especial quisiera agradecer a Solano Henríquez, gran compañero y “destrabador” de problemas y a Elisa Sentis, quien siempre me ha brindado los mejores consejos.

A los laboratorios del Dr. Luis Ebensperger, Dr. Rodrigo Vásquez y Dr. Pablo Sabat, quienes nos apoyaron con el material necesario para la realización de esta tesis.

Por ultimo agradezco al programa BMCN por la formación entregada, a la comisión por su buena disposición durante este proceso y al financiamiento entregado vía la beca MECESUP.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT .....	xx
INTRODUCCIÓN	
1. El Sistema olfatorio en los mamíferos: El sistema vomeronasal (SVN).....	4
2. Desarrollo del SVN: Diversidad anatómica y el rol de la experiencia.....	9
3. Diversidad morfológica del SVN en la filogenia de los mamíferos.....	11
4. Especializaciones socio-ecológicas y su posible rol en la formación del BOA: el caso de los roedores caviomorfos.....	12
5. <i>Octodon degus</i> : Ecología y Conducta.....	15
6. Planteamiento del problema, desde un perspectiva del desarrollo filogenética.....	17
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20

## METODOLOGÍA

1.	Animales.....	21
2.	Histología.....	22
3.	Inmunohistoquímica.....	23
4.	Morfometría.....	25
5.	Análisis Estadístico.....	26

## RESULTADOS

1.	Desarrollo de las vías vomeronasales V1R y V2R: Curso ontogénico de la maduración anatómica del sistema vomeronasal de <i>O. degus</i> .....	28
1.1.	Maduración anatómica de órgano vomeronasal (OVN) en la ontogenia de <i>O. degus</i> .....	28
1.2.	Maduración anatómica de las zonas aBOA y pBOA en la ontogenia de <i>O. degus</i> .....	35
2.	Desarrollo de las vías vomeronasales V1R y V2R: Curso temporal de la Heterogeneidad morfométrica en <i>O. degus</i> .....	46
1.3.	Bulbo olfatorio accesorio anterior (aBOA) y posterior (pBOA).....	46
1.4.	Capa Glomerular del BOA anterior (aBOA) y posterior (pBOA).....	50

3. Análisis de los tipos celulares involucrados en la formación del BOA durante el desarrollo de <i>O. degus</i> .....	55
4. Análisis de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA entre individuos que se desarrollan en distintos contextos de crianza.....	59
5. Análisis de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA entre <i>O. degus</i> y una especie hermana con hábitos sociales contrastantes.....	63
DISCUSIÓN GENERAL.....	67
CONCLUSIONES FINALES.....	78
REFLEXIONES FINALES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	84

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general del SVN en los mamíferos.....	7
Figura 2. Organización de las vías vomeronasales V1R y V2R.....	8
Figura 3. Microfotografías del BOA de <i>O. degus</i> adultos.....	14
Figura 4. Microfotografías del OVN de <i>O. degus</i> en la etapa prenatal (E80).....	29
Figura 5. Microfotografías del OVN de <i>O. degus</i> durante el desarrollo postnatal.....	29
Figura 6. Microfotografías del OVN de individuos P15 y P>180, inmuno- reaccionadas con anti-G <sub>α2</sub> .....	31
Figura 7. Microfotografías del OVN de individuos E80, inmuno-reaccionadas con anti-OMP.....	32
Figura 8. Microfotografías del OVN de individuos en distintas etapas postnatales, inmuno-reaccionadas con anti-OMP.....	34
Figura 9. Microfotografías de secciones delgadas del OVN de individuos P>180, Inmuno-reaccionadas con anti-OMP.....	34
Figura 10. Microfotografías del BOA de <i>O. degus</i> de un individuo E80 teñidas con cresil -violeta.....	35
Figura 11. Microfotografías del BOA de individuos en distintas etapas del desarrollo, inmuno-reaccionadas con anti- G <sub>α2</sub> .....	36
Figura 12. Microfotografías del BOA de individuos de distintas etapas postnatales teñidas con cresil-violeta .....	39
Figura 13. Microfotografías del BOA de un individuo E80, inmuno- reaccionadas con anti- vGLUT2 y anti-OMP.....	41
Figura 14. Microfotografías del BOA de individuos en distintas etapas postnatales, inmunoreaccionadas con anti-vGLUT2.....	42

Figura 15. Microfotografías mostrando el BOA de un individuo P15, inmuno- reaccionada con anti- vGLUT2.....	42
Figura 16. Microfotografías mostrando el BOA de individuos en distintas etapas postnatales, inmunoreaccionadas con anti- OMP.....	44
Figura 17. Gráfica mostrando el volumen estandarizado de los subdominios del BOA en distintas etapas postnatales.....	48
Figura 18. . Gráfica mostrando la comparación de la heterogeneidad morfométrica del volumen de los subdominios del BOA en relación a la etapa adulta .....	48
Figura 19. Gráficas mostrando la comparación del aBOA y del pBOA en distintas etapas del desarrollo.....	49
Figura 20. Gráfica mostrando el volumen estandarizado de la capa glomerular asociada a los subdominios del BOA en distintas etapas postnatales.....	52
Figura 21. Gráfica mostrando la comparación de la heterogeneidad morfométrica de la CG asociada los subdominios del BOA en relación a la etapa adulta.....	52
Figura 22. Gráficas mostrando la comparación d la CG del aBOA y del pBOA en distintas etapas del desarrollo.....	53
Figura 23. Gráficas mostrando el volumen del OVN y el número de neuronas M/T asociados a los subdominios del BOA de <i>O. degus</i> adultos.....	55
Figura 24. Gráfica mostrando el volumen del OVN de un individuo P15.....	56
Figura 25. Gráficas del volumen del BOA y de la CG de los los subdominios del BOA de <i>O. degus</i> adultos criados en cautiverio y en terreno.....	60

Figura 26. Gráficas mostrando el cociente volumétrico de los subdominios del BOA, tanto para el volumen del BOA como para la CG, en <i>O. degus</i> adultos criados en cautiverio y en terreno.....	61
Figura 27. Gráficas mostrando el cociente volumétrico de los subdominios del BOA, tanto para el volumen del BOA como para la CG, en <i>O. degus</i> adultos aislados socialmente y <i>O. degus</i> criados en terreno.....	62
Figura 28. Microfotografías del BOA de <i>O. lunatus</i> utilizando distintos tratamientos (cresil-violeta e inmunoreactividad con anti- $G_{ol2}$ y anti-OMP).....	64
Figura 29. Gráficas mostrando el volumen del BOA y de la CG de los los subdominios del BOA de <i>O. degus</i> adultos criados en terreno y de <i>O. lunatus</i> .....	66
Figura 30. Gráficas mostrando el cociente volumétrico de los subdominios del BOA, tanto para el volumen del BOA como para la CG, en <i>O. degus</i> adultos criados en terreno y de <i>O. lunatus</i> .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes promedio correspondientes a los subdominios aBOA y pBOA, medidos en distintas etapas del desarrollo postnatal de <i>O. degus</i> .....	47
Tabla 2. Volúmenes promedio estandarizados, correspondientes a los subdominios aBOA y pBOA, medidos en distintas etapas del desarrollo postnatal de <i>O. degus</i> .....	47
Tabla 3. Volúmenes promedio correspondientes a la CG de los subdominios aBOA y pBOA, medidos en distintas etapas del desarrollo postnatal de <i>O. degus</i> .....	51
Tabla 4. Volúmenes promedio estandarizados, correspondientes a la CG de los subdominios aBOA y pBOA, medidos en distintas etapas del desarrollo postnatal de <i>O. degus</i> .....	51
Tabla 5. Estimación volumétrica de las zonas apical y basal del OVN y del número de neuronas mitrales/tufted presentes en los subdominios aBOA y pBOA de <i>O. degus</i> adultos (P>180).....	56
Tabla 6. Estimación volumétrica de las zonas apical y basal del OVN de <i>O. degus</i> de P15.....	57
Tabla 7. Volúmenes correspondientes a los subdominios del BOA y a la CG de <i>O. degus</i> criados en cautiverio y capturados en el campo.....	59
Tabla 8. Volúmenes correspondientes a los subdominios del BOA y a la CG de <i>O. degus</i> aislados socialmente y capturados en el campo.....	62

Tabla 9. Volúmenes correspondientes a los subdominios del BOA y a la CG de <i>O. lunatus</i> y <i>O. degus</i> capturados en terreno. ....	65
---	----

## ABREVIATURAS

- VNS: Vomeronasal system
- VNO: Vomeronasal organ
- AOB: Accessory olfactory bulb
- aAOB: accessory olfactory bulb, anterior part
- pAOB: accessory olfactory bulb, posterior part
- GL: Glomerular layer
- SVN: Sistema vomeronasal
- OVN: Órgano vomeronasal
- BOA: Bulbo olfatorio accesorio
- aBOA: Bulbo olfatorio accesorio anterior
- pBOA: Bulbo olfatorio accesorio posterior
- CNV: Capa del nervio vomeronasal
- CG: Capa glomerular
- CPE: Capa plexiforme externa
- CM/T: capa de células mitrales/tufted
- CPI: Capa plexiforme interna
- CGr: Capa de células granulares
- V1R: Receptores vomeronasales tipo V1
- V2R: Receptores vomeronasales tipo V2
- Cau: Individuos criados en cautiverio
- Cap: Individuos capturados en terreno
- Aisl: Individuos criados en aislamiento social

## RESUMEN

En los mamíferos, el sistema olfatorio accesorio o vomeronasal (SVN) está involucrado en el desencadenamiento y en la modulación de las conductas sociales y sexuales, mediante la recepción de semioquímicos. El SVN está formado por dos poblaciones neuronales (V1R y V2R), cuyos axones proyectan de forma paralela desde el órgano sensorial vomeronasal al bulbo olfatorio accesorio (BOA), formando dos subdominios segregados anatómicamente: anterior (aBOA) y posterior (pBOA), respectivamente.

Actualmente existe un amplio conocimiento de los mecanismos moleculares y el curso temporal del desarrollo de las estructuras que forman parte del SVN. En particular, diversos trabajos han mostrado que tanto el OVN como el BOA poseen un carácter plástico en la ontogenia de los organismos, junto con destacar el rol de la experiencia quimiosensorial y del contexto de crianza de los individuos en la generación de los cambios observados.

Por otro lado, el SVN, siendo un sistema conservado dentro de la filogenia de los mamíferos, presenta a la vez una amplia diversidad anatómica en particular entre las vías V1R y V2R. De forma interesante, la diversidad observada se ha asociado a la existencia de diferencias en aspectos particulares del modo de vida que las especies realizan. Un ejemplo de ello es el caso de los roedores caviomorfos; en este grupo existen especies que poseen diferencias morfométricas entre los subdominios del BOA, pudiendo haber un sesgo con un signo distinto (aBOA > pBOA ó pBOA > aBOA). De forma interesante, el signo de la heterogeneidad morfométrica estaría asociado a aspectos contrastantes del

modo de vida entre cada una de las especies estudiadas (Ej hábitat semiárido v.s húmedo), relacionados a la predominancia de un tipo particular de comunicación semioquímica (estimulos volátiles v.s no volátiles). En estas especies, resulta interesante preguntarse sobre el desarrollo del SVN en el contexto de la experiencia: ¿En qué momento surge la heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA en la ontogenia? ¿Los parámetros asociados al hábito, propios de cada especie, ejercen algún efecto sobre el desarrollo de la relación morfométrica entre ambos subdominios?

Los antecedentes sugieren que la especialización del BOA podría surgir durante las etapas postnatales, período en que el desarrollo del SVN es susceptible a aspectos relacionados con la experiencia sensorial. Utilizando como modelo al roedor caviomorfo *Octodon degus*, en que el aBOA posee un mayor tamaño y un mayor número de glomérulos que el pBOA (aBOA > pBOA), se estudió el desarrollo de dicha especialización anatómica. Tanto el OVN como el BOA están presentes desde las etapas prenatales, sin embargo el BOA presentó una organización anatómica similar a la etapa adulta entre P15 y P30. Además, en P15, la proteína marcadora olfatoria (OMP) presentó una diferencia en la intensidad de marca siendo mayor en aBOA que en el pBOA; un resultado similar a lo observado en las etapas posteriores del desarrollo postnatal. Los resultados obtenidos sugieren que el SVN alcanzaría un alto grado de desarrollo anatómico entre las etapas P15 y P30.

De forma interesante, al caracterizar la morfometría de los subdominios del BOA se observó que el sesgo volumétrico hacia una mayor representación del aBOA aparece en las etapas postnatales, cercano al momento en que el BOA presenta un carácter maduro a nivel anatómico. El volumen total de los subdominios del BOA presentó un sesgo

volumétrico hacia un mayor tamaño del aBOA en P15, mientras que la capa glomerular (CG) del aBOA presentó dicho sesgo en P30. En las etapas postnatales tardías, la heterogeneidad morfométrica aumentó para ambas estructuras medidas (volumen total de los subdominios y sus respectivas CGs), alcanzando un valor máximo en P150, un mes antes de alcanzar la etapa adulta (P180).

Posteriormente se analizó el establecimiento de la heterogeneidad morfométrica, en relación a los tipos celulares que forman parte del BOA. En P15, las neuronas V1R están mayormente representadas en el OVN que las neuronas V2R; aquella diferencia se observó con un grado de magnitud similar en la etapa adulta. El resultado obtenido en P15 contrasta con lo observado en la CG en dicha etapa, la cual no presentó diferencias volumétricas entre ambos subdominios del BOA. Esto último sugiere que la formación de un sesgo hacia un mayor tamaño de la CG del aBOA no se sustentaría tan solo en la diferencia en el número de neuronas V1R y V2R que proyectan a ambos subdominios. Nosotros sugerimos que la formación de la heterogeneidad volumétrica de la CG podría corresponder principalmente a modificaciones locales en dicha capa (ej. cambios en el tamaño y forma de las arborizaciones sinápticas de las neuronas vomeronasales).

Junto con la caracterización de la heterogeneidad morfométrica del BOA en el desarrollo de *O. degus*, en esta tesis se analizó la relación existente entre el establecimiento de dicha heterogeneidad y el contexto de crianza de los individuos. Al comparar *O. degus* adultos criados en su hábitat natural con individuos criados en cautiverio, se observó que ambos grupos no presentaron diferencias en el grado de heterogeneidad asociado al volumen total de los subdominios del BOA. Sin embargo, al analizar la CG se observó que los animales criados en un hábitat natural presentaron un grado de heterogeneidad significativamente mayor que aquellos criados en cautiverio. De forma interesante,

obtuvimos un resultado similar al analizar animales criados en condiciones de aislamiento social.

Por último, se caracterizó la morfometría del BOA de *Octodon lunatus*, una especie hermana que posee un bajo grado de socialidad, en comparación a lo exhibido por *O. degus*. Interesantemente, se observó que en *O. lunatus* la CG no presenta una heterogeneidad volumétrica con un sesgo preferencial hacia a uno de los subdominios del BOA.

A partir de los resultados obtenidos en ambos análisis comparativos, nosotros sugerimos que las diferencias en el aspecto social exhibidas por los individuos durante la crianza podrían tener un efecto en el establecimiento de las diferencias observadas entre los subdominios del BOA, en particular en la CG.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que en *O. degus*, la heterogeneidad volumétrica observada en el BOA surge y se establece durante la etapa postnatal, en particular en la CG. La emergencia del sesgo volumétrico hacia el mayor tamaño de la CG del aBOA, en las etapas en que el SVN muestra un alto grado de madurez anatómico, sugiere que el establecimiento de la heterogeneidad volumétrica durante el desarrollo postnatal podría ser una consecuencia de la experiencia quimiosensorial y social que cada individuo experimenta durante su vivir.

## ABSTRACT

In mammals, the accessory olfactory or vomeronasal system (VNS) is involved in triggering and modulation of social/sexual behaviors, by receiving semiochemical substances like pheromones. The VNS is formed by two neuronal populations (V1R and V2R), whose axons project from the sensory vomeronasal organ (VNO) to the accessory olfactory bulb (AOB), forming two subdomains: anterior (aAOB) and posterior (pAOB), respectively.

Currently, there is a broad understanding of the molecular mechanisms and development of the VNS structures. In particular, several studies have shown that both the VNO and the AOB have a plastic character within development, along with highlighting the role of chemosensory experience and context of breeding in the generation of changes in development.

On the other hand the SVN, despite being a conserved system in the mammalian phylogeny, also exhibits a wide anatomical diversity, in particular among V1R and V2R pathways. Interestingly, the observed diversity has been associated with the existence of variations in certain aspects of each species habits and behaviors. An example of this situation is the morphometric heterogeneity within the AOB of caviomorph rodents; in this group there are species with remarkable morphometric differences between both AOB subdomains, presenting either an enlarged anterior portion of the AOB (aAOB) relative to the posterior portion (pAOB), or an inverse relation. Interestingly, the bias of the morphometric heterogeneity could be associated with contrasting aspects of lifestyle (eg. semiarid versus wet environment), and the prevalence of a particular type of semiochemical

communication (volatile vs non-volatile). In these species it is interesting to ask about the development of VNS in the context of the experience: ¿At what moment does the morphometric heterogeneity arises between the subdomains of AOB in ontogeny? ¿Do the parameters associated with habit, owing by each species, have any effect on the development of the morphometric relationship between both subdomains?

The previous work suggest that AOB specialization could arise in postnatal stages, in that period in which VNS development is susceptible to parameters related with sensory experience. Using the caviomorph rodent *Octodon degus* as a model, in which the aAOB is larger and possess more glomeruli of greater volume than the pBOA (aAOB>pAOB), we studied the development of this olfactory specialization. In *O. degus*, both the VNO and the AOB appear early in the development (at prenatal stages). However the AOB only presents an adult-like anatomical structure from P15-P30. Also, the olfactory marker protein (OMP), a mature-olfactory specific neuron marker, has an increased expression, from P15 onwards, in V1R neurons (relative to OMP expression levels in V2R neurons). These results suggest that in *O. degus*, the SVN structures reach an adult-like anatomical structure at P15-P30 stages.

Interestingly, the volumetric bias towards higher aAOB representation appears in postnatal stages, when the AOB already has an anatomically mature organization. At P15, the total volume of subdomains of AOB showed a bias towards a larger aAOB, while the glomerular layer of aAOB (GL-aAOB) presented a similar bias only at P30. Later in development, the morphometric heterogeneity progressively increases for both variables (volume of AOB subdomains and GL), reaching the highest values at P150.

Afterwards, the establishment of morphometric heterogeneity was analyzed in relation to the cell types that are part of the AOB. In P15, there is an increased volume of

the V1R layer, suggesting that there could be more V1R than V2R neurons in the VNO. This difference in V1R volume is also present in adulthood, with a similar ratio between volumes. The volumetric bias observed in the VNO at P15 contrasts with that observed in the GL at that stage, in which there are no volumetric differences between the two subdomains of the AOB. This suggests that the formation of a bias toward increased size GL-aBOA could originate by more factors than just differences in the number of V1R and V2R neurons that project to both subdomains. We suggest that volumetric-heterogeneity formation of the GL could correspond mainly to local modifications (such as variations in synaptic arborization size and shape) in GL.

Along with the anatomical and morphometric characterization of BOA heterogeneity in the development of *O. degus*, we assessed the possibility of a relation between the establishment of such heterogeneity and the breeding context of individuals. Comparing adult individuals raised in natural conditions with individuals bred in captivity, we found that both groups did not differ in the degree of heterogeneity associated with the total volume of subdomains of the AOB. However, when analyzing the volume of GL from both subdomains, we observed that the wild-raised individuals showed a higher degree of heterogeneity than those bred in captivity. Interestingly, we have obtained a similar outcome in individuals raised in a social-deprived condition.

Finally, AOB morphometry was characterized in *Octodon lunatus*, a less social sister-species of *O. degus*. Interestingly, in *O. lunatus* the GL has no volumetric heterogeneity, presenting no bias for any of the subdomains of AOB.

From the results obtained in both comparative analyses, we suggest that differences in early social behavior could have an effect on the establishment of the observed anatomical differences between subdomains of the AOB, in particular the GL.

In summary, the results obtained in this thesis show that in *O. degus*, the volumetric heterogeneity observed in the BOA appears and consolidate during postnatal stages, particularly the GL. The occurrence of volumetric bias towards a larger size of GL aAOB, at developmental stages in which the SVN shows a high degree of anatomical maturity, suggests that the emergence of the volumetric heterogeneity during the postnatal development could be a consequence of the social and sensorial experiences of each individual during ontogeny.

# INTRODUCCIÓN

Los sistemas sensoriales (ej. audición, visión, olfato, gusto, tacto) permiten a los organismos interactuar con su medio, y mediante su operar, participan de las diversas conductas que los organismos exhiben en dicho encuentro. Junto con la presencia de un amplio repertorio conductual, existe a la vez una variedad comparable de especializaciones sensoriales, lo que se ha traducido en la gran diversidad de arreglos anatómicos que los organismos exhiben dentro de un grupo.

Históricamente ha existido un enorme interés en conocer cómo los distintos aspectos relacionados con la morfología, fisiología y genética de los sistemas sensoriales se relacionan con las conductas particulares exhibidas por un organismo. Un aspecto menos estudiado es como los sistemas sensoriales surgen y se establecen con sus características diferenciales en los distintos linajes. Abordar esta última cuestión requiere estudiar en paralelo la historia de transformaciones de los sistemas sensoriales en la filogenia y el curso temporal del desarrollo de dichos sistemas en la ontogenia de los organismos. El estudio los sistemas sensoriales desde un punto de vista histórico ha dado lugar a dos observaciones fundamentales:

i) En un grupo filogenético existen rasgos estructurales asociados a los sistemas sensoriales que son altamente conservados entre las distintas especies (Ej. La organización celular de la retina, la regionalización de distintas poblaciones de células olfatorias en el epitelio olfatorio). Al mismo tiempo, existen otros rasgos estructurales que representan especializaciones especie-específicas. (Ej. El tamaño y la posición de los ojos, el número de células presentes en el epitelio olfatorio, etc.). Las particularidades que presentan los

sistemas sensoriales en las distintas especies parecen estar relacionadas, entre otros factores, al hábito o modo de vida propio de cada una de ellas. Al respecto, existen diversos reportes que muestran la relación existente entre las especializaciones de los sistemas sensoriales y los parámetros asociados al hábitat (ej. árido vs húmedo), al hábito conductual (ej. nocturno vs diurno en el caso de la visión, marcaje de territorio y cuidado parental en el caso del olfato) o a la organización social (ej. especies gregarias vs solitarias) de las especies que los presentan. El estudio comparado de los sistemas sensoriales nos permite conocer la historia evolutiva de las transformaciones ocurridas en estos sistemas dentro de un linaje y junto con ello, establecer la relación entre las particularidades de los sistemas sensoriales presentes en las distintas especies y los diversos modos de vida que cada una de ellas realiza.

ii) Durante el transcurso de la ontogenia de un individuo, las estructuras que conforman a los sistemas sensoriales sufren diversos cambios en su anatomía, fisiología y genética. Entre los factores que pueden influir en la generación de las modificaciones se encuentran la experiencia sensorial. Un ejemplo clásico es el desarrollo de la corteza visual en los mamíferos (Hubel et al., 1977). Existen diversos trabajos que muestran como surgen y se establecen las columnas o módulos característicos de la corteza visual de los mamíferos y en qué medida se ven afectados por aspectos relacionados a la experiencia visual. Mediante el estudio del desarrollo de los sistemas sensoriales podemos conocer el curso temporal de los cambios que sufren las estructuras que los componen, y junto con ello, evaluar como la experiencia sensorial ejerce un efecto sobre la formación de dichos sistemas.

En esta tesis nos propusimos abordar la problemática del origen y establecimiento de los sistemas sensoriales mediante la caracterización del sistema olfatorio accesorio o

vomeronasal (SVN), desde el punto de vista del desarrollo. En el caso de los mamíferos el SVN ofrece una excelente oportunidad para estudiar dicho fenómeno, ya que las especies que conforman dicho grupo exhiben una amplia diversidad de arreglos anatómicos. En particular, utilizamos como modelo de estudio a *Octodon degus*, un roedor que se caracteriza por presentar una especialización anatómica en su SVN, relacionada posiblemente con aspectos específicos de su modo de vida (Suárez & Mpodozis, 2009). El trabajo consistió en caracterizar el curso temporal del establecimiento de dicha especialización, revelando eventos claves en su desarrollo: i) el momento en el que surge y se establece la especialización del SVN, ii) como se relaciona la aparición de dicha especialización con la maduración anatómica del SVN y iii) como los tipos celulares que forman al SVN dan cuenta de dicha especialización. Por último se evaluó si la formación de la especialización del SVN se ve afectada por el contexto de crianza que los individuos experimentan durante el desarrollo. Para ello se realizaron tres aproximaciones comparativas: i) comparando entre *O. degus* criados en condiciones de cautiverio vs animales criados en su hábitat natural ii) entre *O. degus* criados en condiciones de aislamiento social vs animales criados en su hábitat natural ii) entre *O. degus* y *Octodon lunatus*, una especie hermana que se caracteriza por presentar hábitos sociales contrastantes.

## **1. El Sistema olfatorio en los mamíferos: El sistema vomeronasal (SVN).**

En los mamíferos, el olfato constituye una modalidad sensorial dominante, principalmente en aquellos grupos en que la comunicación quimiosensorial está altamente especializada (Brennan & Keverne, 2004). Existen diversas conductas que son coordinadas mediante el uso de estímulos olfatorios, y en torno a éstas, los mamíferos han desarrollado diferentes especializaciones relacionadas a la liberación, recepción y procesamiento de dichos estímulos.

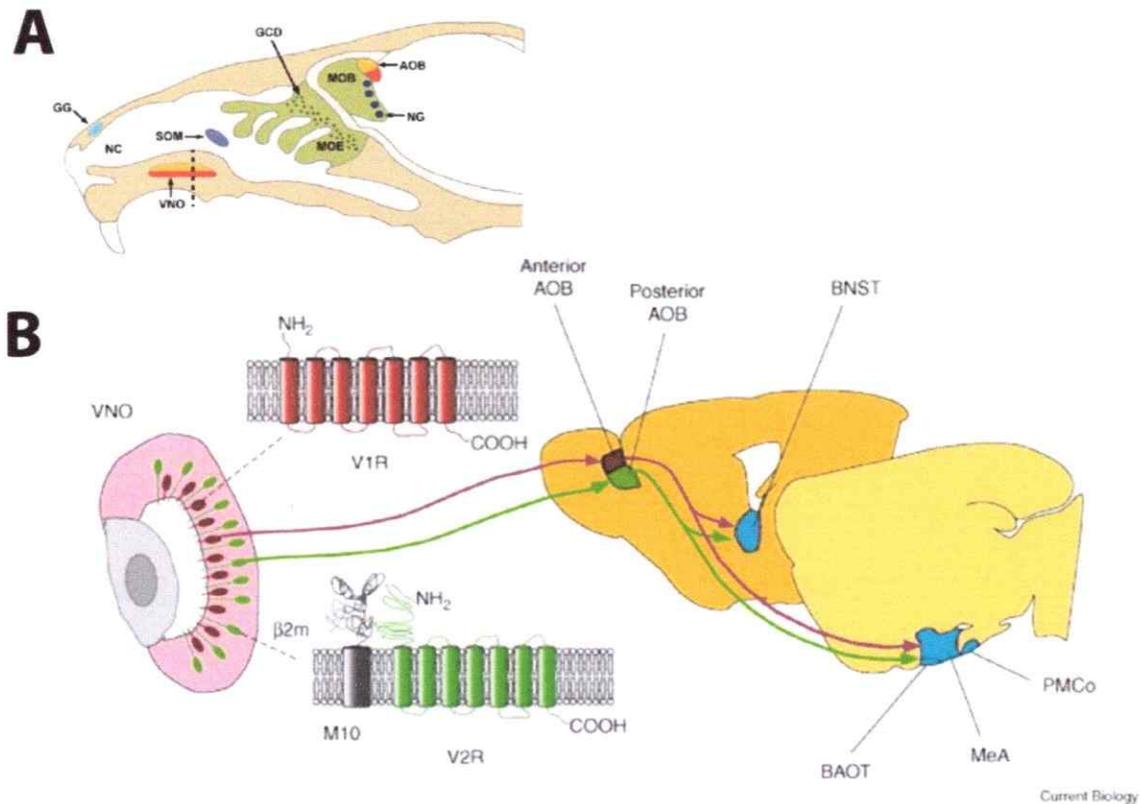
Entre los distintos subsistemas olfatorios existentes, el sistema vomeronasal (SVN) ha sido estrechamente relacionado a la modulación y al establecimiento de las conductas sociales y sexuales. Se observó por ejemplo que la ablación de parte del sistema reduce drásticamente las respuestas asociadas a la discriminación e identificación de los individuos conespecíficos (Keller et al., 2006, Chamero et al., 2007). El SVN recepciona de forma principal pero no exclusiva, las moléculas que son liberadas y recepcionadas por miembros de la misma especie o de especies relacionadas denominadas semioquímicos. Entre ellas se encuentran las feromonas, que en el caso de los mamíferos participan en la coordinación de las conductas sociales y sexuales, siendo esta regulación contingente a las características propias de cada especie y de su contexto social y ecológico.

El SVN consta de un órgano sensorial, el órgano vomeronasal (OVN) que es una estructura tubular pareada, ubicada bajo la cavidad nasal, y que conecta con ésta última mediante un ducto, el ducto vomeronasal (Fig. 1 y 2). El OVN alberga dos poblaciones neuronales que se distinguen, entre otros aspectos, en que expresan miembros de distintas superfamilias de receptores metabotrópicos: Los receptores V1R y V2R. Además, ambas familias de receptores se acoplan a proteínas G distintas: los receptores V1R están

acoplados a la proteína G $\alpha$ 2, y los receptores V2R a la proteína G $\alpha$ o (Wekesa & Anholt, 1999). En general, la unión de ligandos (semioquímicos) a ambos tipos de receptores activa una cascada de transducción asociada a la producción de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). En particular, el DAG juega un rol principal en la actividad de las neuronas vomeronasales ya que activa a los canales TRPC2, cuya apertura permite el ingreso de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> al interior de las células y su subsecuente depolarización (Lucas et al., 2003). Se ha reportado que la interrupción de la cascada de transducción sensorial, mediante ablación genética de los canales TRPC2 presentes en las neuronas vomeronasales, resulta en una reducción de la respuesta electrofisiológica a la orina y/o sus componentes volátiles y en la generación de severas anomalías conductuales.

Anatómicamente, los somas de las neuronas vomeronasales V1R y V2R se encuentran segregados en el OVN: las neuronas V1R se ubican en la zona apical, cercanas al lumen del OVN mientras que las neuronas V2R se ubican en la zona basal. Los axones de ambos tipos neuronales proyectan de forma paralela a la región dorso-caudal del bulbo olfatorio, el bulbo olfatorio accesorio (BOA, Fig. 1 y 2). En dicha zona, las proyecciones de las neuronas vomeronasales forman parte de dos subdominios segregados anatómicamente: anterior (aBOA, V1R) y posterior (pBOA, V2R). Las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales forman contactos sinápticos en estructuras denominadas glomérulos, tanto con neuronas locales (interneuronas yuxtglomerulares y granulares) como con neuronas de proyección secundarias (mitrales y tufted). Estas últimas proyectan sus axones a distintos núcleos presentes a nivel telencefálico, los que están relacionados principalmente a la modulación de tipo neuroendocrina (Mitsui et al., 2011; Martínez- Marcos, 2009).

Al caracterizar la funcionalidad de las vías vomeronasales V1R y V2R se observó que ambas presentan marcadas diferencias en relación al tipo de estímulo que reciben (Krieger et al., 1999). Las neuronas V1R son principalmente activadas por un amplio rango de moléculas volátiles (ej. moléculas lipofílicas) (Boschat et al., 2002) y las neuronas V2R por moléculas no-volátiles (ej. péptidos presentes en secreciones corporales y en la orina) (Leinders-Zufall et al., 2004; <sup>a,b</sup>Kimoto et al., 2005). Además, se ha mostrado que el aBOA (vía V1R) responde de forma principal a los semioquímicos liberados en el contexto reproductivo (interacciones macho-hembra), mientras que el pBOA (V2R) estaría relacionado principalmente a las interacciones entre individuos del mismo sexo, por ejemplo, en las conductas de agresión (Dudley & Moss, 1999; Inamura et al. 1999; Kumar et al. 1999; Matsuoka et al. 1999; Halem et al. 2001). Por último, se ha observado que las neuronas vomeronasales V1R y V2R responden de forma diferencial a distintos contextos etológicos: Una neurona del tipo V1R puede responder a estímulos asociados con distintos contextos (ej. conoespecíficos, predatorios), mientras que una neurona V2R sólo a una única categoría etológica (ej. conoespecíficos o predatorios) (Isogai et al., 2011).



Receptor	Proteína G	Subdominio BOA	Ligando	Contexto etológico
V1R	Gi2	aBOA	Volátiles	Reproductivo
V2R	Go	pBOA	No-volátiles	Agresión

Figura 1.- El SVN en los mamíferos. A) Esquema sagital de la nariz de una rata que muestra los distintos subsistemas olfatorios presentes en los mamíferos. Se destaca la presencia del OVN (VNO: sigla en inglés), presente bajo la cavidad nasal y del BOA (AOB: sigla en inglés) en la zona dorsal-caudal del bulbo olfatorio principal (MOB: sigla en inglés). B) En un esquema de un corte transversal del OVN, se muestra la distribución de las poblaciones de neuronas V1R (rojo) y V2R (verde), que proyectan de forma paralela al BOA, formando parte de los subdominios aBOA (anterior AOB) y pBOA (posterior AOB). Se muestran además la proyección de las neuronas mitrales/tufted de ambos subdominios aferentando distintos blancos a nivel telencefálico. Esquema adaptado de Brennan & Keverne, 2004. Tabla: Resumen de las particularidades anatómicas, moleculares, de recepción de ligandos y del contexto asociadas a las vías vomeronasales V1R y V2R. BNST, núcleo del lecho de la estria terminal; BAOT, núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio; MeA, amígdala medial; PMCo, núcleo amigdaloides posteromedial cortical.

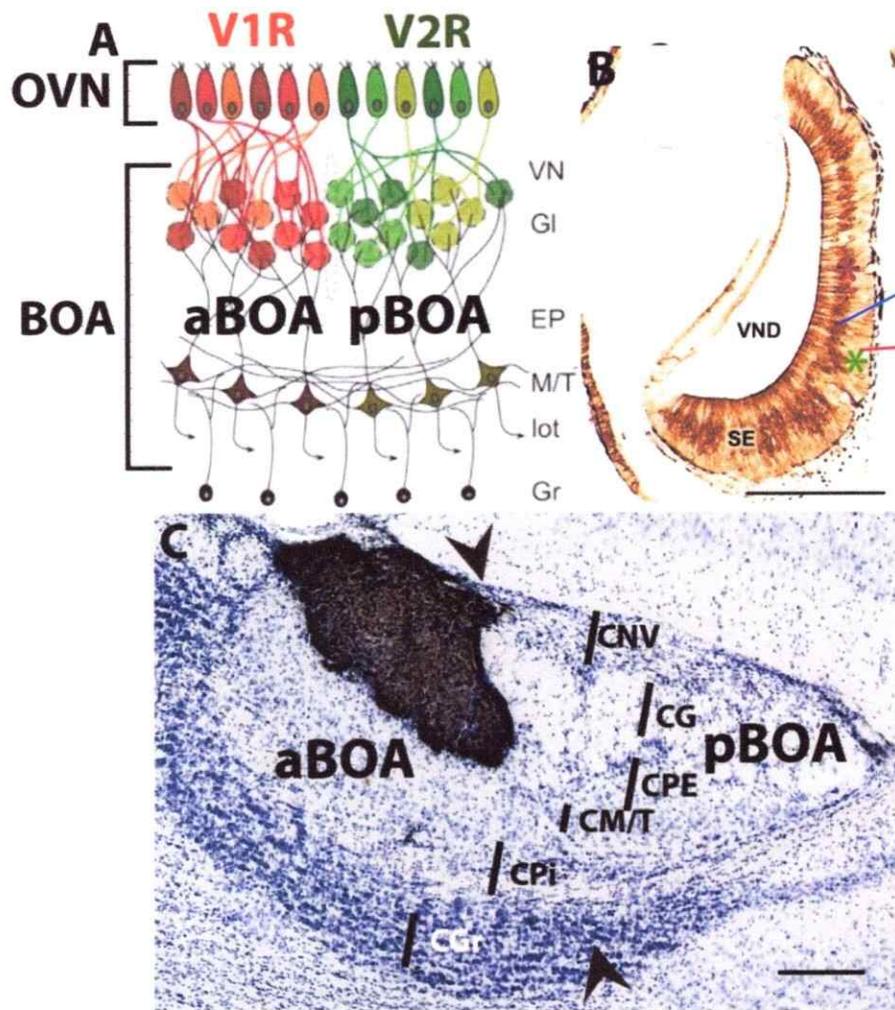


Figura 2. Organización de las vías vomeronasales V1R y V2R. A) Esquema que muestra las neuronas vomeronasales V1R (rojo) y V2R (verde), cuyos somas se ubican en el OVN. Las neuronas de ambas poblaciones proyectan de forma segregada al BOA, formando parte de los subdominios aBOA y pBOA respectivamente. En ambos subdominios, las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales realizan contactos sinápticos con las arborizaciones dendríticas de las neuronas de proyección secundaria (células mitrales/tufted), formando glomérulos (esferas) en la CG (GL) (modificado de Suárez et al., 2009b). B) Corte transversal del OVN de rata. Mediante la inmunoreactividad usando anti-LEA se observan ambas poblaciones de neuronas vomeronasales: V1R (apical, asterisco rojo) y V2R (basal, asterisco verde) (modificado de Salazar et al., 2009). C) Corte sagital del bulbo olfatorio de rata, mostrando el BOA. Mediante la inmunoreactividad con anti-Gi2 (vía V1R), que marca la CNV y la CG del aBOA de forma exclusiva, se puede observar la división entre ambos subdominios (cabezas de flecha). En el BOA se destacan las láminas que conforman el BOA, que están presentes en ambos subdominios del BOA. CNV (VN), capa del nervio vomeronasal; CG (GL), capa glomerular; CPE (EP), capa plexiforme externa; CM/T (M/T), capa de células mitrales/tufted, CPi, capa plexiforme interna; lot, tracto olfatorio lateral CGr (Gr), capa granular.

## **2. Desarrollo del SVN: Diversidad anatómica y el rol de la experiencia.**

Los estudios referentes al desarrollo del SVN han mostrado en distintas especies el curso temporal del establecimiento de las vías vomeronasales V1R y V2R y parte de los mecanismos moleculares implicados en este proceso. A partir de estos estudios, se ha observado que existen marcadas diferencias en el tiempo de desarrollo de las estructuras del SVN entre las especies precociales (que presentan un alto grado de madurez sensoriomotora y una menor dependencia del cuidado parental post-nacimiento) y altriciales (que presentan un bajo grado de madurez sensoriomotora y una mayor dependencia del cuidado parental post-nacimiento). En las especies precociales, como los cerdos y ovejas, tanto el OVN como el BOA están presentes durante la etapa prenatal. Junto con ello, ambas estructuras expresan marcadores moleculares asociados a la vía V1R (OMP, *Gai2* y la lectina LEA), observados en las etapas postnatales. Por último, el BOA posee una estructura laminar en las etapas prenatales, similar lo observado en la etapa adulta. Se ha sugerido entonces que en la especies precociales las estructuras del SVN alcanzarían un alto grado de maduración anatómica durante las etapas prenatales, pudiendo incluso ser un sistema funcional durante esta etapa (Salazar et al., 2003b y 2004). En el caso de las especies altriciales, como los ratones y las ratas, se ha reportado que el OVN está presente durante las etapas tempranas del desarrollo prenatal, y el BOA surge sólo durante las etapas finales, cercanas al nacimiento. Sin embargo, se ha observado que tanto el OVN como el BOA alcanzan un alto grado madurez anatómico y electrofisiológico sólo durante las etapas postnatales. (Salazar et al., 1998 y 2003a; Sugai et al., 2005). En las ratas, la madurez electrofisiológica fue determinada mediante la realización de registros de

potencial de campo evocado en rebanadas sagitales de bulbo olfatorio. Al registrar en las distintas capas del BOA en individuos de distintas edades, entre P1 y P18, se observó que sólo en P18 existía un registro con un curso temporal del potencial de campo similar al observado en la etapa adulta (P60) (Sugai et al., 2005).

Por otro lado, diversos trabajos realizados en animales altriciales utilizados como organismos modelo (ratones y ratas), han revelado que la experiencia quimiosensorial temprana es un factor relevante en la ontogenia del SVN. En particular, se observó que en ratones recién nacidos existe un aumento en la exuberancia y un retraso tiempo de coalescencia de las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales en los glomérulos del BOA, luego de realizar una estimulación prolongada con una feromona (Hovis et al., 2012). Esto muestra que la actividad neuronal desencadenada por la recepción de estímulos feromonales puede regular la conectividad funcional desde el OVN al BOA, en las etapas tempranas del desarrollo postnatal. Además, en otro trabajo se mostró que el número de receptores V1R ó V2R presentes en el OVN puede sufrir modificaciones durante las etapas postnatales tempranas del desarrollo de los ratones, cuando se les expone a la orina de un ratón de otra cepa (Broad & Keverne, 2011). Los autores sugieren la existencia de modificaciones epigenéticas en la expresión de los receptores vomeronasales, en relación a las modificaciones ocurridas en el contexto quimiosensorial.

Por último, se ha sugerido que el contexto en el que se desarrolla un individuo ejercería un efecto sobre la morfología del SVN. Se reportó que en el tupaya común (*Tupaia glis*: Scandentia) ocurre una reducción significativa del tamaño de parte de las láminas que forman el BOA en individuos adultos que nacieron y se criaron en condiciones de cautiverio, con respecto a individuos adultos capturados en terreno (Frahm et al., 1984).

Los autores sugieren que la interrupción de las interacciones sociales durante el desarrollo ontogénico temprano, en los animales criados en cautiverio, posiblemente tendría un efecto permanente en el desarrollo del BOA.

### **3. Diversidad morfológica del SVN en la filogenia de los mamíferos.**

En los mamíferos, el SVN está presente en la mayoría de las especies y presenta una alta diversidad en su morfología. En el caso de los mamíferos placentados se han reportado especies que presentan énfasis distintos entre los subdominios del BOA, lo que refleja que las vías vomeronasales cambian de forma independientemente. Las diferencias observadas comprenden i) un mayor tamaño relativo del BOA en los roedores caviomorfos sudamericanos (respecto de la regresión alométrica de los mamíferos) (Suárez & Mpodozis 2009, Suárez et al., 2011b) y un menor tamaño relativo presente en los ungulados, carnívoros y primates (Takigami et al., 2000 y 2004) ii) desaparición de una de las vías vomeronasales, principalmente la vía V2R, observado en ardillas, hyrax, primates del parvorden Platyrrhini y en gran parte de los laurasiatherios (Suárez et al., 2011b; Takigami et al., 2000 y 2004) y iii) la desaparición de ambas vías vomeronasales en cetáceos, primates del parvorden Catarrhini (incluido el ser humano), sirénidos, y en gran parte de los murciélagos (Mann, 1961; Meisami & Bhatnagar 1998; Ngweyna et al., 2011; Zhao et al., 2011).

#### 4. Especializaciones socio-ecológicas y su posible rol en la formación del BOA: el caso de los roedores caviomorfos.

Recientemente, se reportaron dentro del grupo de los roedores caviomorfos especies que poseen diferencias morfométricas entre los subdominios aBOA y pBOA. Estas diferencias involucran tanto el volumen de los subdominios como el número y el tamaño de glomérulos presentes en cada uno de ellos (Suárez & Mpodozis, 2009a; Suárez et al., 2011a). En particular en el roedor caviomorfo *Octodon degus*, el aBOA presenta un volumen mayor y posee glomérulos más grandes y numerosos que el pBOA (aBOA > pBOA) (Fig. 3 A→D). En otra especie, el Capibara (*Hydrochaerus hydrochaeris*), se observó una heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA con un signo distinto: el pBOA presenta un volumen mayor y posee más glomérulos que el aBOA (pBOA > aBOA) (Fig. 3 E→H).

Se ha sugerido que en *O. degus*, la mayor representación anatómica del aBOA estaría asociada con un mayor uso de la vía V1R (Suárez y Mpodozis, 2009). Por el contrario en el capibara, la mayor representación anatómica del pBOA estaría asociada con un mayor uso de la vía V2R (Suárez et al., 2011a). Dicha propuesta surge a partir de comparar ambas especies, las cuales exhiben modos de vida contrastantes en relación al uso de semioquímicos: *O. degus* vive preferentemente en ambientes semiáridos y presenta un repertorio conductual asociado al uso preferencial de estímulos volátiles (ej. realización de baños de tierra, ver sección siguiente), los que son recepcionados por las neuronas V1R. El capibara, por el contrario, vive preferentemente en ambientes húmedos, y exhibe un repertorio conductual asociado al uso preferente de estímulos no-volátiles (ej. marcaje

mediante secreciones oleosas, modo de vida semiacuático), lo que son recepcionados por las neuronas V2R.

La propuesta mencionada anteriormente surge a partir de observaciones realizadas exclusivamente en individuos adultos. Por el contrario, se desconocen los aspectos relacionados al origen y al establecimiento de la heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA en la ontogenia de las especies estudiadas. A partir de los antecedentes expuestos surgen las siguientes preguntas:

1. ¿En que momento surge la heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA en la ontogenia?

2. ¿Los parámetros asociados al modo de vida ejercen algún efecto sobre el desarrollo de la relación morfométrica de los subdominios del BOA?

Para poder dar respuesta a estas interrogantes, en esta tesis se realizó un estudio del desarrollo del SVN en *O. degus*, con un énfasis en la formación del BOA. Como veremos a continuación, esta especie posee un variado repertorio conductual en relación a la comunicación feromonal, siendo un interesante modelo para estudiar el desarrollo de la heterogeneidad morfométrica presente en el BOA.



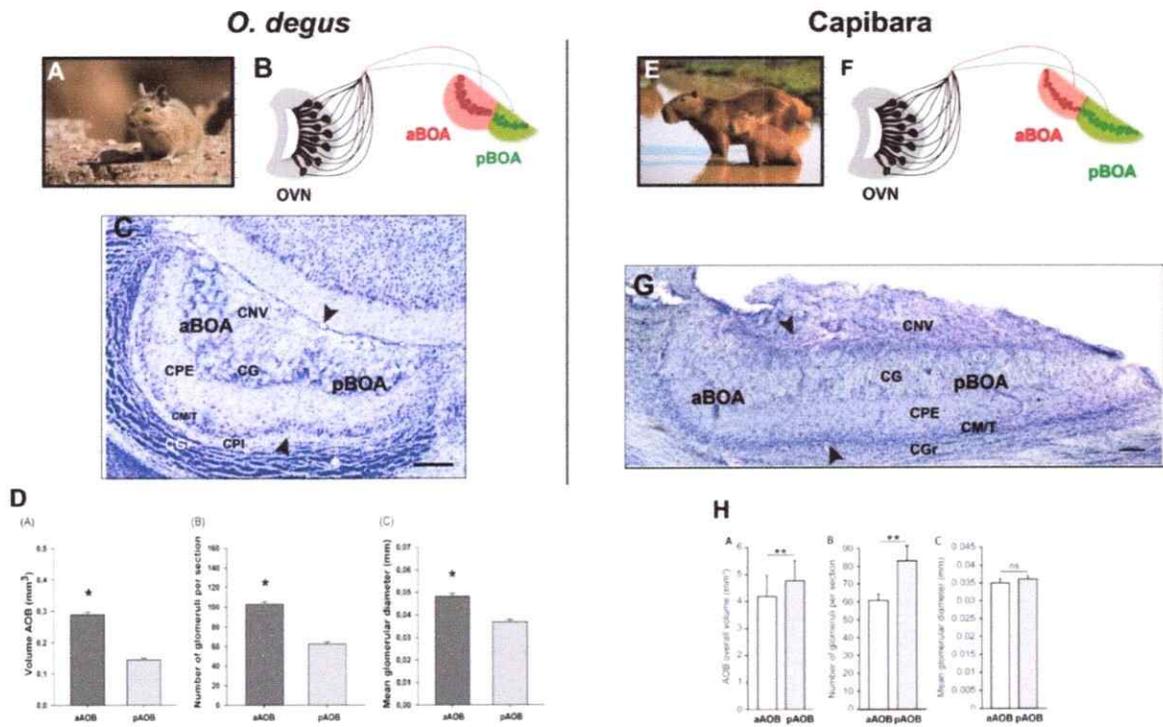


Figura 3. Heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA presente en los roedores caviomorfos. A) *O. degus* en su hábitat natural. B) Esquema que muestra parte del SVN de *O. degus*. Se destacan la diferencia en el tamaño de los subdominios y en el número de glomérulos presente en cada uno de ellos, siendo mayor en el aBOA que en el pBOA. C) Fotomicrografía de una sección sagital del BOA del *O. degus*. Se observan las distintas capas que lo componen y una hendidura que divide los subdominios aBOA y pBOA (cabezas de flecha). D) Los subdominios del BOA en *O. degus* son morfométricamente distintos: (A) El aBOA posee el doble de volumen del pBOA. Los glomérulos del aBOA son más numerosos (B) y de mayor tamaño (C) que los del pBOA. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0,000001$  (Modificado de Suárez & Mpodozis, 2009). E) Capibara en su hábitat natural. F) Esquema que muestra parte del SVN del Capibara. Se destacan la diferencia en el tamaño de los subdominios y en el número de glomérulos presente en cada uno de ellos, siendo el pBOA mayor que el aBOA. G) Fotomicrografía de una sección sagital del BOA del Capibara. Se observan las distintas capas que lo componen y la hendidura que divide ambos subdominios (cabezas de flecha). H) Los subdominios del BOA en el Capibara son morfométricamente distintos, pero con un signo distinto al observado en *O. degus*. (A) El pBOA posee un mayor volumen que el aBOA. Los glomérulos del pBOA son más numerosos (B) que los del aBOA. No existen diferencias en el tamaño de los glomérulos entre ambos subdominios (C). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. \*\*  $p < 0,03$ . <sup>ns</sup>, diferencia no significativa. Modificado de Suárez & Mpodozis, 2009a. CNV, capa del nervio vomeronasal; CG, capa glomerular; CPE, capa plexiforme externa; CM/T, capa de células mitrales/tufted; CPI, tracto olfatorio lateral; CGr, Capa granular. Barra: 500  $\mu$ m (A); 200  $\mu$ m (B y C). Modificado de Suárez et al., 2011a.

## 5. *Octodon degus*: Ecología y conducta.

Dentro del grupo de los roedores caviomorfos se encuentran aquellos pertenecientes a la familia Octodontidae. Las especies que conforman dicho grupo se caracterizan por poseer una amplia diversidad de modos de vida (hábitos diurnos, nocturnos y crepusculares; subterráneos y de vida en la superficie; solitarios y gregarios) y habitar en ambientes con arreglos distintos (pastizales abiertos, bosques densos ó planicies saladas extremadamente áridas) (Mares & Ojeda 1981, Redford & Eisenberg 1992). Las características mencionadas anteriormente convierten a esta familia en un excelente grupo para abordar distintas problemáticas en el campo de la neuroanatomía comparada (Vega-Zuniga et al., 2013)

Uno de los miembros de la familia Octodontidae es *Octodon degus*, una especie que se caracteriza por vivir en ambientes semiáridos y mediterráneos y que se distribuye en las zonas norte y centro de Chile. *O. degus* es una especie diurna y altamente social, con grupos compuestos por un macho dominante y por un grupo de hembras (2-5 individuos), más la descendencia generada. Viven en madrigueras durante parte del día, aunque invierten gran parte del tiempo en la superficie, principalmente durante el forrajeo.

Los distintos grupos sociales tienden a cooperar de distintas maneras: construyen las madrigueras de forma grupal y además realizan llamadas de alarma ante la presencia de algún predador u otra amenaza. En relación al ciclo reproductivo, las hembras poseen un período de gestación de 90 días, naciendo entre 3-7 individuos durante Septiembre-Diciembre. El cuidado de las crías se realiza, al parecer en comunidad (hembras nodrizas, datos obtenidos en laboratorio). Las crías al nacer son precociales y permanecen junto a los padres durante el primer mes de vida, luego de lo cual ocurren eventos de dispersión, en

particular de los machos. La madurez sexual en ambos sexos se alcanza entre los 5 y 6 meses de vida.

En relación a la comunicación olfatoria, se ha propuesto que en *O. degus* existe un predominio del uso de estímulos volátiles. En particular, esto estaría asociado con el hecho de vivir en un hábitat semiárido durante gran parte del año y a la prevalencia de las conductas de marcaje de escena asociadas a la liberación de estímulos volátiles de largo alcance y corta duración. Un ejemplo es la conducta de frotar el cuerpo sobre un sustrato (baños de tierra) (Ebensperger, 2000; Ebensperger & Caiozzi, 2002, Soto-Gamboa, 2005). Aquella conducta se considera un mecanismo conservado mediante el cual se minimizaría el alza de las conductas agonistas, principalmente durante la época reproductiva.

**6. Planteamiento del problema, desde una perspectiva del desarrollo y de la filogenia.**

Los antecedentes mencionados anteriormente muestran que:

1. Las vías vomeronasales V1R y V2R cambian de forma independiente una de la otra en la filogenia de los mamíferos.

2. El SVN poseen un carácter plástico durante el desarrollo, siendo las vías vomeronasales sensibles a aspectos relacionados con la experiencia olfatoria y el contexto social/ecológico de los individuos.

3. Existe una estrecha relación entre la presencia de un sesgo morfométrico, asociado a un mayor tamaño de uno los subdominios del BOA (aBOA>pBOA viceversa) y los parámetros relacionados al modo de vida, propios de cada especie.

**A partir de estos antecedentes, nosotros sugerimos que la heterogeneidad del BOA (aBOA>pBOA o viceversa), presente en algunos mamíferos, podría surgir y establecerse durante el período en que el desarrollo del SVN es susceptible a aspectos relacionados con la experiencia sensorial en que las especies se desenvuelven durante su vivir**

Esta tesis tiene como propósito principal el caracterizar, desde un punto de vista neuroanatómico, el curso temporal del desarrollo de las vías vomeronasales V1R y V2R en el roedor *O. degus*. Para ello se estudiará el establecimiento de la madurez anatómica de las estructuras asociadas al SVN, junto con analizar el curso temporal de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA. Junto con ello, se analizarán los tipos

celulares asociados a cada uno de los subdominios del BOA y su relación con la formación de la heterogeneidad morfométrica.

Finalmente, se analizará la posible relación existente entre el contexto en que se desarrollan los individuos con la presencia de la especialización del BOA. En el caso de *O. degus*, nosotros hipotetizamos que el contexto social en el cual se desarrollan los individuos podría tener un impacto sobre el establecimiento de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA. Esto último surge al considerar que *O. degus* es una especie altamente social, siendo dicho contexto un aspecto fundamental de su vivir. Aquello nos invita a pensar que el amplio repertorio conductual asociado a las interacciones de tipo social que exhibe *O. degus* podría tener un efecto sobre la formación de su sensorialidad, pudiendo dar paso a la generación de especializaciones que surgen en relación al vivir en aquel contexto. Para abordar este problema, en esta tesis se realizaron tres aproximaciones comparativas: i) comparando *O. degus* criados en cautiverio con individuos criados en el hábitat natural (capturados), ii) comparando *O. degus* aislados socialmente (experimento preliminar) con individuos capturados y iii) comparando a *O. degus* con una especie hermana que presenta un hábito social contrastante.

# HIPÓTESIS

**1. En *Octodon degus*, la heterogeneidad morfométrica de los subdominios del bulbo olfatorio accesorio (BOA) surge y se establece durante el periodo postnatal, asociado a la maduración anatómica y a la organización de los tipos neuronales que lo componen.**

**2. La relación morfométrica de los subdominios del BOA es distinta entre individuos que se desarrollan en contextos de crianza contrastantes, en relación al ámbito social.**

## **Objetivo general**

- Caracterizar la anatomía y la morfometría de las estructuras que componen a las vías vomeronasales V1R y V2R de *O. degus*, en distintas etapas del desarrollo.

- Analizar la morfometría del BOA entre individuos que se desarrollan en contextos de crianza contrastantes.

### **Objetivos específicos.**

1. Analizar el curso ontogénico de la maduración anatómica del sistema vomeronasal de *O. degus*.
2. Analizar el curso temporal de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA de *O. degus*.
3. Analizar los tipos celulares asociados a la formación del BOA, en etapas claves del desarrollo de la heterogeneidad morfométrica en *O. degus*.
4. Realizar un análisis comparado entre *O. degus* que se desarrollan en contextos de crianza distintos.
5. Realizar un análisis comparado entre *O. degus* y una especie hermana con hábitos sociales contrastantes.

## METODOLOGÍA

### 1. Animales.

Durante el mes de Agosto, entre los años 2012 y 2013, un total de 7 hembras preñadas de *O. degus* fueron capturadas en poblaciones naturales presentes en Rinconada de Maipú, las que posteriormente fueron trasladadas al laboratorio. Los individuos fueron ubicados en cajas separadas de 50 de ancho x 60 largo x 40 alto, bajo condiciones artificiales de luz y oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Las camadas pertenecientes a dos de las hembras preñadas fueron utilizadas para los estudios realizados en la etapa prenatal (ver sección Histología). En el mes de Septiembre nacieron 5 camadas, con 4- 8 crías cada una, las que permanecieron junto a la madre durante el primer mes de vida. Posteriormente la madre fue retirada, permaneciendo las crías en grupos de hermanos consanguíneos. En la realización de esta tesis, se utilizaron muestras tanto del OVN como el bulbo olfatorio de individuos pertenecientes a distintas etapas del desarrollo: un estadio prenatal (E80, E: días postgestación) y seis estadios postnatales (P1, P15, P30, P60, P150 y P>180; P: días postnatal).

Junto con lo anterior, se obtuvieron muestras del bulbo olfatorio de animales previamente perfundidos, con un protocolo similar al utilizado en este trabajo (ver sección Histología): *O. degus* adultos, criados en terreno (individuos capturados en Rinconada de Maipú y en el parque nacional Fray Jorge) y *Octodon lunatus* adultos (individuos capturados en Los Molles).

Por último, se realizó un experimento de aislamiento social, en que 6 individuos fueron puestos de a pares en jaulas desde el primer mes de vida. Las jaulas fueron

dispuestas en habitaciones separadas, evitando con esto el contacto con olores provenientes de otros individuos. Las animales permanecieron en aquella condición hasta el sexto mes de vida (P180). Posteriormente fueron perfundidos y el bulbo olfatorio fue extraído para su posterior análisis.

## 2. Histología.

En el estudio de las etapas prenatales, se extrajeron los fetos de dos hembras preñadas, las cuales fueron previamente anestesiadas con una solución de ketamina/xilacina. Posteriormente, los fetos fueron extraídos y perfundidos con una solución de suero salino 0,9% y luego con paraformaldehído (PFA) 4%+ PBS 0,01M. La edad de las crías fue estimada mediante la observación de parámetros morfológicos (Rojas et al., 1982). Los cerebros y la nariz fueron puestos en una solución fijadora de PFA 4% en PBS 0,01M, por varios días. En el caso de individuos nacidos en las etapas postnatales, éstos fueron extraídos de las camadas en los tiempos evaluados y perfundidos de forma similar a lo descrito anteriormente. Posteriormente, los cerebros y la nariz fueron extraídos y puestos en PFA 4% en PBS 0,01M por varios días.

Los bulbos olfatorios fueron cortados en secciones parasagitales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótopo de congelación, ordenados en series y guardados en placas que contienen PBS 0,01M. El OVN fue extraído de la nariz de los individuos, embebido en gelatina de piel de porcino (Sigma ®) o en Parafina (Paraplast®) y cortado en secciones transversales de 30  $\mu\text{m}$  (inclusión en gelatina) y 10  $\mu\text{m}$  (inclusión en parafina) de grosor, para la realización de distintos protocolos de inmunohistoquímica y tinciones histológicas (Cresil violeta y Hematoxilina- Eosina). Las secciones embebidas en gelatina fueron

ordenadas en series y guardadas en placas que contienen PBS 0,01M. Las secciones embebidas en parafina fueron puestas en portaobjetos silanizados para su posterior uso.

### 3. Inmunohistoquímica.

Se utilizó una serie de secciones de OVN y de bulbo olfatorio por individuo para la realización de protocolos de inmunohistoquímica. Se utilizaron dos métodos de revelado: i) mediante el uso anticuerpos acoplados a la enzima peroxidasa y revelados con Diaminobenzidina (DAB, Inmunohistoquímica colorimétrica) y ii) anticuerpos acoplados a un fluoróforo (Inmunofluorescencia).

Las secciones que fueron obtenidas usando el micrótopo de congelación fueron lavadas con PBS 1X y posteriormente incubadas en buffer citrato de sodio (10mM, pH 6.0) a 80°C por 30 minutos. Las secciones que fueron embebidas en parafina fueron tratadas previamente con xilol y rehidratadas usando soluciones de etanol en distintos porcentajes (100%, 95%, 70%, 50 %, PBS 0,01M. Posteriormente, las secciones embebidas en parafina fueron incubadas en una solución de buffer citrato de sodio (10mM, pH 6.0) a 80°C por 30 minutos.

Las muestras tratadas para el revelado con Diaminobenzidina (DAB) fueron incubadas en agua oxigenada 3% + metanol 10% en PBS 0,01M (1X), lo que produce la inactivación de la enzima peroxidasa presente en el tejido. Luego fueron incubadas en una solución bloqueadora (Normal Horse Serum 5% en PBS 1X + tritón 0,3%) y posteriormente en una solución que contiene un anticuerpo primario por toda la noche, a 4°C. Los anticuerpos utilizados en las secciones del OVN fueron: anti-Goi2 mouse monoclonal 1:200 (Santa Cruz.Biotech) y anti-OMP mouse monoclonal 1:500 (Santa

Cruz Biotech). En las secciones de bulbo olfatorio fueron utilizados anti-G $\alpha_{i2}$  mouse monoclonal 1:200 (Santa Cruz Biotech), anti-OMP mouse monoclonal 1:500 (Santa Cruz Biotech) y anti-vGLUT-2 mouse monoclonal 1:1000 (NeuroMab). Posteriormente, se incubó con un anticuerpo secundario (anti-mouse biotinilado 1:500 (Vector)). Por último, las secciones fueron incubadas con una solución que contiene el complejo Avidina-Biotina (1:500), por 1 hora y revelados usando DAB 0,25 mg/mL y agua oxigenada 0,001%. Las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas finalmente con el medio de montaje Entellan® (Merck). Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio de campo claro, acoplado a una cámara y al software SPOT (Spot Advanced, Diagnostic Instrument, Inc.). Las secciones que fueron reveladas mediante inmunofluorescencia fueron incubadas en una solución bloqueadora (Normal Horse Serum 5% en PBS 1X + tritón 0,3%) y posteriormente con el anticuerpo primario anti-OMP mouse monoclonal 1:500 (Santa Cruz Biotech) por toda la noche, a 4 °C. Luego fueron tratadas por 2 horas con un anticuerpo secundario (anti-mouse que se encuentra acoplado al fluoróforo Rodamina (1:500, Invitrogen)) y finalmente incubados con DAPI por 5 minutos. Posteriormente, las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con el medio de montaje Fluosave™ Reagent (Merck).

Las imágenes fueron obtenidas mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia, acoplado a un spinning-disk (Olympus BX60) y mediante a una cámara Hamamatsu C10600, acoplada al programa Cells Sense®, para el procesamiento de imágenes.

#### 4. Morfometría.

Se estimó, mediante el método estereológico de Cavalieri, el volumen de las regiones apical (V1R) y basal (V2R) del epitelio sensorial del OVN en *O. degus* de P15 y P>180. Previamente, se realizó la inmunoreactividad en cortes de 30  $\mu\text{m}$  de grosor con el anticuerpo anti-G $\alpha_{i2}$ , que marca exclusivamente las neuronas de la región apical del OVN. Posteriormente, los cortes fueron contrateñidos con cresil-violeta y puestos bajo un microscopio de campo claro, el que posee una platina motorizada y una cámara MicroFire (Optometrics ®) acoplada. Utilizando el programa Stereoinvestigator 6.0, se realizó la medición de los volúmenes de las zonas apical y basal del OVN. Para la medición se utilizaron secciones de 30  $\mu\text{m}$  de grosor, abarcando toda la extensión rostro - caudal del OVN. Las secciones estaban separadas en intervalos de 120  $\mu\text{m}$ . Se utilizó una grilla de 30x30  $\mu\text{m}$  para el conteo. El coeficiente de error de Gundersen obtenido en todos los individuos medidos fue menor a 0,1.

Junto con lo anterior, se estimó mediante el método de Cavalieri, el volumen de los subdominios aBOA y pBOA en los cortes teñidos con cresil-violeta. Se consideró para la medición la capa del nervio vomeronasal (CNV), la capa glomerular (CG), la capa plexiforme externa (CPE) y la capa de células mitrales tufted (CM/T). Diferente a lo realizado por Suárez & Mpodozis (Suárez & Mpodozis, 2009) en este trabajo se cuantificó el BOA en toda su extensión en el eje medial-lateral. En secciones que fueron tratadas utilizando anti-vGLUT-2 y contrateñidas con cresil-violeta, se estimó el volumen que comprende solo a la capa glomerular (CG). Para ambas mediciones se utilizó una serie de cortes de 40  $\mu\text{m}$  de grosor, con un intervalo de 80  $\mu\text{m}$  entre los cortes medidos.

Se utilizó una grilla de 30x30  $\mu\text{m}$  para el conteo. El coeficiente de error de Gundersen en todos los casos fue menor a 0,1.

En individuos adultos de *O. degus*, se estimó el número de células mitrales/tufted de los subdominios aBOA y pBOA, en la zona en que se encuentran en mayor densidad (capa de células mitrales/tufted). Para ello, se utilizaron secciones sagitales del bulbo olfatorio, las que fueron previamente teñidas con cresil-violeta. Para la realización del conteo se utilizó el método estereológico del Fraccionador Óptico, usando una grilla de 100x100  $\mu\text{m}$  y un marco de conteo de 50x50  $\mu\text{m}$ . El coeficiente de error de Gundersen obtenido en todos los casos fue menor a 0,1.

#### 5. Análisis estadístico.

Para evaluar las diferencias entre los distintos grupos estudiados, se utilizó la estadística no paramétrica para el análisis de los datos, debido a que el bajo "n" muestral no permite que los datos satisfagan los supuestos de las pruebas paramétricas. Para comparar los datos obtenidos del aBOA y del pBOA en cada uno de los estadios del desarrollo de *O. degus* y en las distintas especies adultas estudiadas, se utilizó la prueba de Wilcoxon para muestras dependientes. Para saber si existen diferencias significativas entre en las etapas del desarrollo estudiadas se realizó en primer lugar la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente para saber cuáles grupos son los que difieren se utilizó la prueba de Mann-Whitney, ambas para muestras independientes. Para comparar los datos referidos al cociente volumétrico (pBOA/aBOA) entre *O. degus* criados en distintos contextos sociales y con *O. lunatus*, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes. Los datos fueron analizados utilizando el programa Statistica

6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). La obtención de un valor de  $p < 0,05$ , indicó la existencia de diferencias significativas para todas las pruebas estadísticas.

## RESULTADOS

### **1. Desarrollo de las vías vomeronasales V1R y V2R: Curso ontogénico de la maduración anatómica del sistema vomeronasal de *O. degus*.**

#### 1.1. Maduración anatómica de órgano vomeronasal (OVN) en la ontogenia de *O. degus*.

Durante el último tercio del período prenatal, el OVN está presente como una estructura separada del epitelio olfatorio principal (EOP). En E80, el OVN está representado como una estructura pareada con forma tubular, cerrada en su extremo caudal y ubicada bajo la cavidad nasal. En esta etapa el OVN se caracterizó por poseer i) un ducto vomeronasal abierto, que lo conecta con la cavidad nasal (Fig. 4 A) y ii) un epitelio sensorial (ES) grueso y un epitelio no sensorial (ENS) delgado (Fig. 4, B y C). Aquellos rasgos son similares a los observados en las etapas postnatales estudiadas (Fig. 5).

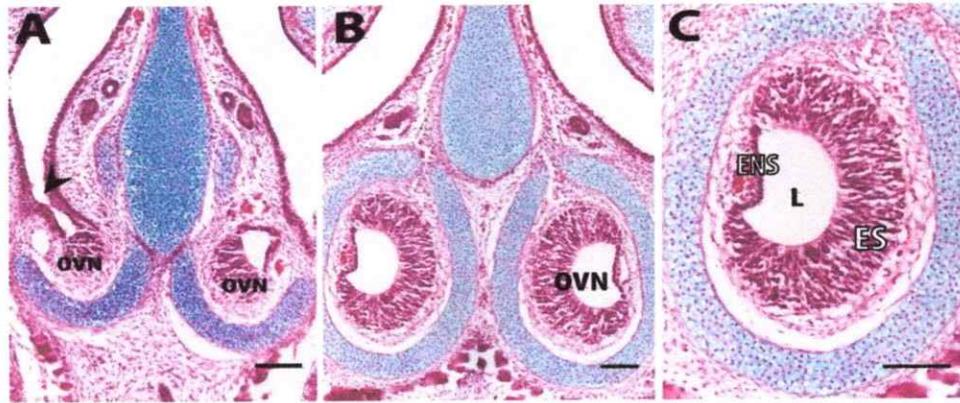


Figura 4. El OVN está presente en las etapas prenatales. Secciones transversales de la nariz de *O. degus* de individuos E80 teñidas con hematoxilina (núcleos)/eosina (citoplasma)/Alcian Blue (tinción de cartilago). (A) La imagen muestra el ducto vomeronasal, que conecta el OVN con la cavidad nasal (cabeza de flecha). (B) Sección de la zona media del OVN que muestra ambos órganos con forma de “media-luna”. (C) Vista aumentada del OVN derecho. Se observa el epitelio sensorial (ES), no sensorial (ENS) y el lumen del OVN (L). Barra, 100  $\mu$ m.

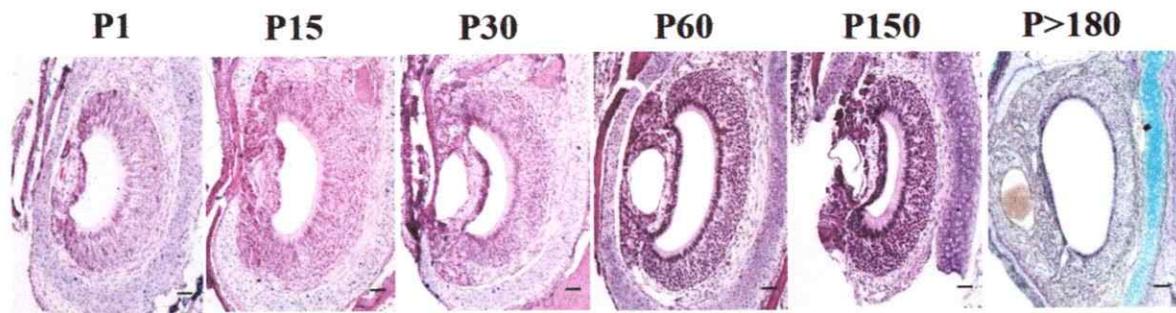


Figura 5. Microfotografías de secciones transversales de la nariz de *O. degus*, que muestran la morfología del OVN en distintas etapas del desarrollo postnatal. P1→P150, tinción de hematoxilina-eosina (H&E); P>180: H&E+Alcian Blue. Barra 50  $\mu$ m.

Para evaluar la presencia de las poblaciones de neuronas vomeronasales V1R y V2R en el OVN durante el desarrollo, se realizó la inmunoreactividad con el anticuerpo anti- $G_{\alpha i2}$ , cuya proteína está presente de forma exclusiva en las neuronas V1R. No se logró obtener la inmunoreactividad de  $G_{\alpha i2}$  en el OVN de los individuos de E80. Sin embargo, en esta etapa se observó que el BOA posee una marca  $G_{\alpha i2}^+$  que se remite de forma exclusiva al aBOA (ver detalles en sección 1.2), lo que sugiere su presencia en el OVN durante esta etapa. Junto con ello, se evaluó la marca  $G_{\alpha i2}^+$  en los estadios postnatales P15 (Fig. 6 A→D) y P>180 (Fig. 6 E→H); en ambas etapas se observó la presencia de la proteína  $G_{\alpha i2}$  en una población segregada de neuronas, cuyos somas se ubican de forma exclusiva en la zona apical del epitelio sensorial, cercano al lumen del OVN. La marca  $G_{\alpha i2}^+$  estaba presente además en las dendritas, y fascículos axonales de las neuronas vomeronasales a lo largo de todo la extensión rostral-caudal del epitelio sensorial. Los somas de las neuronas vomeronasales que no poseen marca y se ubican en la zona basal del OVN, corresponderían a aquellas neuronas que expresan la proteína  $G_{\alpha o}$ , cuya expresión se remite de forma exclusiva a las neuronas V2R.

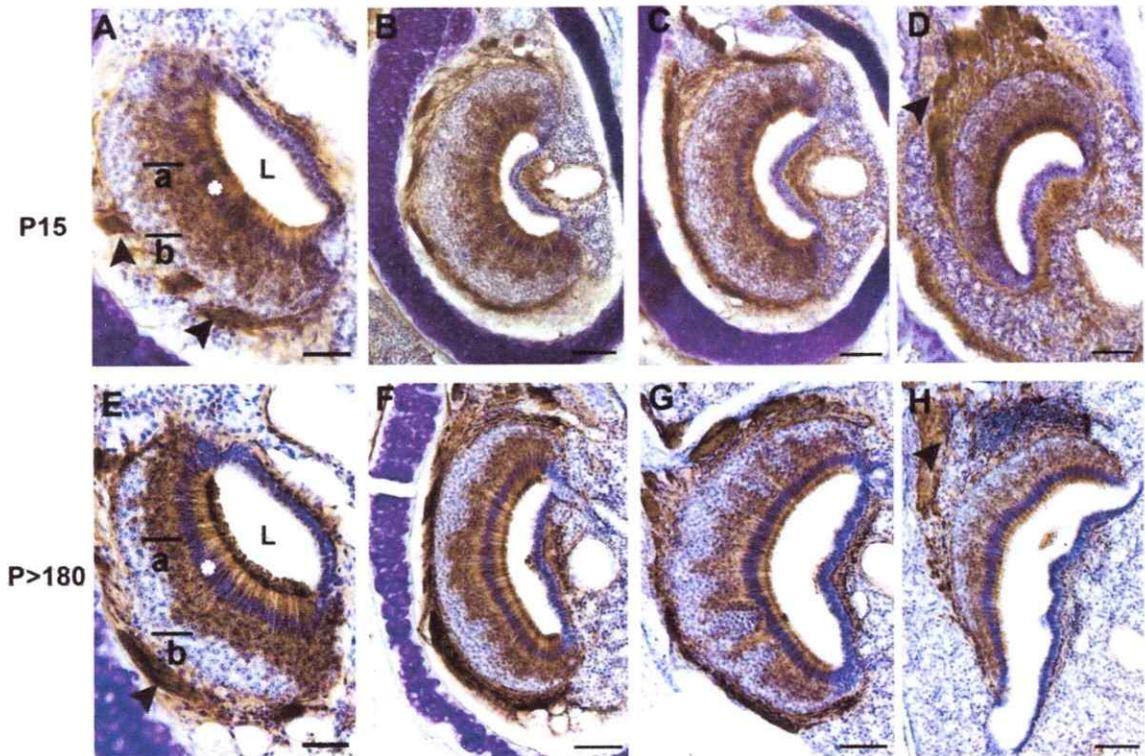


Figura 6. El OVN de *O. degus* posee dos poblaciones de neuronas vomeronasales. Imágenes de secciones coronales del OVN de individuos P15 (A→D) y P>180 (E→H). Secciones representativas en distintos puntos en la extensión rostral-caudal del OVN, para ambas etapas. La inmunoreactividad usando anti- $G_{\alpha_{i2}}$  muestra que los somas de las neuronas  $G_{\alpha_{i2}}+$  (neuronas V1R) se ubican a lo largo del eje rostral-caudal y de forma exclusiva en la zona apical (a) del epitelio sensorial. Los somas que no poseen marca  $G_{\alpha_{i2}}+$  se ubican en la zona basal (b) y corresponderían a las neuronas  $G_{\alpha_{o}}$  (neuronas V2R). La marca estaba presente además en los fascículos axonales (cabezas de flecha). (\*) capa de células de soporte. Barra, 50  $\mu\text{m}$ .

Para analizar el grado de maduración de las neuronas vomeronasales en las etapas del desarrollo evaluadas, se realizó la inmunoreactividad con el marcador de neuronas olfatorias maduras a nivel celular (OMP: *olfactory marker protein*). Esta proteína se caracteriza por estar presente sólo en las etapas finales de la diferenciación celular de las neuronas olfatorias. En E80, se observó la presencia de la marca OMP+ tanto en el OVN (Fig. 7 A) como en el EOP (Fig. 7 B). La marca se distribuye en las dendritas, somas y fascículos axonales en ambos sistemas olfatorios. En el caso del OVN, las neuronas OMP+ estaban distribuidas en todo el grosor del ES. Sin embargo, gran parte de las células presentes en el ES del OVN no presentaron marca OMP+ durante esta etapa.

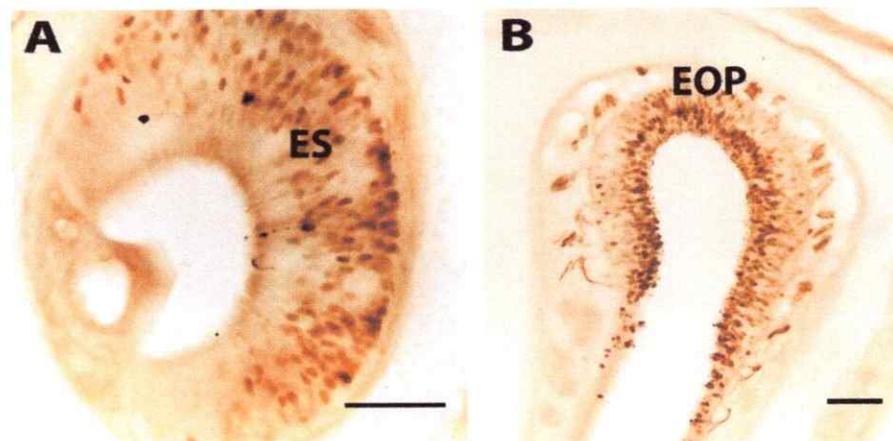


Figura 7. Neuronas olfatorias maduras a nivel celular presentes en la etapa prenatal. Inmunoreactividad usando anti-OMP en *O. degus* de E80. (A) Sección coronal de OVN muestra que solo una fracción de los somas del ES son OMP +. (B) Imagen muestra parte de la zona dorsal el EOP, que presenta un alto número de células OMP+. Barra, 100  $\mu$ m.

En P1, las neuronas presentes en el epitelio sensorial del OVN expresan OMP en todo el epitelio sensorial del OVN de manera homogénea (Fig. 8 A). Por el contrario, en P15, se observó que existe una población de neuronas ubicadas en la zona apical del epitelio vomeronasal que posee una intensidad de marca OMP+ que fue mayor que en aquellas ubicadas en la zona basal (Fig. 8 B). Aquella diferencia en la intensidad de marca OMP+ persiste en las etapas posteriores del desarrollo (P30, P60, P150, P>180) (Fig. 8 C y D). Mediante la realización de microfotografías tomadas a nivel de un plano focal (microscopía "spinnig-disk") junto con la realización de secciones delgadas del OVN (10  $\mu\text{m}$  de grosor), se observó que la diferencia de intensidad de marca OMP+ observada entre ambas zonas del OVN corresponde principalmente a una mayor expresión de la proteína OMP en las neuronas ubicadas en la zona apical, con respecto a las de la zona basal (Fig. 9 A y B).

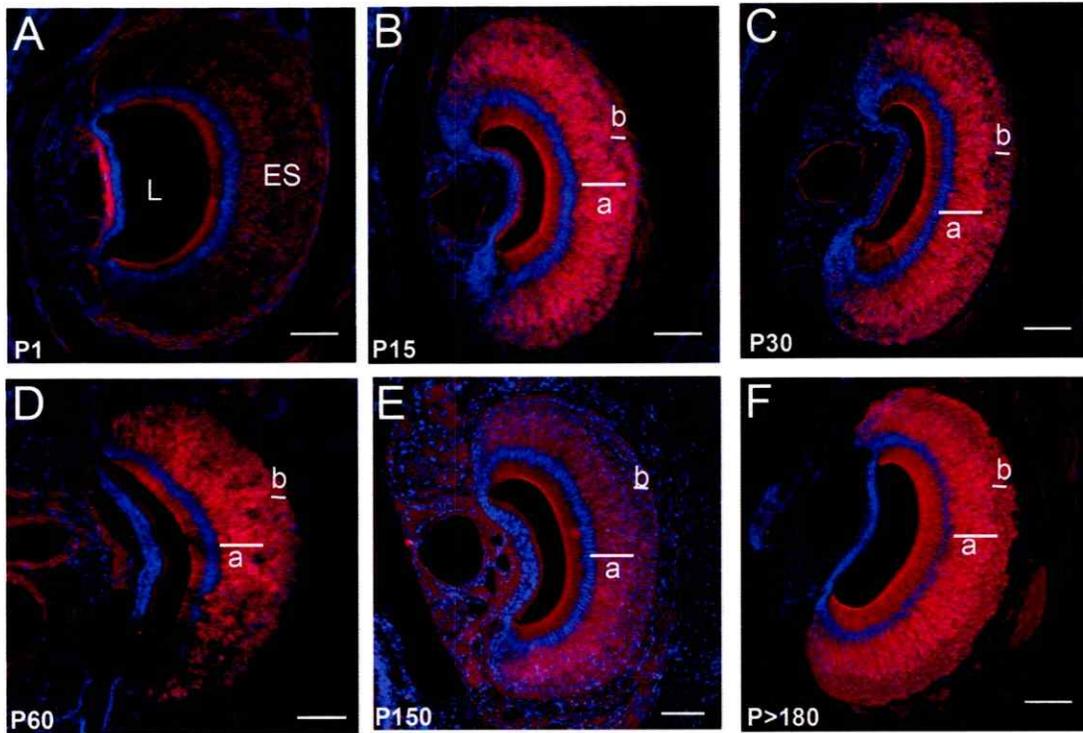


Figura 8. Desarrollo del OVN en las etapas postnatales de *O. degus*. Inmunoreactividad usando anti-OMP en secciones transversales del OVN. A) La imagen muestra que en P1, la marca de OMP se distribuye de forma homogénea en el epitelio sensorial. En P15 (B) y en las etapas posteriores (C F), la zona apical (a) del epitelio sensorial posee una intensidad de marca OMP+ mayor que la zona basal (b). Las secciones fueron contrateñidas con DAPI. Barra 50  $\mu$ m.

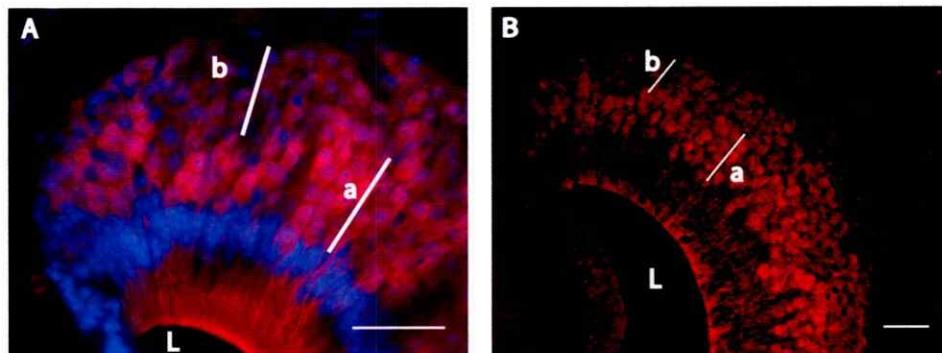


Figura 9. Expresión diferencial de la proteína OMP entre las zonas apical y basal del OVN. A) Microfotografía del OVN de individuos P>180, tomada en un plano focal del eje Z de un corte de 30  $\mu$ m de grosor, muestra que las neuronas ubicadas en la zona apical (a) poseen una mayor intensidad de marca que las neuronas presentes en la zona basal (b). Las secciones fueron contrateñidas con DAPI. Barra 50  $\mu$ m. B) Imagen de una sección delgada (10  $\mu$ m) del OVN. Las neuronas vomeronasales apicales (a) poseen una mayor intensidad de marca que las neuronas basales (b), a nivel de una capa de células. Barra 50  $\mu$ m.

## 1.2. Maduración anatómica de las zonas aBOA y pBOA en la ontogenia de *O. degus*.

En *O. degus*, el BOA está presente en las etapas prenatales. En E80 el BOA posee una forma laminar y se encuentra separado del BOP (Fig. 10 A). En esta etapa se observó la presencia de la capa del nervio vomeronasal (CNV), la capa glomerular (CG), la capa plexiforme externa (CPE), la capa de células mitrales /tufted (CM/T) y la capa de células granulares (CGr) (Fig. 10 B). Una hendidura, presente en la CNV, CG, CPE y CM/T, divide el BOA en dos zonas (aBOA y pBOA) de forma similar a lo reportado en los individuos adultos (Suárez & Mpodozis, 2009) (Fig. 10 A y B).

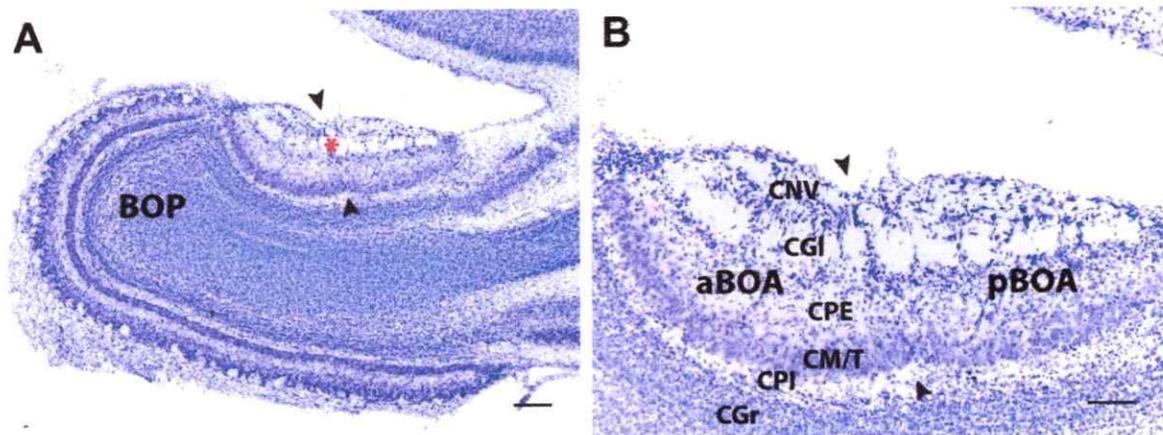


Figura 10. El BOA está presente desde la etapa prenatal. (A) Sección sagital del bulbo olfatorio de *O. degus* de E80, teñida con cresil-violeta, muestra el BOA (\*) como una región separada del BOP. Se destaca la hendidura que divide al BOA en los subdominios anterior (aBOA) y posterior (pBOA) (cabezas de flecha). Barra 200  $\mu\text{m}$  (B) En una vista aumentada se observan las zonas el aBOA y el pBOA, ambas conformadas por capas y divididas por una hendidura presente en la CNV, CG, CPE y CM/T (cabezas de flecha). Barra 100  $\mu\text{m}$ . CNV, capa del nervio vomeronasal; CG, capa glomerular; CPE, capa plexiforme externa; CM/T, capa de células mitrales/tufted; CPI, capa plexiforme interna CGr, Capa de células granulares.

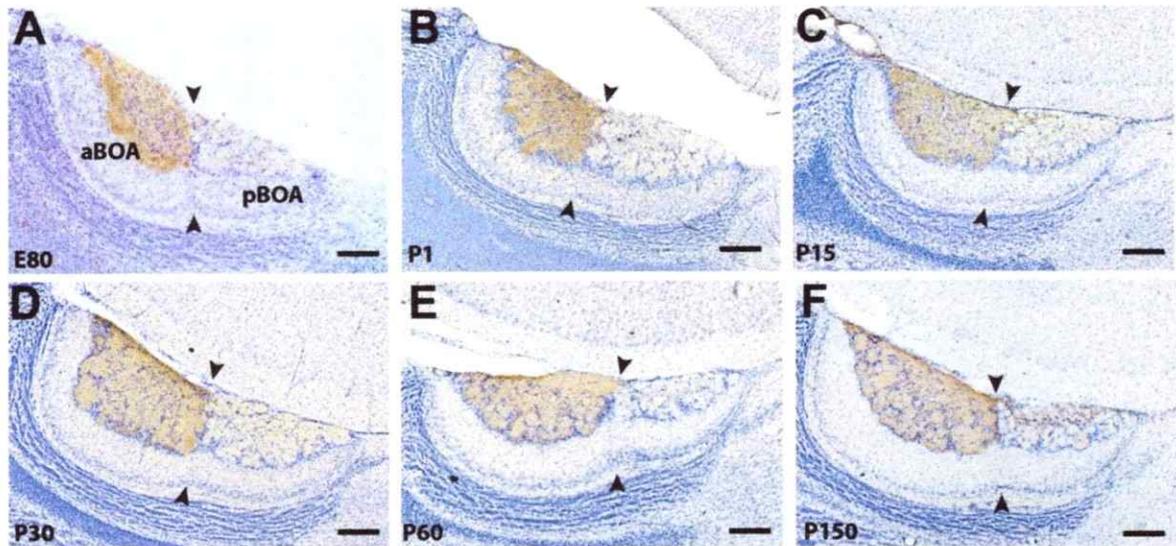


Figura 11. Las vías vomeronasales están segregadas en el BOA desde las etapas prenatales. (A) Inmunoreactividad usando anti-G $\alpha$ i2 en el BOA de *O. degus* de E80. La imagen muestra una marca G $\alpha$ i2+ presente de forma exclusiva en la CNV y en la CG del aBOA. En las etapas posteriores del desarrollo postnatal (P1 (B), P15 (C), P30 (D), P60 (E), P150 (F)) dicho patrón de marcaje G $\alpha$ i2+ persiste. Las secciones fueron contrateñidas con cresil-violeta. Barra 200  $\mu$ m.

Mediante la inmunoreactividad usando anti-G<sub>α12</sub> se observó que en E80, las proyecciones de las neuronas vomeronasales G<sub>α12</sub><sup>+</sup> están ubicadas de forma exclusiva en el aBOA (Fig. 11 A), similar a lo observado en la etapa adulta. La marca está presente tanto en la CNV como en los glomérulos de la CG. Al analizar las etapas del desarrollo postnatal, se observó que la marca persiste en todas ellas (Fig. 11 B→D).

En los individuos de E80, el BOA presentó rasgos anatómicos inmaduros. En secciones parasagitales del bulbo olfatorio teñidas con cresil-violeta, se observó que la CG presentó un número bajo de células yuxtglomerulares, las que se ubican preferentemente en el límite entre la CG y la capa plexiforme externa (CPE) (Fig. 12 A). Junto con ello, ambos subdominios presentaron un alto número de neuronas mitrales/tufted con un patrón de marcaje distinto al observado en la etapa adulta: se observó la presencia de la tinción en el soma, no así en los procesos dendríticos, cuyo marcaje es característico de una neurona mitral o tufted en un individuo adulto (Fig. 12A'). Por último, ambos tipos de neuronas de proyección secundaria se encuentran ampliamente distribuidas entre la capa de células mitrales /tufted (CM/T) y la capa plexiforme externa (CPE) (Fig. 12 A). En P1, las células yuxtglomerulares rodean parcialmente a los glomérulos (Fig. 12 B), habiendo una mayor integración de éstas en la CG en P30 (Fig. 12 C). Además en P15, las células mitrales/tufted se ubican mayormente en la CM/T y gran parte de éstas neuronas muestra un patrón de marcaje similar al observado en los individuos adultos, con la presencia de la tinción tanto en el soma como en sus procesos dendríticos (Fig. 12 C'). En las etapas posteriores del desarrollo postnatal (P30→ P>180), se observó de forma cualitativa un aumento progresivo en el grosor de la CG, siendo mayor en la CG del aBOA. Junto con ello, hubo una mayor inserción de interneuronas yuxtglomerulares en la CG de ambos

subdominios rodeando a los glomérulos (Fig. 12 D→G). Por último, se observó una disminución progresiva en el grosor de la CM/T de ambos subdominios del BOA entre P30 y P180 (Fig. 12 D→G)

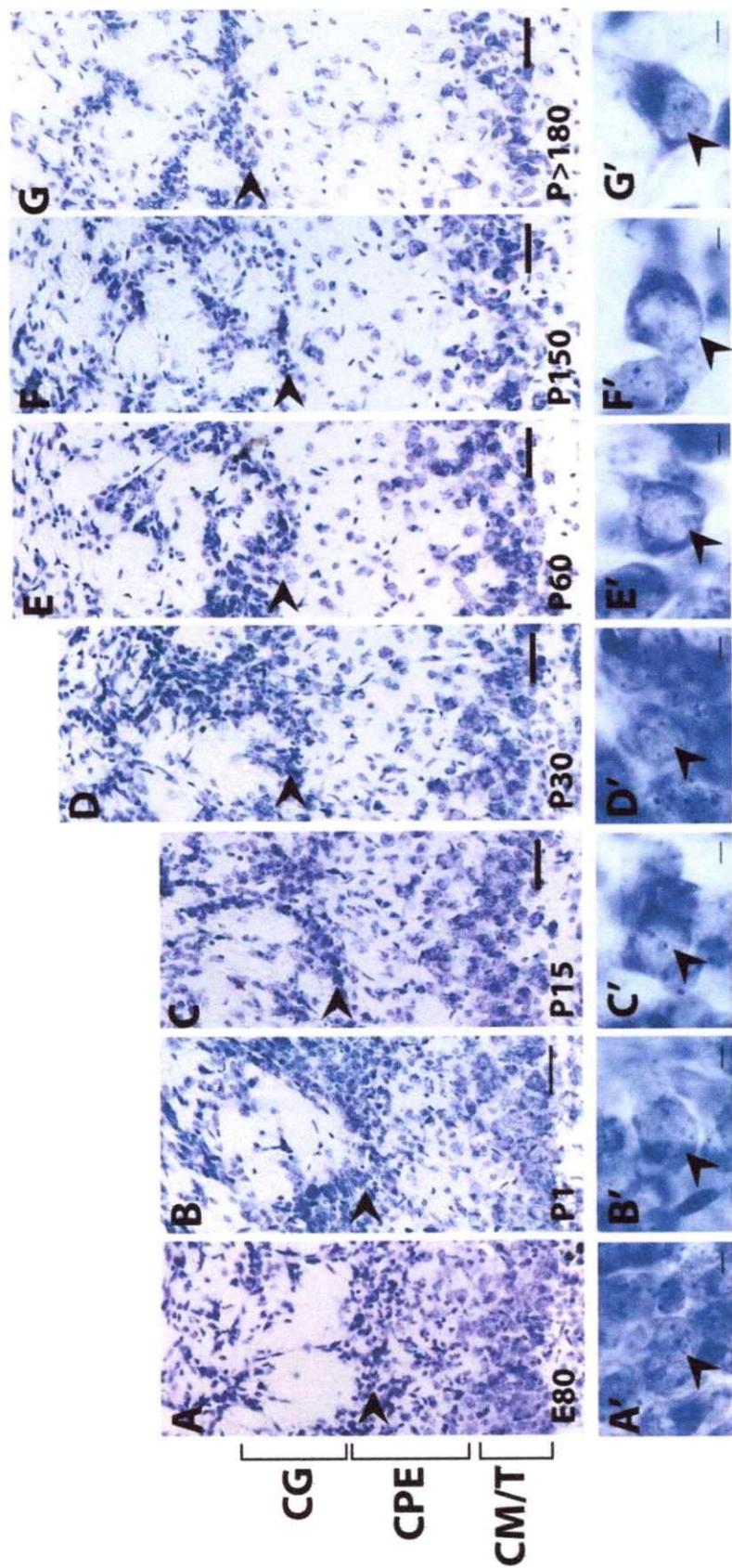


Figura 12. Maduración anatómica del BOA en el desarrollo de O. degus. Las imágenes muestran la progresión en el desarrollo de la CG, CPE y la CM/T, tanto en la etapa prenatal (E80, A) como en las etapas postnatales estudiadas (P1, P15, P30, P60, P150, P>180; B → G). Las cabezas de flecha muestran la presencia de células yuxtglomerulares, presentes en el límite entre la CG y CPE. A medida que transcurre el desarrollo, el número de células yuxtglomerulares presentes en esta región disminuye, junto con aumentar el número de células presentes en la CG, y que rodean a los glomérulos. Barra 50  $\mu$  m. (A' → G'). Imágenes aumentadas muestran la morfología de las neuronas mitrales/tufted ubicadas en la CM/T en las distintas etapas del desarrollo. La cabezas de flecha indican la ubicación de una célula mitral/tufted. Barra 5  $\mu$ m. Todas las secciones fueron contrateñidas con cresil-violeta. CG, capa glomerular; CPE, capa plexiforme externa; CM/T, capa de células mitrales/tufted.

Junto con caracterizar la anatomía del BOA se evaluó además la expresión de dos marcadores moleculares que dan cuenta de la maduración de dicha estructura en el desarrollo: el transportador vesicular de glutamato (vGLUT-2) y OMP. vGLUT-2 está presente en los terminales presinápticos de las neuronas olfatorias, que liberan principalmente glutamato en sus blancos sinápticos, participando del ingreso del neurotransmisor en las vesículas sinápticas. Se observó que en E80, la presencia de vGLUT-2 estaba restringida a la CG, tanto en el BOA como en el BOP (Fig. 13 A y C). Por otro lado, en esta misma etapa, OMP estaba presente en la CNV en la CG tanto del BOA como del BOP (Fig. 13 B y D).

Al analizar la expresión de vGLUT-2 en las etapas postnatales se observó que la marca estaba restringida a la CG del BOA y el BOP, de una forma similar a lo observado en la etapa prenatal. La intensidad de la marca vGLUT-2+ varió entre las distintas etapas analizadas, no habiendo aumento progresivo de la marca durante el desarrollo (Fig. 14 A→D). De forma interesante en P15, junto con haber una mayor cantidad de glomérulos formados que en las etapas previa evaluadas, existen a la vez regiones dentro de la CG que presentaron una marca vGLUT-2+, pero en las que no se forman glomérulos individuales rodeados por células yuxtglomerulares (Fig. 15). Aquellas “lagunas” de terminales vomeronasales estaban presentes en mayor medida en la CG del aBOA (Fig. 15 A).

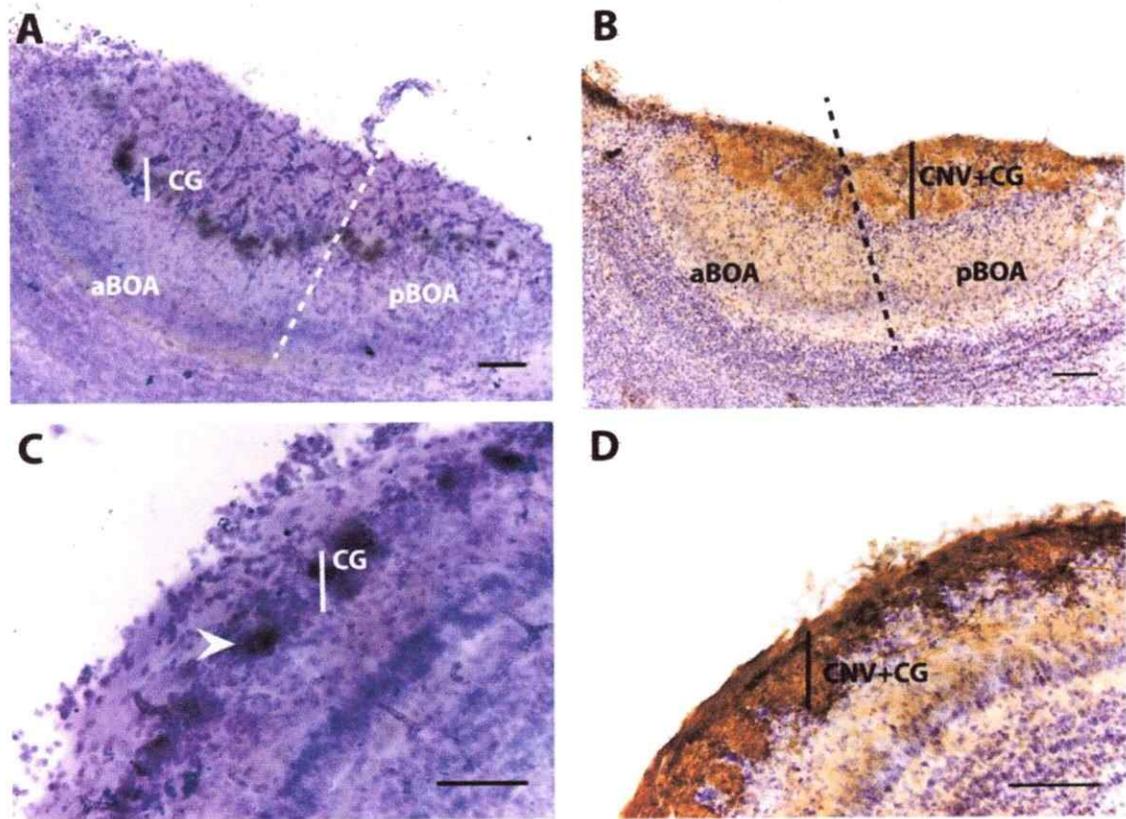


Figura 13. Maduración de los terminales olfatorios en el bulbo olfatorio en la etapa prenatal. (A y C) Inmunoreactividad usando anti-vGLUT-2 en individuos E80 muestra una marca en la CG del BOA (A) y en el BOP (C). Las secciones fueron reveladas con DAB + sulfato de níquel (tinción de color negro) y contrateñidas con solución de Giemsa. (B y D) Inmunoreactividad usando anti-OMP, muestra una marca en la CNV y CG del BOA (B) y en el BOP (D). Las secciones fueron contrateñidas con cresil-violeta. CNV, capa del nervio vomeronasal; CG, capa glomerular. Barra 100  $\mu$ m.

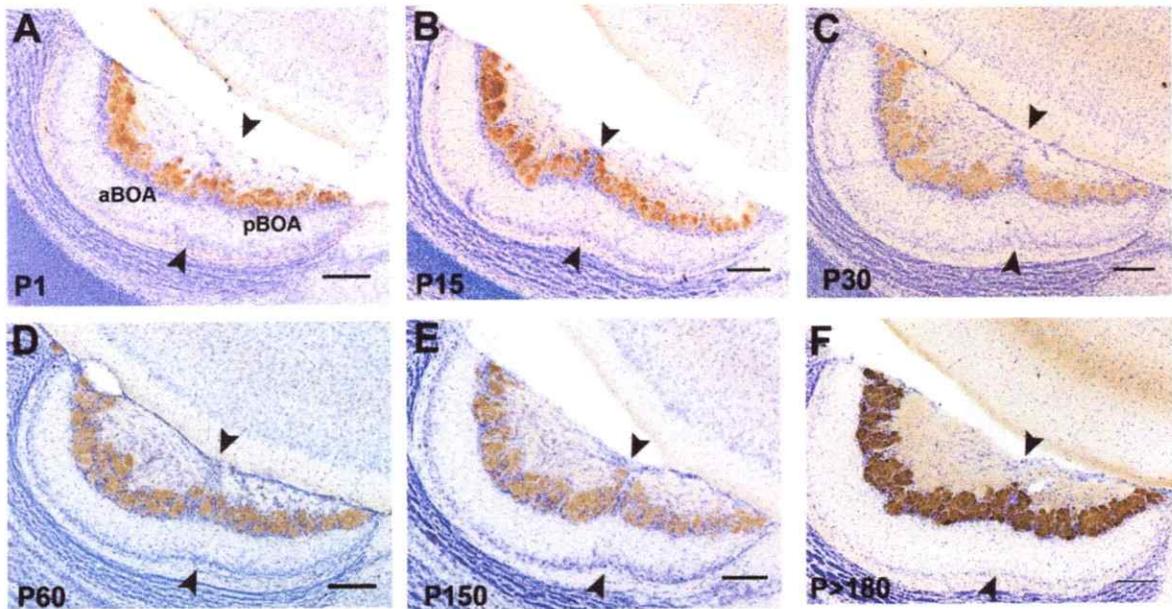


Figura 14. Desarrollo de las arborizaciones terminales glutamatergicas de las neuronas vomeronasales en el BOA. Fotografías de secciones sagitales del bulbo olfatorio que muestran la expresión de vGLUT-2 en ambos subdominios del BOA en las etapas postnatales P1 (A), P15 (B), P30 (C), P60 (D), P150 (E) y P>180 (F). Las secciones fueron contrateñidas con cresil-violeta. Barra 200  $\mu$ m.

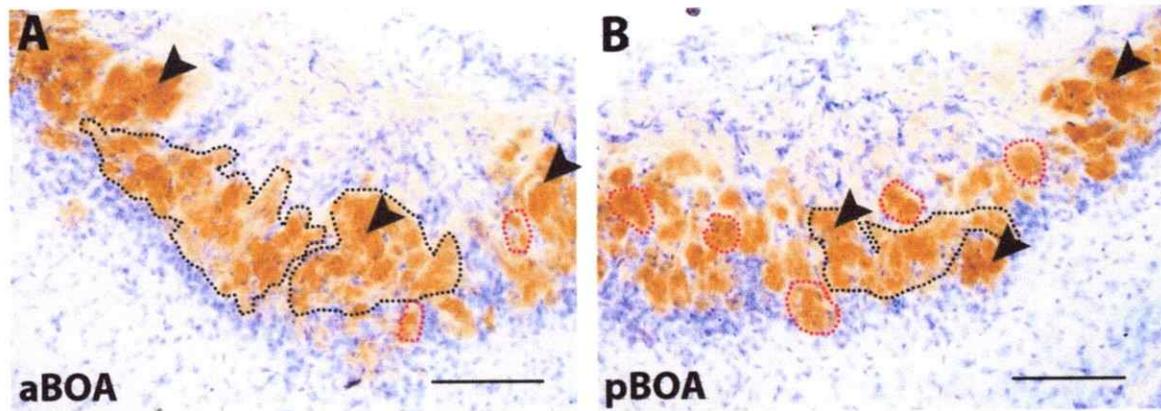


Figura 15. Desarrollo de los glomérulos en el BOA. Imágenes muestran los subdominios aBOA (A) y pBOA (B) de individuos P15, cuya CG presenta la marca vGLUT-2+. Se destaca la presencia de "lagunas" compuestas por las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales VIR (aBOA) y V2R (pBOA) (línea segmentada negra) y de glomérulos rodeados por células juxtglomerulares (línea segmentada roja), en ambos subdominios. Se destaca la presencia de regiones que exhiben una intensidad de marca mayor (cabezas de flecha), presentes en ambos subdominios.

Al analizar la expresión de OMP en las etapas postnatales se observó que la marca estaba presente tanto en la CNV como en la CG en los subdominios aBOA y pBOA. En P1 la intensidad de marca fue similar entre ambos subdominios (Fig. 16 A). Sin embargo, en P15, se observó que el aBOA presentó una intensidad de la marca mayor que en el pBOA (Fig. 16 B), un resultado similar al observado en el OVN (ver sección anterior). Además, tanto en P15 como en P30 parte del total de los glomérulos presentaron una alta intensidad de la marca, (Fig. 16 B y C), mientras que en las etapas posteriores (P60→P>180) los glomérulos exhibieron una intensidad de marca homogénea. Por último, en las etapas posteriores del desarrollo postnatal (P60→ P>180), la diferencia en intensidad de marca OMP+ entre los subdominios del BOA persiste, siendo distinguible aún en la etapa adulta. (Fig. 16 C→D).

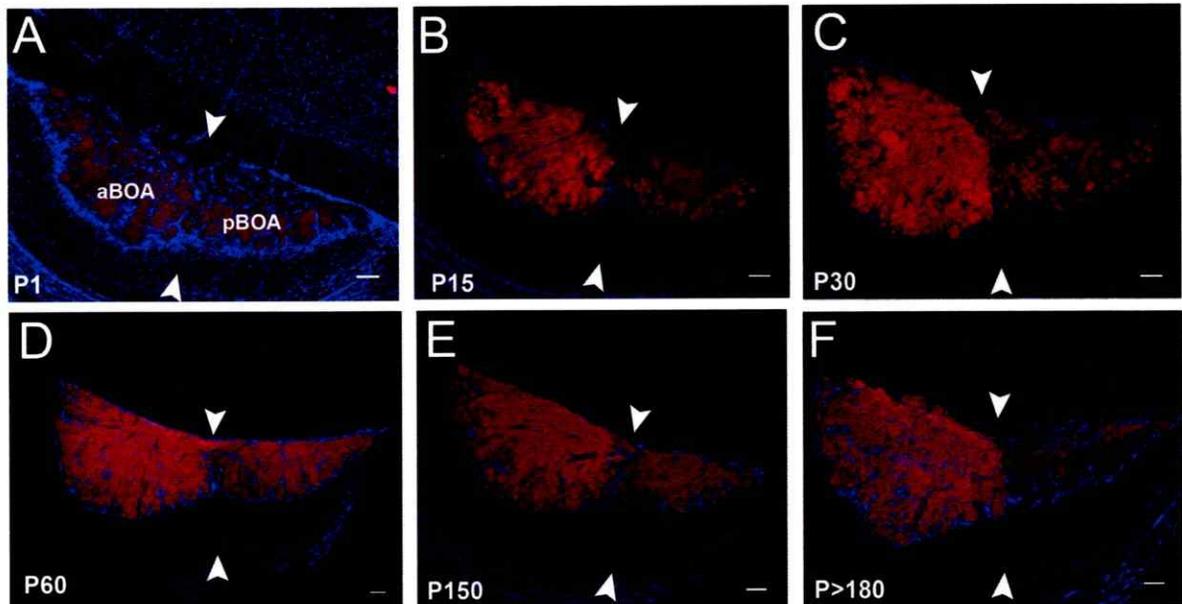


Figura 16. Maduración de las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales en el BOA. Fotografías de secciones sagitales del bulbo olfatorio que muestran la expresión de OMP en los subdominios del BOA en P1(A), P15 (B), P30(C), P60 (D), P150 (E) y P>180(F). Las secciones fueron contrateñidas con DAPI. Barra 100  $\mu$ m.

## Resumen Objetivo 1

- Las estructuras asociadas al SVN (OVN y BOA) están presentes desde las etapas prenatales, previo al nacimiento. Sin embargo muestran un alto grado de inmadurez anatómica en dichas etapas.
- Tanto el OVN como el BOA exhiben una madurez anatómica similar a la observada en la etapa adulta desde las etapas postnatales tempranas, entre P15 y P30. Esto último reflejado principalmente por:
  - i) La expresión diferencial del marcador de neuronas olfatorias maduras (OMP) entre las neuronas V1R y V2R desde P15 en adelante.
  - ii) Una mayor presencia de células de proyección secundaria (mitrales/tufted) con morfología madura desde P15 en adelante.
  - iii) Una mayor presencia de glomérulos rodeados por interneuronas yuxtglomerulares desde P30.

## 2. Desarrollo de las vías vomeronasales V1R y V2R: Curso temporal de la heterogeneidad morfométrica en *O. degus*.

### 2.1. Bulbo olfatorio accesorio anterior (aBOA) y posterior (pBOA).

Mediante métodos estereológicos, se realizó una estimación del volumen total de los subdominios aBOA y pBOA (Tabla 1) en distintos estadios del desarrollo postnatal. Para dicha medición se consideró el volumen de la CNV, CG, CPE y CM/T de cada uno de los subdominios (ver metodología). Se observó que en P1 no hubieron diferencias significativas entre ambos subdominios ( $Z=1,826$ ;  $p=0,068$ ;  $n=4$ ) (Tabla 1, 2 y Fig.17). Sin embargo en P15, se encontró una diferencia significativa entre ambos, siendo el volumen del aBOA un 10% mayor que el volumen de pBOA ( $Z=2,028$ ;  $p=0,042$ ;  $n=7$ ). De forma interesante, la diferencia entre ambos subdominios aumento en las etapas posteriores del desarrollo. En P60, el valor de la heterogeneidad fue cercano al 90% del valor máximo observado (Fig 18). Por lo tanto, la heterogeneidad volumétrica entre los subdominios del BOA está presente de forma conspicua desde dicha etapa. Finalmente en P150 la heterogeneidad alcanzó un valor promedio máximo, siendo el volumen del aBOA un 52% mayor que el de pBOA ( $Z=2,2$ ;  $p=0,04$ ;  $n=5$ ), similar a lo observado en la etapa adulta.

Tabla 1. Volúmenes promedio correspondientes a los subdominios anterior y posterior del BOA, medidos en distintas etapas del desarrollo postnatal de *O. degus*. (<sup>a</sup>) Volúmenes (promedio± error estándar) expresados en mm<sup>3</sup>.

Edad	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	(aBOA/pBOA)	n
P1	0,27±0,02	0,28±0,02	0,9	4
P15	0,35±0,03	0,31±0,03	1,1	7
P30	0,5±0,02	0,41±0,02	1,2	7
P60	0,47±0,02	0,34±0,01	1,4	5
P150	0,6±0,05	0,39±0,02	1,5	5
P>180	0,66±0,05	0,42±0,03	1,5	6

Tabla 2. Volúmenes promedio correspondientes a los subdominios anterior y posterior del BOA, medidos en distintas etapas del desarrollo postnatal de *O. degus*. Los datos fueron estandarizados por el volumen del cerebro en cada individuo.

Edad	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	(aBOA/pBOA)	Prueba de Wilcoxon
P1	2,4 x 10 <sup>-4</sup>	2,6 x 10 <sup>-4</sup>	0,9	Z=1,8; p=0,07; n=4
P15	2,4 x 10 <sup>-4</sup>	2,2 x 10 <sup>-4</sup>	1,1	Z=2; p=0,04; n=7 *
P30	3,1 x 10 <sup>-4</sup>	2,6 x 10 <sup>-4</sup>	1,2	Z=2,2; p=0,03; n=7 *
P60	2,3 x 10 <sup>-4</sup>	1,6 x 10 <sup>-4</sup>	1,4	Z=2,2; p=0,04; n=5 *
P150	2,6 x 10 <sup>-4</sup>	1,7x 10 <sup>-4</sup>	1,5	Z=2,2; p=0,04; n=5 *
P>180	2,8 x 10 <sup>-4</sup>	1,8x 10 <sup>-4</sup>	1,5	Z=2,2; p=0,03; n=6 *

\*p<0,05, diferencias significativas entre aBOA y pBOA, obtenidas mediante la prueba de Wilcoxon.

La estadística se realizó con los datos normalizados por el volumen del cerebro total para cada individuo.

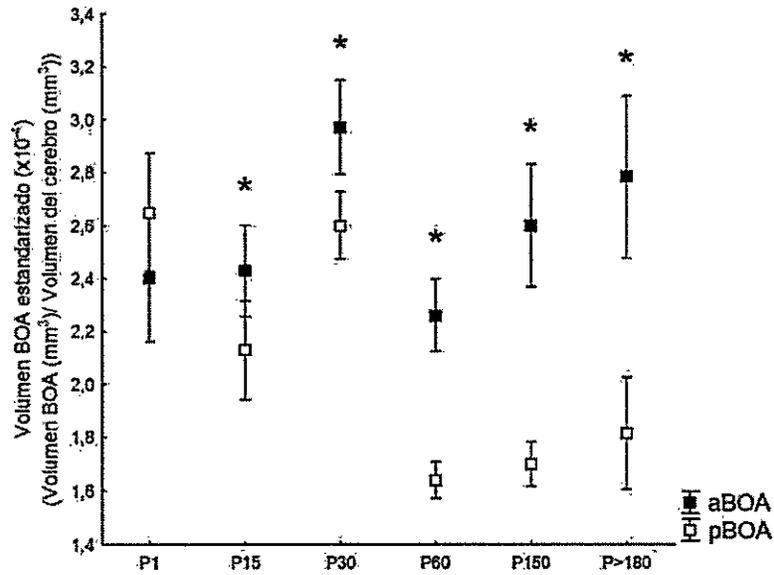


Figura 17. Volúmenes estandarizados correspondientes a los subdominios del BOA de *O. degus*, medidos en distintas etapas postnatales. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. Los datos fueron estandarizados por el volumen del cerebro para cada individuo. \* $p < 0,05$ , diferencias significativas entre aBOA y pBOA, obtenidas mediante la prueba de Wilcoxon.

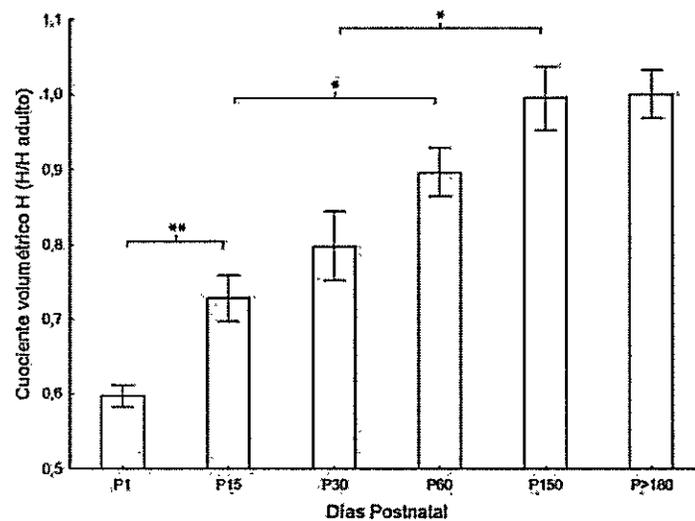


Figura 18. Comparación de la heterogeneidad morfométrica de los subdominios del BOA, obtenida en las distintas etapas del desarrollo en relación a la etapa adulta. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. Los datos fueron estandarizados por el volumen del cerebro para cada individuo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  diferencias significativas entre aBOA y pBOA, obtenidas mediante la prueba de Mann-Whitney.

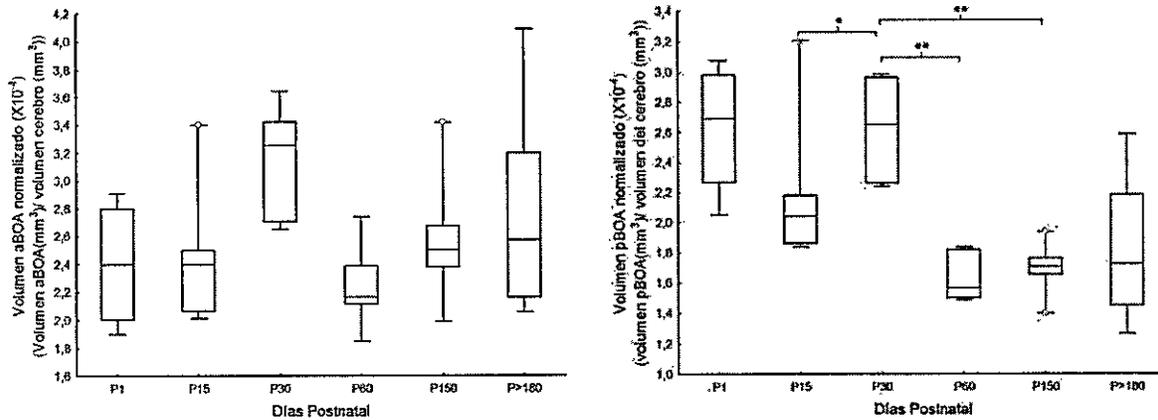


Figura 19. Comparación del aBOA en distintas etapas del desarrollo B) Comparación del pBOA en distintas etapas del desarrollo. La gráfica de boxplot muestra los dos percentiles centrales y la mediana. La barra muestra los valores mínimo y máximo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  diferencias significativas entre aBOA y pBOA para cada caso, obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney.

Al analizar el cambio volumétrico de ambos subdominios por separado, se observó que el aBOA no mostró cambios significativos entre las etapas estudiadas (Kruskal – Wallis:  $(H(5)=10,15; p=0,07)$  (Fig. 19 A). En cambio, el pBOA mostró cambios significativos (Kruskal – Wallis:  $(H(5)=20,9; p=0,0008)$  entre las etapas estudiadas (Fig. 19 B). En particular hubo un aumento y a una posterior disminución del volumen entre P15-P30 ( $U=7 \quad Z=-2,24; p=0,025; n_{P15}=7, n_{P30}=7$ ) y entre P30-P60 ( $U=0 \quad Z=2,203; p=0,044; n_{P30}=7, n_{P60}=5$ ) respectivamente. Por último se observó un cambio significativo del volumen de pBOA hasta P150.

## 2.2. Capa Glomerular del BOA anterior (aBOA) y posterior (pBOA).

Se realizó una estimación del volumen de la CG presente en los subdominios aBOA y pBOA (Tabla 3), en cada uno de los estadios del desarrollo postnatal. Se observó que tanto en P1 como en P15, no existen diferencias significativas entre ambos subdominios ( $Z=1,521$ ;  $p=0,128$ ;  $n=7$ ) (Tablas 3 y 4 y Fig. 20). En P30, se observó una diferencia significativa entre la CG de ambos subdominios ( $Z=2,197$ ;  $p=0,028$ ;  $n=7$ ). En esta etapa, la CG del aBOA es un 12% mayor que la CG del pBOA. La diferencia volumétrica entre ambos subdominios aumentó en las etapas posteriores del desarrollo. En P60, el valor de la heterogeneidad fue cercano al 90% del valor máximo observado (Fig. 21). Por lo tanto, la heterogeneidad volumétrica entre los subdominios del BOA está presente de forma conspicua desde dicha etapa. Finalmente en P150 la heterogeneidad alcanzó un valor promedio máximo, siendo el volumen del aBOA un 31% mayor que el de pBOA ( $Z=2,202$ ;  $p=0,043$ ;  $n=5$ ), similar a lo observado en la etapa adulta. Cabe destacar que desde P60 en adelante hubo una alta variabilidad en el grado de heterogeneidad volumétrica observada en la CG. De forma interesante en la etapa adulta, junto con haber individuos que poseen un alto grado de heterogeneidad en la CG (volumen de la CG-aBOA siendo >50% que la CG-pBOA) hubieron individuos en que el volumen de la CG del aBOA fue solo un 6% mayor que en el pBOA. Por lo tanto la heterogeneidad volumétrica de la CG solo se estableció de forma conspicua en parte de la población estudiada, no siendo homogénea dentro del grupo.

Tabla 3. Volúmenes promedio, correspondientes a la CG de los subdominios anterior y posterior del BOA, medidos en distintas etapas del desarrollo postnatal de *O. degus*. (<sup>a</sup>) Volúmenes (promedio± error estándar) expresados en mm<sup>3</sup>.

Edad	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	(aBOA/pBOA)	n
<b>P1</b>	0,047± 0,004	0,051± 0,004	0,9	4
<b>P15</b>	0,064± 0,002	0,069± 0,003	0,9	7
<b>P30</b>	0,094± 0,002	0,084± 0,003	1,1	7
<b>P60</b>	0,092± 0,003	0,073± 0,003	1,3	5
<b>P150</b>	0,121± 0,01	0,093± 0,007	1,3	5
<b>P&gt;180</b>	0,103± 0,007	0,077± 0,007	1,3	6

Tabla 4. Volúmenes promedio, correspondientes a la CG de los subdominios anterior y posterior del BOA, medidos durante distintas etapas del desarrollo postnatal de *O. degus*. Los datos fueron estandarizados por el volumen del cerebro en cada individuo.

Edad	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	(aBOA/pBOA)	Prueba de Wilcoxon
<b>P1</b>	4,4 x 10 <sup>-5</sup>	4,8 x 10 <sup>-5</sup>	0,9	Z=1,8; p=0,07; n=4
<b>P15</b>	4,5x 10 <sup>-5</sup>	4,9 x 10 <sup>-5</sup>	0,9	Z=1,5; p=0,1; n=7
<b>P30</b>	5,7 x 10 <sup>-5</sup>	5,1x 10 <sup>-5</sup>	1,1	Z=2,2; p=0,03; n=7 *
<b>P60</b>	4,4 x 10 <sup>-5</sup>	3,5 x 10 <sup>-5</sup>	1,3	Z=2,2; p=0,04; n=5 *
<b>P150</b>	5,3 x 10 <sup>-5</sup>	4 x 10 <sup>-5</sup>	1,3	Z=2,2; p=0,04; n=5 *
<b>P&gt;180</b>	4,3x 10 <sup>-5</sup>	3,2 x 10 <sup>-5</sup>	1,3	Z=2,2; p=0,03; n=6 *

\*p<0,05, diferencias significativas entre aBOA y pBOA, obtenidas mediante la prueba de Wilcoxon. La estadística se realizó con los datos normalizados por el volumen del cerebro para cada individuo.

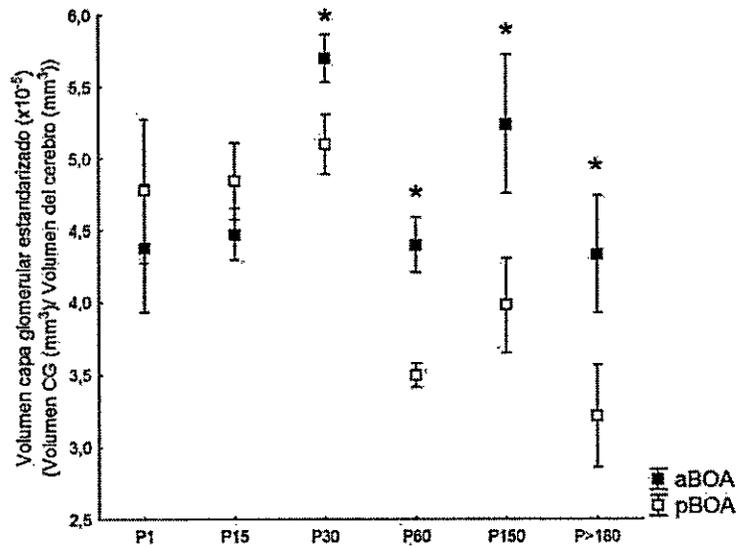


Figura 20. A) Volúmenes estandarizados correspondiente a la CG del BOA de *O. degus*, medidos en distintas etapas postnatales. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. Los datos fueron estandarizados por el volumen del cerebro para cada individuo. \* $p < 0,05$ , diferencias significativas entre aBOA y pBOA, obtenidas mediante la prueba de Wilcoxon.

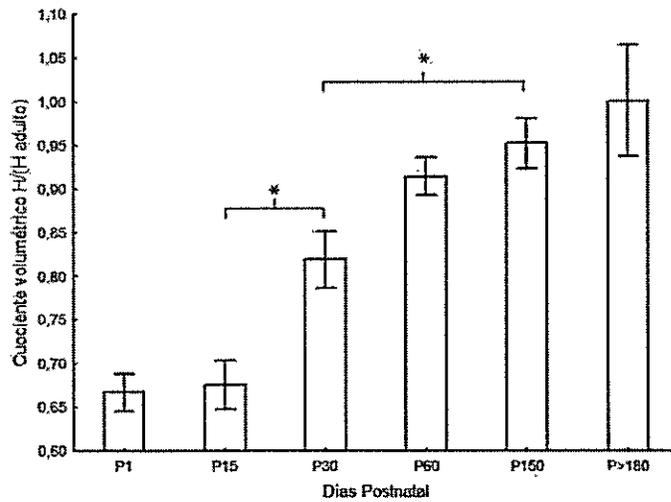


Figura 21. Comparación de la heterogeneidad morfológica de la CG, obtenida en las distintas etapas del desarrollo en relación a la etapa adulta. La gráfica de boxplot muestra los dos percentiles centrales y la mediana. La barra muestra los valores mínimo y máximo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  diferencias significativas entre aBOA y pBOA para cada caso, obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney

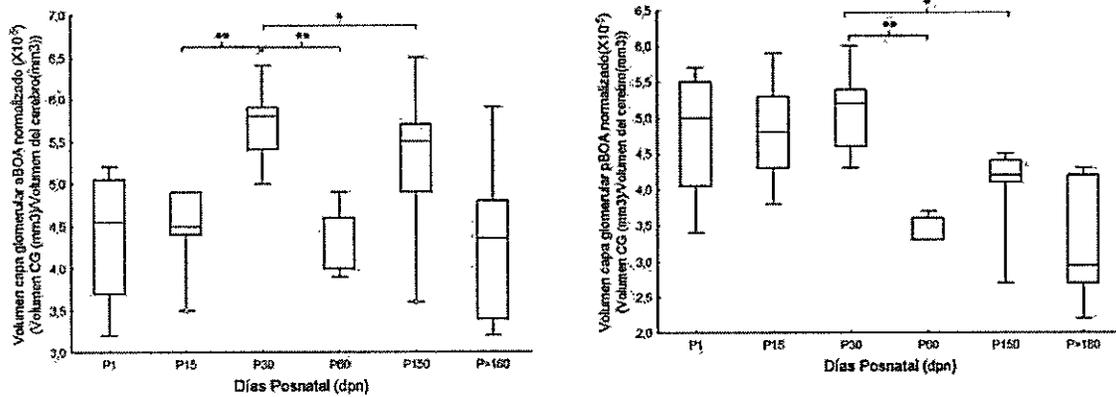


Figura 22. A) Comparación de la CG-aBOA en distintas etapas del desarrollo B) Comparación de la CG-pBOA en distintas etapas del desarrollo. La gráfica de boxplot muestra los dos percentiles centrales y la mediana. La barra muestra los valores mínimo y máximo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  diferencias significativas entre aBOA y pBOA para cada caso, obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney.

Al analizar el volumen de la CG de ambos subdominios por separado, se observó que la CG del aBOA presenta cambios significativos entre las etapas estudiadas (Kruskal – Wallis:  $H(5)=14,7$ ;  $p=0,01$ ) (Fig. 22 A). En particular hubo un aumento y a una posterior disminución del volumen entre P15-P30 ( $U=0$   $Z=-3,13$ ;  $p=0,002$ ;  $n_{P15}=7$ ,  $n_{P30}=7$ ) y entre P30-P60 ( $U=0$   $Z=2,84$ ;  $p=0,004$ ;  $n_{P30}=7$ ,  $n_{P60}=5$ ) respectivamente. Al igual que la CG-aBOA, la CG-pBOA mostró diferencias significativas entre las etapas del desarrollo estudiadas (Kruskal – Wallis:  $H(5)=20,2$ ;  $p=0,001$ ) (Fig. 22 B). En particular hubo una disminución significativa del volumen entre P30-P60 ( $U=0$   $Z=2,84$ ;  $p=0,004$ ;  $n_{P30}=7$ ,  $n_{P60}=5$ ). Por último, tanto en la CG del aBOA como del pBOA se observó un cambio significativo del volumen hasta P150.

## Resumen Objetivo 2

- La heterogeneidad volumétrica entre los subdominios del BOA, característica de los individuos adultos de *O. degus*, surge durante las etapas tempranas del desarrollo postnatal (P15-P30).
- Existen diferencias en el tiempo en que la heterogeneidad volumétrica se estableció en las estructuras medidas (volumen total de los subdominios y CG). En particular la CG mostró diferencias significativas sólo desde P30 en adelante.
- La diferencia entre ambos subdominios del BOA aumentó a medida que transcurre el desarrollo, tanto para el volumen total de los subdominios como para la CG. En P60 el grado de heterogeneidad poseen un valor cercano al observado en la etapa adulta. Sin embargo, la heterogeneidad entre ambos subdominios se estableció con un valor promedio máximo sólo en P150.
- Tanto el aBOA como el pBOA mostraron diferencias de volumen significativas entre las etapas del desarrollo estudiadas, en particular entre P15 y P60.

### 3. Análisis de los tipos celulares involucrados en la formación del BOA durante el desarrollo de *O. degus*.

En individuos adultos ( $P > 180$ ) e individuos P15 se realizó una estimación del volumen de las regiones apical (V1R) y basal (V2R). Para ello se utilizaron secciones transversales del OVN tratadas con el anticuerpo anti-Gi2, que marca exclusivamente los somas de las neuronas V1R. Además, en los individuos adultos se cuantificó el número de neuronas mitrales/tufted asociadas a los subdominios aBOA y pBOA, en secciones sagitales del BOA, teñidas con cresil- violeta.

#### 3.1 *O. degus* adultos ( $P > 180$ ):

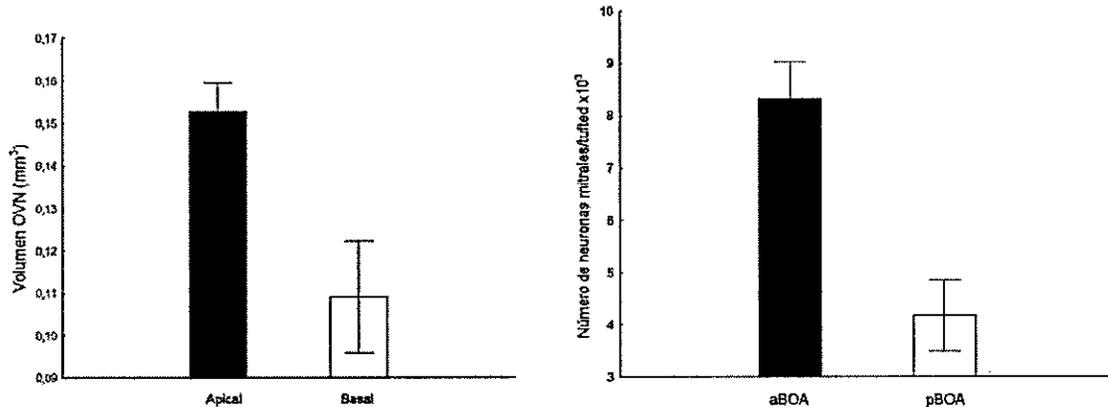


Figura 23. *O. degus* adultos muestran una heterogeneidad volumétrica entre las neuronas vomeronasales V1R y V2R y entre neuronas mitrales/tufted asociadas a los subdominios aBOA y pBOA. Las gráficas presentan A) el volumen de las zonas apical (V1R) y basal (V2R) del OVN y B) el número de neuronas mitrales/tufted asociado a los subdominios aBOA y pBOA. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

Tabla 5. Estimación volumétrica de las zonas apical y basal del OVN y del número de neuronas mitrales/tufted presentes en los subdominios aBOA y pBOA de *O. degus* adultos (P>180).

Edad	Volumen OVN		N° neuronas mitrales /tufted					
	Apical <sup>a</sup>	Basal <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	n	aBOA	pBOA	aBOA/pBOA	n
P>180	0,153±0,007	0,109±0,013	1,40	2	8324± 704	4177± 680	2,00	3

<sup>a</sup>Volúmenes (promedio± error estándar) expresados en mm<sup>3</sup>

En los individuos adultos (P>180), se observó que la zona apical del OVN (formada por los somas de las neuronas V1R) posee un volumen que fue en promedio un 40% mayor que el volumen de la zona basal (V2R, Fig. 23A y Tabla 5). En el caso de las neuronas mitrales y tufted, se observó que el número de neuronas presentes en la capa de células mitrales/tufted (CM/T) del aBOA fue el doble (100%) del número de neuronas presente en el pBOA (Fig. 23 B y Tabla 5).

### 3.2 *O. degus* P15:

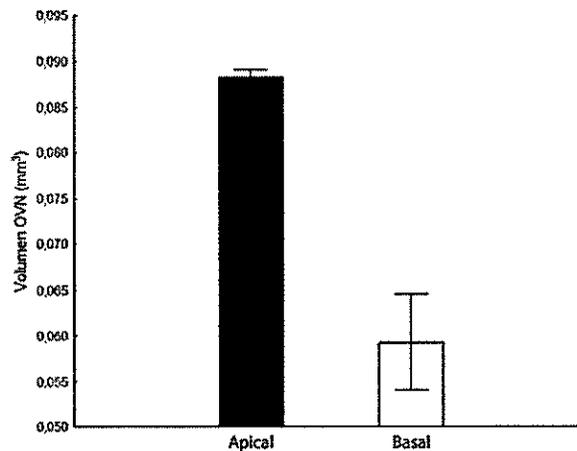


Figura 24. Heterogeneidad volumétrica entre las neuronas vomeronasales V1R y V2R presente en *O. degus* de P15. La gráfica presenta el volumen de las zonas apical (V1R) y basal (V2R). Los valores corresponden al promedio± error estándar.

Tabla 6. Estimación volumétrica de las zonas apical y basal del OVN de *O. degus* en P15.

Edad	Volumen OVN			n
	Apical <sup>a</sup>	Basal <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	
P>15	0,088±0,0008	0,059±0,005	1,49	2

<sup>a</sup>Volúmenes (promedio± error estándar) expresados en mm<sup>3</sup>

En individuos P15 se observó que el volumen total del OVN es más pequeño, cercano a la mitad del tamaño exhibido por los individuos adultos (P15= 0,147; P>180= 0,262). De forma interesante, en ésta etapa el volumen de la zona apical fue un 49% mayor que el volumen de la zona basal (Fig. 24, Tabla 6).

### **Resumen Objetivo 3**

- Existe una heterogeneidad en la representación de las neuronas vomeronasales V1R y V2R, presentes en el OVN, desde las etapas tempranas del desarrollo postnatal.
- Tanto en la etapa adulta como en P15 las neuronas vomeronasales V1R están mayormente representadas que las neuronas V2R: el volumen de V1R fue aproximadamente un 40% mayor que el volumen de V2R.
- La heterogeneidad en el OVN está presente en etapas del desarrollo en que no hubieron diferencias en el volumen de la CG entre ambos subdominios (P15) (ver sección 2, Discusión General)

**4. Análisis de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA entre individuos que se desarrollan en distintos contextos.**

Para la realización de este objetivo se utilizó una aproximación comparativa, realizando un estudio morfométrico del BOA de *O. degus* adultos que se desarrollaron en contextos distintos: i) nacidos y criados en el bioterio (Cautiverio) y ii) nacidos y criados en terreno (Capturados).

Mediante métodos estereológicos, se realizó una estimación del volumen de los subdominios del BOA (que comprende la CNV, CG, CPE y CM/T) y del volumen de la CG presente en cada uno de ellos.

Tabla 7. Volúmenes correspondientes a los subdominios del BOA y a la CG de *Octodon degus* criados en cautiverio y capturados en el campo. <sup>a</sup>Volúmenes (promedio± error estándar) expresados en mm<sup>3</sup>.

	Volumen BOA			Volumen Capa Glomerular			n
	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	
<b>Cautiverio</b>	0,656± 0,05	0,424± 0,03	1,54	0,103± 0,07	0,077± 0,07	1,34	6
<b>Capturados</b>	0,586± 0,06	0,351± 0,03	1,67	0,094± 0,01	0,057± 0,005	1,63	6

Se observó que el volumen del subdominio aBOA fue significativamente mayor que del pBOA (Cau:  $Z=2,2$   $p=0,03$   $n=6$ ; Cap:  $Z=2,2$   $p=0,03$   $n=6$ ), tanto en los animales criados en cautiverio como los animales capturados en terreno. Del mismo modo, el volumen de la CG del aBOA fue significativamente mayor que el del pBOA (Cau:  $Z=2,2$   $p=0,028$   $n=6$ ; Cap:  $Z=2,2$   $p=0,03$   $n=6$ ) (Tabla 7, Fig. 25) para ambos grupos.

Al comparar los subdominios del BOA por separado entre los animales criados en cautiverio y los animales capturados se observó que no hubo diferencias significativas entre ambos, tanto en el volumen de los subdominios aBOA y pBOA como en la CG.

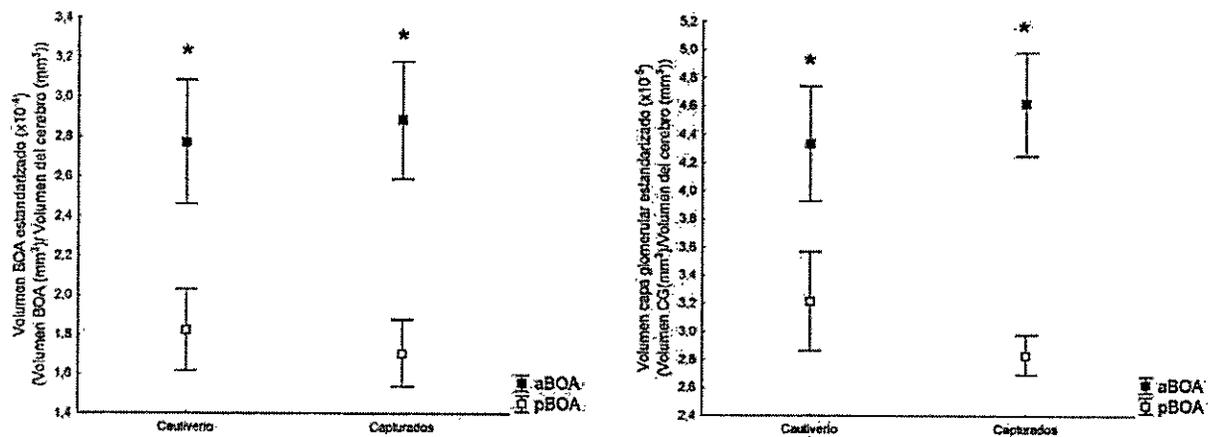


Figura 25. Volúmenes estandarizados correspondientes a A) subdominios del BOA y B) CG de *O. degus* adultos criados en cautiverio y capturados en terreno. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar, expresados en mm<sup>3</sup>. Los datos fueron estandarizados por el volumen del cerebro para cada individuo. \* $p<0,05$ , diferencias significativas entre aBOA y pBOA, obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon.

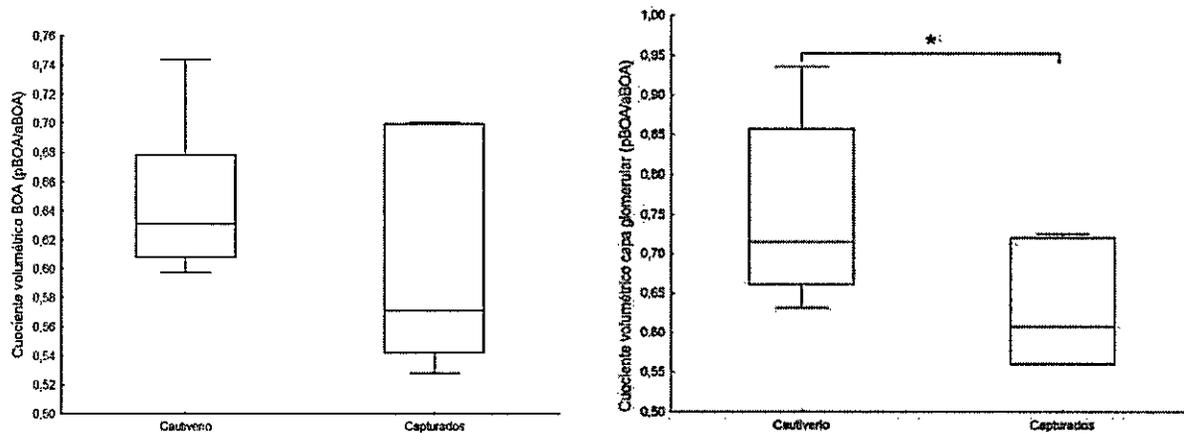


Figura 26. Cuociente volumétrico correspondiente a A) subdominios del BOA y B) CG de *O. degus* adultos criados en cautiverio y capturados en el campo. La gráfica de boxplot muestra los dos percentiles centrales y la mediana. La barra muestra los valores mínimo y máximo. \* $p < 0,05$ , diferencias significativas entre ambos grupos, obtenidas mediante la prueba de Mann-Whitney.

En segundo lugar se comparó el cuociente de los volúmenes obtenidos para los subdominios del BOA (pBOA/aBOA) y para la CG (CGpBOA/CGaBOA), entre los individuos adultos nacidos en cautiverio y aquellos que fueron capturados en terreno (Fig. 26). No se observaron diferencias significativas al comparar el cuociente volumétrico de los subdominios del BOA entre los distintos grupos ( $U=19$   $Z=1,04$   $p=0,3$   $n_{\text{cau}}=8$   $n_{\text{cap}}=7$ ) (Fig. 26 A). Sin embargo, en la CG, los individuos criados en cautiverio poseen un cuociente volumétrico que es significativamente mayor (cercano a 1, es decir, es menos heterogéneo) a aquel observado en los individuos capturados en terreno ( $U=9$   $Z=2,2$   $p=0,03$   $n_{\text{cau}}=8$   $n_{\text{cap}}=7$ ) (Fig. 26 B).

Por último, se realizó un experimento criando *O. degus* en condiciones de aislamiento social (aislados) desde el primer mes de vida. Al analizar la morfometría de los subdominios del BOA en la etapa adulta se observó que no hubo diferencias significativas tanto en el volumen total de los subdominios (Aislados:  $Z=1,6$   $p=0,1$   $n=3$ ) como en la CG (Aislados:  $Z=1,06$   $p=0,3$   $n=3$ ).

Tabla 8. Volúmenes correspondientes a los subdominios del BOA y a la CG de *Octodon degus* criados en condiciones de aislamiento social y capturados en el campo. <sup>a</sup>Volúmenes (promedio± error estándar) expresados en mm<sup>3</sup>.

	Volumen BOA			Volumen Capa Glomerular			n
	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	
<b>Aislados</b>	0,496±0,08	0,421± 0,05	1,16	0,117± 0,01	0,097± 0,005	1,12	3
<b>Capturados</b>	0,586± 0,06	0,351± 0,03	1,67	0,094± 0,01	0,057± 0,005	1,63	6

Al comparar el cociente de los volúmenes obtenidos para los subdominios del BOA (pBOA/aBOA) y para la CG (CGpBOA/CGaBOA), entre los animales aislados y *O. degus* capturados en terreno se observó que en los animales aislados, el grado de heterogeneidad obtenido es significativamente menor en comparación a *O. degus* capturados (BOA: U=0 Z=2,39 p=0,02 n<sub>Aislados</sub>=3 n<sub>Cap</sub>=7; CG: U=0 Z=2,39 p=0,02 n<sub>Aislados</sub>=3 n<sub>Cap</sub>=7) (Fig. 30).

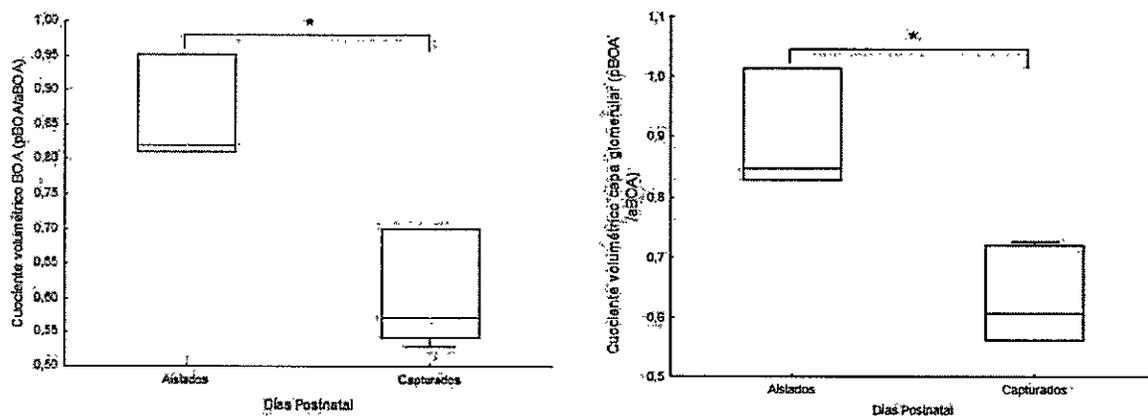


Figura 27. Cuociente volumétrico (pBOA/aBOA) correspondiente a A) subdominios del BOA y B) CG de *O. degus* adultos aislados y *O. degus* capturados en terreno. La grafica de boxplot muestra los dos percentiles centrales y la mediana. La barra muestra los valores mínimo y máximo. \*p<0,05, diferencias significativas entre ambos grupos, obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney.

## Resumen Objetivo 4

- La relación morfométrica entre los subdominios del BOA de *O. degus* exhibe marcadas diferencias entre individuos que se desarrollan en distintos contextos de crianza (criados en cautiverio y en terreno).

- Los individuos criados en condiciones de cautiverio poseen un grado de heterogeneidad volumétrica entre la CG de los subdominios del BOA que es significativamente menor al exhibido por los individuos criados en condiciones naturales.

- Los animales criados en condiciones de aislamiento social poseen un grado de heterogeneidad bajo entre los subdominios del BOA (siendo inexistente en uno de los casos), siendo significativamente menor al exhibido por los animales capturados en terreno.

## 5. Análisis de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA entre *O. degus* y *Octodon lunatus*.

Se realizó una comparación entre *O. degus* y el degú costino *Octodon lunatus*, un miembro de la familia Octodontidae y grupo hermano de *O. degus*. Esta especie se caracteriza por poseer un bajo grado de organización social (Sobrero et al. 2014) en comparación a *O. degus*. El BOA de *O. lunatus* está formado por dos subdominios, aBOA y pBOA, los que se distinguen por una hendidura presente en todas las capas (Fig. 28 A). El aBOA está formado exclusivamente por las proyecciones de las neuronas V1R, lo cual se visualizó realizando la inmunoreactividad con anti-G $\alpha_{i2}$  (Fig. 28 B). Al realizar la inmunoreactividad con anti-OMP, se observó que el aBOA posee una intensidad de marca mayor que el pBOA, tanto en la CNV como en la CG (Fig. 28 C).

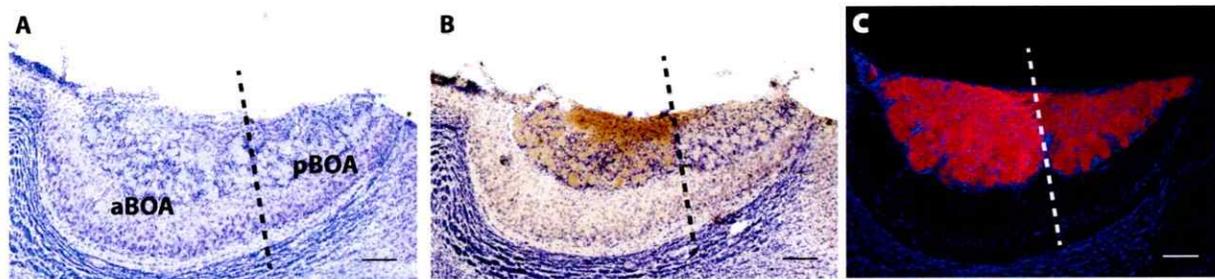


Figura 28. Caracterización del BOA de *O. lunatus*. Secciones sagitales del bulbo olfatorio. A) La imagen muestra que el BOA posee los subdominios aBOA y pBOA. Las secciones fueron teñidas con cresil-violeta. B) Inmunoreactividad usando anti-G $\alpha_{i2}$ . Las secciones fueron contrateñidas con cresil-violeta C) Inmunoreactividad con OMP. Las secciones fueron contrateñidas con DAPI. Barra 200  $\mu$ m.

Tabla 9. Volúmenes correspondientes a los subdominios del BOA y a la CG de *O. lunatus* y *O. degus* capturados en terreno. <sup>a</sup>Volúmenes (promedio± error estándar) expresados en mm<sup>3</sup>.

	Volumen BOA			Volumen Capa Glomerular			n
	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	aBOA <sup>a</sup>	pBOA <sup>a</sup>	aBOA/pBOA	
<i>O. lunatus</i>	0,689± 0,04	0,507± 0,03	1,35	0,069± 0,008	0,064± 0,007	1,08	5
<i>O. degus</i>	0,586± 0,06	0,351± 0,03	1,67	0,094± 0,01	0,057± 0,005	1,63	6

Al analizar la morfometría de los subdominios del BOA en *O. lunatus*, se observó una diferencia significativa en el volumen total entre los subdominios aBOA y pBOA ( $Z=2,02$ ;  $p=0,04$   $n=5$ ) (Tabla 8, Fig. 29 A). Sin embargo el volumen de la CG no presentó diferencias significativas entre el aBOA y el pBOA ( $Z=1,21$ ;  $p=0,2$   $n=5$ ) (Tabla 8, Fig. 29 B). Este último resultado contrasta con lo observado en *O. degus* capturados en terreno en que la CG del aBOA fue un 63% mayor que la CG del pBOA. Al comparar el volumen total de los subdominios del BOA por separado entre ambas especies se observó que no hubo diferencias significativas en ninguno de ellos. Sin embargo, en la CG, tanto el aBOA como el pBOA mostraron diferencias significativas al comparar ambas especies (aBOA:  $U=1$   $Z=-2,55$   $p=0,01$   $n_{lun}=5$   $n_{deg}=6$ ; pBOA:  $U=1$   $Z=-2,55$   $p=0,01$   $n_{lun}=5$   $n_{deg}=6$ ).

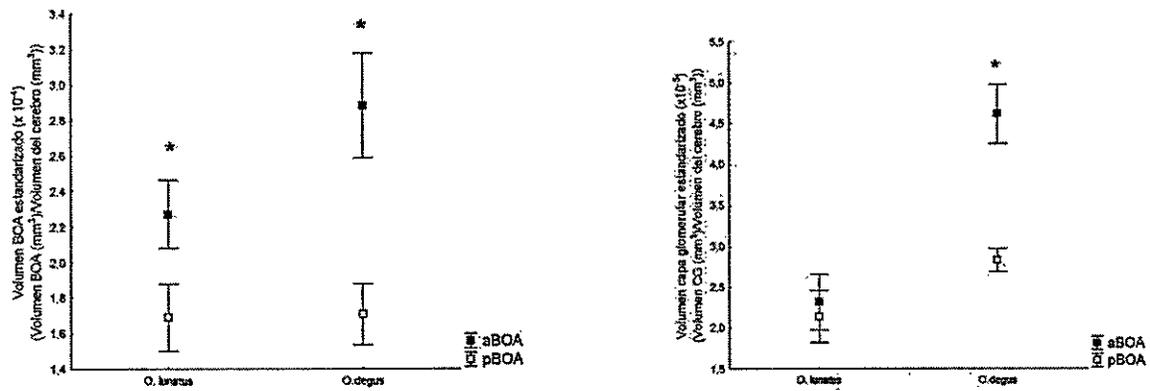


Figura 29. Volúmenes correspondientes a A) subdominios del BOA y B) CG, de *O. lunatus* adultos y *O. degus* adultos capturados en terreno. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar, expresados en mm<sup>3</sup>. Los datos fueron estandarizados por el volumen del cerebro para cada individuo. \* $p < 0,05$ , diferencias significativas entre aBOA y pBOA para cada caso, obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon.

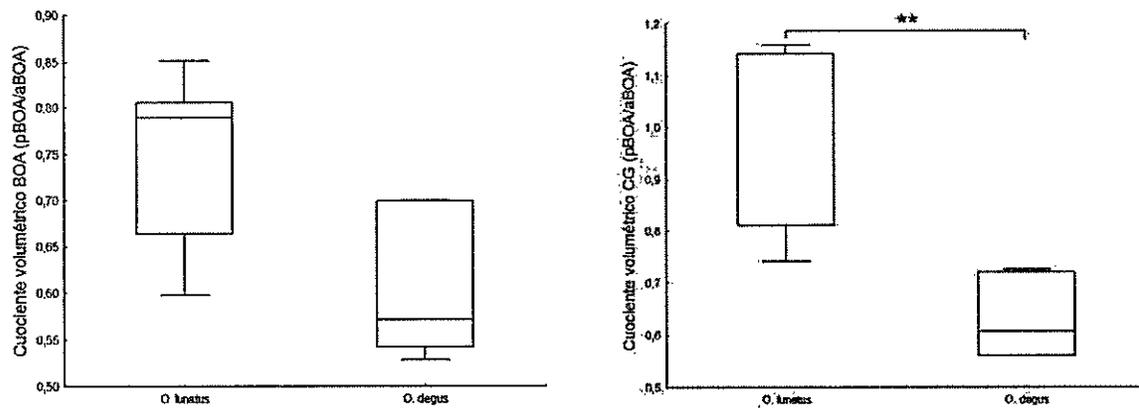


Figura 30. Cuociente volumétrico (pBOA/aBOA) correspondiente a A) subdominios del BOA y B) CG de *O. lunatus* y *O. degus*. La grafica de boxplot muestra los dos percentiles centrales y la mediana. La barra muestra los valores mínimo y máximo. \* $p < 0,05$ , diferencias significativas entre ambos grupos, obtenidas mediante la prueba de Mann-Whitney.

Por último, se analizó la relación morfométrica de las estructuras que componen al BOA, comparando el cuociente de los volúmenes obtenidos para los subdominios del BOA (pBOA/aBOA) y para la CG (CGpBOA/CGaBOA), entre los individuos adultos de *O. lunatus* y *O. degus* capturados en terreno (Fig. 30). No se observaron diferencias significativas al comparar el cuociente volumétrico de los subdominios del BOA, entre las distintas especies ( $U=6$   $Z=1,87$   $p=0,06$   $n_{lun}=5$   $n_{deg}=7$ ) (Fig. 30 A). Sin embargo, en la CG, *O. lunatus* posee un cuociente volumétrico que es significativamente mayor (cercano a 1, es decir, es menos heterogéneo) a aquel observado en *O. degus* ( $U=0,00$   $Z=2,84$   $p=0,004$   $n_{lun}=5$   $n_{deg}=7$ , Fig. 30 B).

## Resumen Objetivo 5

- En *O. lunatus* una especie hermana que posee un grado de socialidad menor al exhibido por *O. degus*, el BOA no presenta una heterogeneidad volumétrica entre la CG de los subdominios del BOA.

## DISCUSIÓN GENERAL

### 1. Anatomía y morfometría del SVN en el desarrollo de *O. degus*.

#### 1.1. Desarrollo anatómico del OVN y del BOA en las etapas tempranas del desarrollo: Especies precociales vs altriciales.

En *O. degus* se observó que tanto el OVN como el BOA están presentes desde las etapas prenatales, y las vías vomeronasales V1R y V2R se encuentran segregadas anatómicamente en dichas etapas. En E80, las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales presentan una identidad glutamatérgica (vGLUT-2+), lo que sugiere la existencia de actividad sináptica mediada por glutamato durante las etapas prenatales, un rasgo similar al observado a las etapas postnatales. Sin embargo, tanto en E80 como en P1, el SVN presenta un carácter inmaduro desde un punto de vista anatómico. En ambas etapas hubo una baja inserción de interneuronas yuxtglomerulares en la CG, cuya presencia es necesaria para el procesamiento local de la actividad del BOA. Junto con ello, las neuronas mitrales/tufted mostraron un patrón de marcaje distinto a lo observado en la etapa adulta; esto último sugiere la existencia de diferencias en la expresión de elementos asociados a ácidos nucleicos entre dichas etapas y la etapa adulta. Por último, en E80 sólo un pequeño grupo de neuronas vomeronasales presentaron una marca OMP+. Aquellas neuronas que no presentaron marca serían aquellas que aún no han alcanzado un grado mayor de diferenciación celular, mostrando que el SVN es inmaduro en esta etapa. En P1 la marca OMP+ es homogénea en todo el epitelio sensorial del OVN, dando cuenta que las neuronas

vomeronasales son células diferenciadas durante dicha etapa. Sin embargo, al analizar las etapas posteriores se observó que el SVN alcanza un mayor grado de maduración anatómica alrededor de P15. Esto debido a que en dicha etapa hubo i) una mayor inserción de interneuronas en la CG rodeando a los glomérulos, ii) la presencia de células mitrales/tufted con una patrón de marcaje de cresil-violeta similar al observado en la etapa adulta (perikarion+ dendritas) y iii) un patrón de expresión de OMP similar a la etapa adulta, con las neuronas apicales del OVN exhibiendo un mayor nivel de expresión de OMP que las neuronas basales.

La diferencia en la expresión de OMP entre las neuronas vomeronasales apicales y basales fue descrita previamente en un marsupial, la zarigüeya *Monodelphis domestica* (Shapiro et al., 1997). Durante el primer mes de vida (P30) *M.domestica* presenta una intensidad de marca OMP+ homogénea entre ambas poblaciones de neuronas vomeronasales. Sin embargo en P60, las neuronas apicales presentan una mayor expresión de OMP que las neuronas basales. Los autores destacan dos eventos que podrían estar asociados a la diferencia observada entre ambas poblaciones: i) El surgimiento de la heterogeneidad en la expresión de OMP se produce cercano al momento del destete de las crías (P60) y ii) Los niveles de estrógenos son altos en el primer mes de vida (P30), tanto en machos como en hembras y decrecen en P60, a niveles similares a los observados en la etapa adulta. Los autores sugieren que los estrógenos podrían estar actuando como morfógenos durante dicha etapa, regulando los niveles de expresión de OMP de forma diferencial entre las neuronas V1R y V2R. Las crías de *O. degus* utilizadas en este trabajo estuvieron en contacto con la madre solo durante el primer mes de vida, período en el cual surge la heterogeneidad en la expresión de OMP, alrededor de P15. No se pudo determinar el momento en el que se produjo el destete durante este tiempo. A partir de la literatura se

conoce que las crías de *O. degus* son amamantadas durante el transcurso del primer mes de vida en cautiverio, período en el que comienzan a consumir alimento sólido en paralelo. Por lo tanto, en *O. degus*, resulta interesante conocer en detalle los eventos conductuales que podrían estar asociados a la heterogeneidad en la expresión de OMP entre las vías V1R y V2R (ej. tiempo de destete), junto con los cambios ocurridos a nivel fisiológico que dichos eventos podrían desencadenar (ej. cambios en los niveles de hormonas claves en el desarrollo del SVN).

Por último, el curso temporal del desarrollo del SVN de *O. degus*, siendo este una especie precocial, contrasta con aquello descrito en otras especies de mamíferos precociales, como los cerdos y las cabras (Salazar et al, 2003b y 2004., Smith et al., 2007). En dichas especies se reportó que el SVN presenta un alto grado de madurez anatómico desde las etapas prenatales. A partir de los resultados los autores han sugerido un posible rol funcional del SVN en dichas etapas. Por el contrario, en *O. degus* sólo hubo un grado de maduración anatómica similar al observado en la etapa adulta (P>180) durante las etapas postnatales tempranas, alrededor de P15. Los resultados muestran que el SVN de *O. degus* posee un curso temporal de maduración que se asemeja mayormente a lo descrito en las especies altriciales descritas, como los ratones y las ratas (Salazar et al., 2003<sup>a</sup> y 2006).

### *1.2. Maduración anatómica del SVN de O. degus. ¿En qué momento el SVN es funcional?*

La importancia de establecer el curso temporal de la maduración del SVN radica en conocer el momento del desarrollo en que dicho sistema poseería un carácter funcional. Para ello es importante tener presente que general, la actividad neuronal en respuesta a un

estímulo puede estar asociada a distintos fenómenos: Por una lado, al desarrollo anatómico y al establecimiento de la conectividad neuronal (actividad intrínseca) y por otro, a la generación de cambios en el estado fisiológico y/o conductual de un organismo (experiencia sensorial) (Katz, 1996). Como un ejemplo, en estudios del sistema visual en primates, se observó que la formación de las columnas de dominancia ocular (grupo de células definidas fisiológicamente que responden preferencialmente a uno de los ojos y que forman un patrón de bandas alternadas en la capa IV de la corteza) depende en principio de la actividad neuronal intrínseca que son burts de potenciales de acción espontáneos, presentes desde las etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, el establecimiento y refinamiento posterior de las columnas es dependiente de la experiencia sensorial. Por ejemplo, en experimentos de privación monocular en individuos de 14 días postnatal durante 1 1/2 año se observó que las bandas pertenecientes al ojo privado disminuyen de tamaño y que las pertenecientes al ojo no privado aumentan de tamaño (Hubel et.al; 1977).

En el caso del SVN, las estructuras que lo conforman (OVN y BOA) maduran tanto anatómica como electrofisiológicamente en las etapas postnatales. En el caso de los ratones, se observó que las feromonas tiene acceso al OVN desde P1, pudiendo activar a las neuronas vomeronasales (Hovis et al., 2012). La actividad neuronal generada tiene un efecto en el remodelamiento de las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales y del árbol dendrítico de las neuronas de proyección secundaria (mitrales/tufted). Los autores argumentan que, aunque la actividad temprana es relevante en el desarrollo de la conectividad del SVN, no estaría necesariamente relacionada a cambios a nivel conductual. En otro estudio realizado en ratas, se reportó que el BOA

alcanza un alto grado de madurez tanto anatómico como electrofisiológico durante el período postnatal “tardío” (posterior a P15). Se observó que desde P18, el curso temporal del potencial de campo registrado en las distintas capas del BOA fue similar al observado en la etapa adulta. A partir de estos resultados, los autores sugieren que el BOA alcanzaría la madurez electrofisiológica en P18 (Sugai et al., 2005). Además, en dicha etapa hubo un cambio drástico en el volumen del BOA; entre P1 y P18 hubo un aumento del tamaño (600%) del volumen del BOA seguido por una disminución del tamaño, llegando a ser un 66% de su valor máximo en la etapa adulta (P60) (Rosselli-Austin et al., 1987). La reducción volumétrica del BOA ha sido interpretada como una consecuencia de un “sobrecrecimiento transiente” previo. Esto se traduciría en un aumento del tamaño y número de las neuronas y de sus procesos dendríticos y/o axonales durante la sinaptogénesis y un posterior remodelamiento. Por último, ambos trabajos sugieren que los cambios descritos en el BOA podrían dar cuenta del momento en que el SVN alcanzaría un carácter funcional, siendo un sistema cuya activación desencadenaría cambios a nivel fisiológico y conductual.

En *O. degus* hubo un aumento del tamaño de la CG de ambos subdominios del BOA entre P1 y P30. Posteriormente, se observó una disminución del tamaño entre P30 y P60. Al comparar con los resultados obtenidos en las ratas, sugerimos que el BOA de *O. degus* podría alcanzar la madurez electrofisiológica alrededor de P30. Debido al muestreo realizado, no se pudo conocer con mayor precisión la etapa en que comienza la disminución del volumen de las estructuras del BOA, pudiendo ser previo o posterior a P30. Sin embargo, el alto grado de maduración anatómica del SVN observado desde P15 sugiere que el BOA podría ser una estructura madura, tanto anatómica como

fisiológicamente, previo a P30.

1.3. *Surgimiento de la heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA y su relación con la maduración anatómica del SVN.*

La importancia de establecer el momento en que el SVN madura tanto anatómica como electrofisiológicamente en *O. degus*, radica en conocer si la operación del SVN como un sistema quimiosensorial funcional podría participar en la formación de la heterogeneidad morfométrica del BOA. En este trabajo se observó que i) al medir el volumen de los subdominios del BOA (que comprende la CNV, CG, CPE y CM/T), existe un sesgo hacia aBOA, desde P15. En cambio, al medir el volumen de la CG de ambos subdominios, se observó dicho sesgo a partir de P30, ii) el grado de heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA aumenta en las etapas posteriores a la aparición del sesgo hacia el aBOA, tanto en el volumen de los subdominios como en la CG iii) el valor promedio máximo de la heterogeneidad entre los subdominios del BOA se establece cercano a la etapa adulta (P150). Sin embargo, existe un alto grado de heterogeneidad desde P60.

Los resultados obtenidos muestran que en *O. degus*, la heterogeneidad con un sesgo hacia un mayor tamaño de las estructuras que componen el aBOA surge durante las etapas postnatales. El grado de dicha heterogeneidad aumenta en las etapas posteriores a la aparición de un sesgo volumétrico hacia aBOA (P15-P30), alcanzando un valor máximo sólo en P150. El curso temporal del desarrollo del BOA observado en *O. degus* sugiere que el establecimiento de la heterogeneidad entre los subdominios del BOA podría estar asociado a la participación del SVN como un sistema quimiosensorial activo. Esto debido a

que el sesgo volumétrico surge y se establece en aquel momento en que el SVN presenta un alto grado de maduración anatómico. Los resultados sugieren que los cambios anatómicos observados durante el establecimiento de la heterogeneidad morfométrica del BOA podrían estar influenciados por la experiencia sensorial.

## **2. La plasticidad del BOA observada durante el desarrollo postnatal estaría relacionada principalmente al remodelamiento de la capa glomerular (CG).**

Una de las estructuras que presentó claras diferencias entre los subdominios del BOA durante las etapas postnatales tardías fue la CG. Los glomérulos presentes en dicha capa están formados principalmente por las proyecciones de las neuronas vomeronasales y las arborizaciones dendríticas de las neuronas mitrales /tufted. La heterogeneidad volumétrica observada en la CG de *O. degus* adultos (CGaBOA 34% mayor que CGpBOA) podría explicarse en principio por i) una diferencia en el número de neuronas que conforman a la CG de cada uno de los subdominios del BOA ó ii) una diferencia en el tamaño de las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales entre ambos subdominios, no habiendo diferencias en el número de proyecciones recepcionadas en ambos subdominios. Los resultados preliminares obtenidos en la etapa adulta ( $P > 180$ ) mostraron que la heterogeneidad morfométrica estaría explicada, en principio, por una mayor representación de las neuronas V1R (Gi2+) en el OVN (40% mayor que V2R,  $n=2$ ) y a la vez, por un mayor número de neuronas mitrales/tufted presentes en el subdominio aBOA (100% mayor que en pBOA,  $n=2$ ). Sin embargo, al analizar el OVN de individuos de P15, se observó que las neuronas V1R, al igual que en la etapa adulta, están mayormente representadas en el OVN (40%,  $n=2$ ) que las neuronas V2R. Junto con ello, en trabajos

realizados en el laboratorio, se observó que en P15 las neuronas mitrales/tufted presentes en el aBOA son más numerosas (69% n=5) que en el pBOA (datos no presentados). Ambos resultados contrastan con lo observado en el volumen de la CG en P15, ya que dicha capa no presenta diferencias volumétricas entre los subdominios aBOA y pBOA. Por lo tanto en las etapas postnatales tardías, junto con haber un aumento en la representación de ambas poblaciones de neuronas vomeronasales y de las células mitrales/tufted de ambos subdominios del BOA, ocurriría a la vez un proceso de transformación local en la CG, que resulta en un mayor aumento de la CG del aBOA.

## **2. El contexto de crianza ejercería un efecto sobre la formación de la heterogeneidad entre los subdominios del BOA.**

### *3.1 Plasticidad ontogenética en relación al contexto de crianza: Comparación entre O. degus criados en cautiverio v.s O. degus criados en estado natural.*

Al analizar la volumetría del BOA en los individuos utilizados en la caracterización ontogenética del BOA, se observó que desde la etapa P60 hubo una alta variabilidad en el grado de heterogeneidad entre los subdominios aBOA y pBOA, en particular asociado a la CG. De forma interesante, junto con haber individuos que poseen un alto grado de heterogeneidad en la CG (volumen de la CG-aBOA siendo >50% que la CG-pBOA) se encontraron individuos en que el volumen de la CG del aBOA fue solo un 6% mayor que en el pBOA. Ya que los individuos analizados corresponden a animales criados en condiciones particulares (animales nacidos y criados en condiciones de cautiverio), nos propusimos comparar la heterogeneidad resultante, en la etapa adulta, entre estos

individuos y aquellos criados un contexto distinto (animales criados en un contexto natural); ésto bajo el supuesto de que los individuos que presentan diferencias en el contexto de crianza durante la ontogenia postnatal, podrían mostrar diferencias en el grado de heterogeneidad observado entre los subdominios del BOA. En este trabajo, los individuos que nacieron en cautiverio fueron criados junto con la madre durante el primer mes de vida. Posteriormente permanecieron en grupos conformados solamente por hermanos consanguíneos. En cambio, los animales capturados en terreno nacen en un contexto social y ecológico distinto. Según lo descrito en la literatura, las crías nacen en madrigueras y son criadas en comunidades conformadas por un macho dominante y un grupo de 2 a 5 hembras, las cuales los amamantan durante el primer mes de vida. Otros fenómenos como la dispersión de los machos al mes de nacer y la formación de grupos reproductivos son aspectos del modo de vida que solo son observados en un contexto natural. Por lo tanto, se sugiere que los animales criados en cautiverio poseen un grado de socialidad (en relación a la diversidad y al tipo de interacciones sociales experimentadas por los organismos) que es menor a los animales criados en terreno. En este trabajo se observó que los animales capturados poseen un grado de heterogeneidad en la CG que es mayor que los individuos nacidos en cautiverio, no así en el volumen de los subdominios del BOA. Este resultado muestra, en una primera instancia, que existen diferencias en el grado de heterogeneidad entre los subdominios del BOA, en particular en la CG, al comparar individuos de distintos contextos de crianza. Nosotros sugerimos que la diferencias en el hábito social y ecológico entre ambos grupos podrían estar ejerciendo un rol en el establecimiento de las diferencias morfométricas observadas entre los subdominios del BOA. Un experimento que podría validar dicha hipótesis es comparar entre individuos criados en contextos sociales contrastantes (animales criados en

aislamiento social vs animales criados en un contexto social enriquecido). Como una primera aproximación, se realizó un experimento criando *O. degus* en condiciones de aislamiento social desde el primer mes de vida. En la etapa adulta ( $P > 180$ ) el grado de heterogeneidad obtenido es significativamente menor en comparación a *O. degus* capturados en terreno. En dos de los animales analizados el aBOA fue solo un 20% mayor que el pBOA, y en uno de ellos el pBOA fue un 1% mayor que el aBOA. Los resultados obtenidos concuerdan con la hipótesis planteada. Sin embargo, para validar dicho resultado es necesario aumentar el número de muestras de los individuos en condiciones de aislamiento social, junto con comparar con animales criados en un contexto social controlado.

### 3.2. *Plasticidad filogenética en relación al hábito social contrastante: Comparación entre O. degus y O. lunatus.*

En esta tesis utilizamos una segunda aproximación a la hipótesis del rol del contexto de crianza en el establecimiento de la heterogeneidad del BOA. Para ello se comparó la morfometría de los subdominios del BOA de *O. degus* criados en condiciones naturales con lo observado en *O. lunatus*, una especie hermana cuyos individuos adultos se caracterizan por presentar un bajo grado de socialidad en comparación a *O. degus* (Sobrero et al., 2014). *O. lunatus* no forma madrigueras ni agrupamientos comunales. Sin embargo, se ha observado que tanto los machos como las hembras de esta especie comparten sitios de descanso durante el día y existe un solapamiento en sus ámbitos de hogar, lo que refleja un cierto grado de socialidad. Al analizar la relación morfométrica entre las estructuras que componen a los subdominios del BOA, se observó que en *O. lunatus* la CG no presenta

diferencias significativas entre los subdominios aBOA y pBOA. Esto debido a que no existe un sesgo volumétrico asociado a uno de los subdominios. Por último, no hubo una diferencia significativa en el volumen total del aBOA y del pBOA, al comparar el cociente volumétrico entre ambas especies. Al comparar estos resultados con aquellos obtenidos en la aproximación comparada entre *O. degus* de distintos contextos de crianza, se sugiere fuertemente que el hábito social tendría una influencia sobre la relación morfométrica entre los subdominios del BOA, en particular en la CG, y la consecuente formación de un sesgo volumétrico asociado a uno de ellos.

## CONCLUSIONES

- En *O. degus*, las vías vomeronasales presentan un carácter heterogéneo en etapas tempranas del desarrollo postnatal, como en la representación de las neuronas vomeronasales que proyectan al BOA (V1R>V2R).
- El sesgo volumétrico hacia un mayor tamaño del aBOA (volumen total del subdominio y CG) surge durante las etapas postnatales, momento en el que las estructuras del sistema vomeronasal (OVN y BOA) presentan un alto grado de madurez anatómico.
- La diferencia volumétrica entre ambos subdominios aumenta a medida que transcurre el desarrollo, alcanzando un valor promedio máximo sólo en P150. Tanto el aBOA como el pBOA mostraron diferencias de volumen entre las etapas estudiadas, en particular entre P15 y P60.
- Las neuronas vomeronasales V1R están mayormente representadas que las neuronas V2R en el OVN, aún en aquellas etapas en que no existen diferencias en el volumen de la CG entre los subdominios aBOA y pBOA (P15). Los resultados sugieren que la formación de la heterogeneidad volumétrica en las etapas posteriores del desarrollo (CGaBOA>CGpBOA) sería dependiente de un proceso que ocurre a nivel local en el BOA.

- La relación morfométrica entre los subdominios del BOA posee un carácter plástico en la ontogenia de *O. degus*, en particular en la CG, exhibiendo marcadas diferencias entre individuos que se desarrollan en distintos contextos de crianza.
  - i) Individuos criados en condiciones de cautiverio presentan una heterogeneidad reducida en la CG entre ambos subdominios del BOA, en comparación a animales criados en terreno.
  - ii) Individuos criados en condiciones de aislamiento social no presentan diferencias significativas en la CG entre ambos subdominios del BOA, no habiendo heterogeneidad.
  - iii) En *O. lunatus* una especie hermana que posee un grado de socialidad menor que en *O. degus*, el BOA no presenta diferencias significativas en la CG entre ambos subdominios del BOA, no habiendo heterogeneidad.
  
- Los resultados sugieren que la experiencia relacionada al contexto de crianza y en particular a las interacciones de tipo social poseen un rol determinante en el establecimiento de la relación morfométrica entre los subdominios del BOA.

## REFLEXIONES FINALES

Las observaciones principales de esta tesis pueden resumirse en que i) la heterogeneidad morfométrica entre los subdominios del BOA de *O. degus* adultos se establece en las etapas postnatales y ii) el grado de heterogeneidad adquirido sería dependiente de aspectos del vivir, como el contexto de crianza. Estas observaciones permiten esbozar posibles respuestas a algunas de las preguntas que inspiraron esta tesis.

*¿Qué caracteriza a la heterogeneidad morfométrica observada entre los subdominios aBOA y pBOA?* En *O. degus* las vías vomeronasales V1R y V2R presentan una heterogeneidad morfométrica desde las etapas tempranas del desarrollo postnatal. En P15, las neuronas vomeronasales V1R están mayormente representadas que las neuronas V2R y además las neuronas de proyección secundaria (mitrales/tufted) son más numerosas en el aBOA que en el pBOA. Aquella heterogeneidad persiste en las etapas posteriores del desarrollo postnatal, siendo observada aún en la etapa adulta. Sin embargo, esto no ocurre en la CG; en P15 el volumen de la CG no presentó diferencias significativas entre los subdominios del BOA. Esto indica que la presencia de un mayor número de neuronas V1R proyectando hacia el aBOA no se traduce necesariamente en un mayor tamaño de la CG del aBOA en dicha etapa

*¿Cómo es posible que la CG cambie durante el desarrollo postnatal tardío?* En los mamíferos el OVN se caracteriza por presentar una neurogénesis continua en las etapas postnatales, habiendo muerte e incorporación de nuevas neuronas durante gran parte de la vida de un individuo. Dicho fenómeno podría dar lugar al aumento del número de neuronas vomeronasales que aferentan la CG de ambos subdominios durante el desarrollo postnatal.

Sin embargo, como dijimos anteriormente, la existencia de un mayor número de neuronas asociadas a una de las vías vomeronasales no se traduce necesariamente en un mayor tamaño de su neuropila. Existen al menos dos posibles explicaciones que darían cuenta de las diferencias observadas en la CG entre ambos subdominios del BOA.

i) En P15 existirían diferencias en la densidad de arborizaciones terminales que residen en la CG de ambos subdominios, siendo mayor en aBOA que en pBOA, no habiendo diferencias en el volumen de la CG entre ambos subdominios. Posteriormente, el aumento de tamaño observado en la CG del aBOA podría deberse a que dicha neuropila comienza a abarcar un volumen mayor que aquel observado en el pBOA. Esto último se sustenta en que en P15 existen regiones puntuales de la CG del aBOA que presentan una marca más intensa de vGLUT-2, indicando posiblemente una mayor densidad de terminaciones sinápticas.

ii) Desde P15 en adelante las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales VIR podrían sufrir modificaciones en su tamaño, resultando finalmente en un tamaño mayor de la CG del aBOA. En trabajos previos se observó que al realizar una estimulación prolongada con una feromona en ratones recién nacidos, las neuronas vomeronasales que expresan un tipo particular de receptor (V2r1b) experimentan un aumento en el tamaño y un retraso en el tiempo de coalescencia en sus arborizaciones terminales, cuando éstas arriban al BOA (Hovis et al., 2012). **Por lo tanto, las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales presentan un carácter plástico durante el tiempo en que sus axones inervan la CG.** En particular, se sugiere que dichos cambios estarían asociados a aquellas neuronas que se incorporan nuevamente

al OVN y no a un aumento de la arborización terminal de una neurona preexistente. Junto con ello, se observó que las arborizaciones dendríticas de las neuronas mitrales/tufted forman contactos sinápticos después de que las arborizaciones terminales de las neuronas vomeronasales coalescen y forman parte de un glomérulo. Dicho fenómeno ocurre durante la etapa postnatal temprana en ratones, persistiendo aún en P30. Los resultados de aquel trabajo muestran que la CG del BOA experimenta cambios estructurales durante las etapas tempranas del desarrollo postnatal, en relación a la morfología de las arborizaciones que forman contactos sinápticos en dicha capa.

Ambas posibles explicaciones podrían dar cuenta del mayor aumento de la CG del aBOA en *O. degus* durante el desarrollo postnatal. En particular, la segunda propuesta resulta interesante ya que relaciona los cambios ocurridos en la CG con la actividad neuronal asociada a la recepción de estímulos feromonales. Es posible que en *O. degus*, el aumento exhibido por la CG del aBOA esté asociado a una mayor exposición a aquellos estímulos recepcionados por las neuronas V1R durante el desarrollo postnatal. Se ha sugerido que en *O. degus*, tanto el hábitat como parte de los repertorios asociados a las conductas reproductivas y agonistas se asocian con el uso preferencial de estímulos volátiles, los que son recepcionados de forma preferencial por las neuronas V1R (Suárez & Mpodozis, 2009). El desarrollo en torno a dichas conductas podría ejercer un efecto sobre la formación del BOA, habiendo un sesgo hacia la mayor actividad de la vía V1R, lo que explicaría el sesgo volumétrico hacia aBOA. Sin embargo, aún es necesario conocer con más detalle los posibles cambios en la morfología de las arborizaciones que inervan la CG y el curso temporal de dichas transformaciones.

*¿Cómo se asocia el contexto de crianza a la formación de la heterogeneidad morfométrica del BOA?* Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la formación de un sesgo morfométrico hacia un mayor tamaño de la CG del aBOA se asocia al ámbito social en el que los individuos se desarrollan. Por un lado, *O. degus* criados en un ámbito social enriquecido (es decir, en que las interacciones entre individuos son variadas), como el caso de los individuos criados en el entorno natural, se asocian a la presencia de una CG altamente heterogénea (aBOA>pBOA). Por otro lado, en aquellos individuos que se criaron en un ambiente social menos enriquecido (individuos criados en condiciones de cautiverio), la diferencia en el volumen de la CG entre ambos subdominios fue significativamente menor. Esto último se asemeja a lo observado en individuos criados en condiciones de aislamiento social. Junto con ello observamos que en una especie hermana de *O. degus*, que presenta un bajo grado de socialidad, no existen diferencias significativas en el tamaño de la CG entre los subdominios aBOA y pBOA. En relación a esto último, resultaría interesante poder seguir analizando el estado del carácter (es decir, la relación morfométrica entre aBOA y pBOA) a nivel filogenético, entre especies que exhiben distintos grados de socialidad. En particular, los miembros de la familia Octodontidae exhiben diversos modos de vida en relación al ámbito social, habiendo especies que presentan un alto grado de socialidad (*O. degus*, *O. bridgesi*), un bajo grado de socialidad (*O. lunatus*) y de modo de vida solitario (*Tympanoctomys barrerae*). Por lo tanto, este grupo representa una excelente oportunidad para conocer como dicho carácter varía dentro de un grupo filogenético acotado y su relación a los aspectos relacionados al ámbito social.

Por último, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren fuertemente que en *O. degus* la formación de una especialización en la CG del BOA con un sesgo hacia un mayor

tamaño del aBOA, estaría asociado al desarrollo de los individuos en un ámbito social enriquecido, propio de su vivir.

## REFERENCIAS

Boschat C., Pelofi C., Randin O., Roppolo D., Lascher C, Broillet M.C., Rodriguez I. (2002). Pheromone detection mediated by a V1R vomeronasal receptor. *Nature Neurosciences*, **5**,1261–1262.

Brennan P., Keverne E. (2004). Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Current Biology*, **14**, 81-89.

Broad K., Keverne E. (2011). The Post-Natal Chemosensory Environment Induces Epigenetic Changes in Vomeronasal Receptor Gene Expression and a Bias in Olfactory Preference. *Behavior&Genetics*. DOI 10.1007/s10519-011-9523-9.

Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., and Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, **450**, 899–902.

Delgado S., Fernández-Aburto P., Mpodozis J. (2013). Heterogeneous distribution of mitral/tufted cells of the accessory olfactory bulb in *O. degus* (Rodentia: Hystricognathi). IX Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Neurociencias, Panel.

Ebensperger L. (2000). Dustbathing and intra-sexual communication of social degus, *Octodon degus* (rodentia: Octodontidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, **73**, 359–65.

Ebensperger L., Caiozzi A. (2002). Male degus, *Octodon degus*, modify their dustbathing behavior in response to social familiarity of previous dustbathing marks. *Revista Chilena de Historia Natural*, **75**, 157–63.

Francia S., Silvotti L., Ghirardi F., Catzefflis F., Percudanni R., Tirindelli R. (2014). Evolution of spatially coexpressed families of type-2 vomeronasal receptors in rodents. *Genome Biology and Evolution*, **7**, 272-285.

Hovis K., Ramnath R. Dahlen J., Romanova A., LaRocca G., Bier M., Urban N. (2012). Activity regulate functional connectivity from the vomeronasal organ to the accessory olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, **32**, 7907-7916.

Hubel D., Wiesel T.; Levay S. (1977). Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Phil. Trans. R. Soc. Ser*; **278**, 131-163.

Isogai Y., Si S., Pont-Lezica L., Tan T., Kapoor V., Murthy V.N., Dulac C. (2011) Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature*, **478**, 241–245

Katz L. and Shatz J. (1996). Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits. *Science*; **274**, 5290, 1133-1138.

Keller, M., Pierman, S., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J. (2006). The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *European Journal of Neuroscience*, **23**, 521–530.

<sup>a</sup>Kimoto H., Haga S., Sato K., Touhara K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, **437**, 898–901.

<sup>b</sup>Kimoto H., Touhara K. (2005). Induction of c-fos expression in mouse vomeronasal neurons by sex-specific non-volatile pheromone(s). *Chemical Senses*, **30**, 146–147.

Krieger J., Schmitt A., Lobel D., Gudermann T., Schultz G., Breer H., Boekhoff I. (1999). Selective activation of G protein subtypes in the vomeronasal organ upon stimulation with urine-derived compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 4655–4662.

Leinders-Zufall T., Brennan P., Widmayer P., Maul-Pavicic A., Jager M., Li X., Breer H., Zufall F., Boehm T. (2004). MHC class 1 peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science*, **306**, 1033–1037.

Leypold B., Yu C., Leinders-Zufall T., Kim M., Zufall F., Axel R. (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *PNAS*, **99**, 6376–6381.

Lucas P., Ukhanov K., Leinders-Zufall T., Zufall F. (2003). A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* **40**, 551–561.

Mann G. (1961). *Bulbus olfactorius accessorius* in Chiroptera. *Journal of Comparative Neurology*, **116**, 135–144.

Martínez-Marcos A., Halpern M. (1999). Differential centrifugal afferents to the anterior and posterior accessory olfactory bulb. *Neuroreport*, **10**, 2011–2015.

Meisami E., Bhatnagar K. (1998). Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique*, **43**, 476–499.

Mitsui S., Igarashi K., Mori K., Yoshihara Y. (2011). Genetic visualization of the secondary olfactory pathway in Tbx21 transgenic mice. *Neural Systems & Circuits*, **1**, 1-14.

Ngwenya A., Patzke N., Ihunwo A., Manger P. (2011). Organization and chemical neuroanatomy of the African elephant (*Loxodonta africana*) olfactory bulb. *Brain Structure and Function*; DOI: 10.1007/s00429-011-0316-y.

Rojas M., Montenegro M., Morales B. (1982). Embryonic development of the degu, *Octodon degus*. *Journals of Reproduction & Fertility*, **66**, 31-38.

Rosselli-Austin L, Hamilton K, Williams J (1987). Early postnatal development of the rat accessory olfactory bulb. *Developmental Brain Research*, **36**:304–308

<sup>a</sup>Salazar I., and Sánchez Quinteiro P. (2003). Differential development of binding sites for four lectins in the vomeronasal system of juvenile mouse: from the sensory transduction site to the first relay stage. *Brain Research*, **979**, 15–26.

<sup>b</sup>Salazar I., Lombardero M., Alemán N., and Sánchez-Quinteiro P. (2003). Development of the vomeronasal receptor epithelium and the accessory olfactory bulb in sheep. *Microscopy Research of Technology*, **61**, 438–447.

Salazar I., Sánchez-Quinteiro P., Lombardero M., Aleman N., and Fernández Trocóniz P. (2004). The prenatal maturity of the accessory olfactory bulb in pigs. *Chemical Senses*, **29**, 3–11.

Shapiro L., Roland R., Halpern M. (1997). Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Morphology*, **234**, 109-129.

Sobrero R., Ly Prieto A., Ebensperger L. (2014). Activity, overlap of ranges, and sharing of resting localities in the moon-toothed degu, *Octodon lunatus*. *Journal of Mammalogy*, **95**(1), 91-98.

Smith T., Alport L., Burrows A., Bhatnagar K., Dennis J., Tuladhar P., Morrison E. (2007). Perinatal size and maturation of the olfactory and vomeronasal neuroepithelia in lorisooids and lemuroids. *American Journal of Primatology*, **69**, 74–85.

Soto-Gamboa M., Villalon M., Bozinovic F. (2005). Social cues and hormone levels in male *Octodon degus* (Rodentia): a field test of the challenge hypothesis. *Hormone & Behavior*, **47**, 311–318.

<sup>a</sup>Suárez R., Mpodozis J. (2009). Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb (AOB) of *Octodon degus* (Rodentia: Hystricognathi). *Behavioral Brain Research*, **198**, 306–312.

<sup>b</sup>Suárez R., Villalón A., Künzle H., Mpodozis J. (2009). Transposition and Intermingling of *Galphai2* and *Galphao* afferences into single vomeronasal glomeruli in the Madagascan lesser Tenrec *Echinops telfairi*. *PLoS ONE*, **4**(11):e8005. doi: 10.1371/journal.pone.0008005.

<sup>a</sup>Suárez R., Santibáñez R., Parra D., Coppi A., Abrahao L., Sasahara T., Mpodozis J. (2011). Shared and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semiaquatic capibara. *Journal of Anatomy*, **218**(5), 558-565. doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01357.

<sup>b</sup>Suárez R., Fernández-Aburto P., Manger P., Mpodozis J. (2011). Deterioration of vomeronasal pathway in sexually dimorphic mammals. *PLoS ONE*, **6**(10):e26436. doi:10.1371/journal.pone.0026436.

Sugai T., Miyazawa T., Yoshimura H., Onoda N. (2005). Developmental changes in oscillatory responses of the rat accessory olfactory bulb. *Neuroscience*, **134**, 605-616.

Takigami S., Mori Y., Ichikawa M. (2000). Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chemical Senses*, **25**, 387–393.

Takigami S., Mori Y., Tanioka Y., Ichikawa M. (2004). Morphological evidence for two types of mammalian vomeronasal system. *Chemical Senses*, **29**, 301–310.

Vega-Zuniga T., Medina F., Fredes F., Zuniga C., Severín D., Palacios A., Karten H., Mpodozis J. (2013). Does nocturnality drive binocular vision? Octodontine rodents as a case study. *PLoS ONE*, **8**(12):e84199. doi: 10.1371/journal.pone.0084199.

Wekesa K., Anholt R. (1999). Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system. *Brain Research*, **837**, 117–126.

Young J., Massa H., Hsu L., Trask B. (2010). Extreme variability among mammalian V1R gene families. *Genome Research*, **20**, 10-18.

Young J., Trask B. (2007). V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends Genetics*, **23**, 212– 215.

Zhao H., Xu D., Zhang S., Zhang J. (2011). Widespread losses of vomeronasal signal Transduction in Bats. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 7–12.