

UCH-FC
Biotecnología
D 352
C.1



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Pregrado



**Estudio estereológico de la Capa Granular del Bulbo Olfatorio
Accesorio de *Octodon degus* durante el desarrollo.**

Seminario de Título para optar al grado de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Scarlett Elizabeth Delgado Gallardo

Director del seminario:
Dr. Jorge Mpodozis Marín

Noviembre, 2016
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACION SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata

SCARLETT ELIZABETH DELGADO GALLARDO

“ESTUDIO ESTEREOLÓGICO DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO ACCESORIO DE *OCTODON DEGUS* DURANTE EL DESARROLLO”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al Título Profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Jorge Mpodozis Marín

Director del Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Magdalena Sanhueza Toha

Presidenta de la Comisión

Dr. Juan Carlos Letelier Parga

Integrante



J. Sanhueza
Letelier

Santiago de Chile, noviembre de 2016

2.2. Biografía



(Chillán, Chile, 13 de diciembre de 1989 -)

Nacida en Chillán, crecida en Santiago de Chile, con marcados lazos en el sur del país, creció dedicada a sus estudios y hobbies. Multifacética, participó durante su juventud del Club de Artes Marciales *Kabbrasha* y la Orquesta de Violines de Peñalolén.

Participante de varias comunidades dedicadas a la difusión de elementos culturales del Japón, principalmente aquellas relacionadas a la Moda *Harajuku*, cuya participación ha estado marcada por la búsqueda de una mayor visibilización de estos estilos y un mejor entendimiento entre comunidades y al interior de éstas.

Durante sus estudios ha recibido diferentes reconocimientos de parte de instituciones educacionales, recibiendo el reconocimiento a la estudiante más destacada de su generación o “Tierra Palestina en oro” en la Escuela Palestina, diplomas por su desempeño artístico en el Colegio Antupirén y el reconocimiento a su labor de apoyo a la docencia en la Universidad de Chile como Tutora Integral Par.

Bachiller de corazón, eligió aprender sobre neurociencia durante la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular buscando desafíos y siguiendo su pasión por la investigación.

Aún se desconoce qué tan lejos la llevará su pasión y deseos por conocer más, solo se sabe que siempre seguirá a su corazón.

Dedicado a todos aquellos que han participado de mi vida...

2.4. Agradecimientos

Deseo agradecer a Pablo Lois por su ayuda durante la implementación de nuevas técnicas que fueron utilizadas y el refinamiento de otras ya conocidas. A Tatiana Guarnieri, quien me enseñó a utilizar las técnicas estereológicas para las descripciones citoarquitectónicas que ahora implemento. A Cristian Morales quien me ayudo a resolver las dudas sobre estadística que surgieron durante este trabajo. A todos los integrantes de "El Rayo" quienes siempre estaban para dar un consejo o apoyo cuando más se necesitaba y finalmente, pero no menos importante, a Dr. (c) Pedro Fernández y al Dr. Jorge Mpodozis por haberme aceptado bajo su tutela y haber participado de la parte más importante de mi formación, el poner en practica todo lo que una vez me enseñaron.

2.5. Índice de contenido:

2. Cuerpo preliminar.....	i
2.1 Portada.....	i
2.2 Biografía.....	ii
2.3 Dedicatoria.....	iii
2.4 Agradecimientos.....	iv
2.5 Índice de contenidos.....	v
2.6 Índice de tablas o cuadros.....	vi
2.7 Índice de figuras.....	vii
2.8 Lista de abreviaturas.....	viii
3. Introducción.....	1
3.1. Estructura del Bulbo Olfatorio Accesorio.....	1
3.2. Neurogénesis en el Sistema Olfatorio Accesorio.....	5
3.3. Caso particular, <i>Octodon degus</i>	7
3.4. Hipótesis y Objetivos:.....	10
4. Materiales y Métodos.....	11
4.1. Animales.....	11
4.2 Tinción de Cresil Violeta.....	11
4.3. Mediciones morfométricas.....	11
4.4. Análisis estadísticos.....	12
4.5. Edición de Imágenes.....	12
4.6. Otras metodologías utilizadas.....	13
5. Resultados.....	14
5.1. Volumen ocupado por las células.....	14
5.2. Densidad de Células.....	19
5.3. Número total de células.....	23
5.4. Comentarios de los resultados.....	27
6. Discusión.....	28
6.1. Capa de Células Granulares en contexto.....	28
6.2. Células Granulares en el Desarrollo.....	30
6.3. Análisis Estadísticos y el Número de Muestras.....	31
6.4. Células Mitral/ <i>tufted</i> y Granulares.....	32
6.5. Inyecciones de BrdU.....	34
7. Conclusión.....	37
8. Bibliografía.....	38
9. Anexos.....	46

2.6. Índice de tablas

Tabla 1.....	12
Tabla 2.....	15
Tabla 3.....	18
Tabla 4.....	20
Tabla 5.....	22
Tabla 6.....	26
Tabla 7.....	28

Anexos:

Tabla 1.....	46
Tabla 2.....	47
Tabla 3.....	48

2.7. Índice de figuras

Figura 1.....	2
Figura 2.....	4
Figura 3.....	8
Figura 4.....	15
Figura 5.....	17
Figura 6.....	19
Figura 7.....	21
Figura 8.....	23
Figura 9.....	25
Figura 10.....	29
Figura 11.....	31
Figura 12.....	33
 <u>Anexos:</u>	
Figura 1.....	48
Figura 2.....	49

1.8. Lista de abreviaturas

SOP: Sistema Olfatorio Principal

SOA: Sistema Olfatorio Accesorio

BO: Bulbo Olfatorio

BOA: Bulbo Olfatorio Accesorio

BOP: Bulbo Olfatorio Principal

OVN: Órgano Vomeronasal

aBOA: Región anterior del BOA

pBOA: Región posterior del BOA

aBOA/pBOA: Coeficiente de división entre los valores de aBOA y pBOA

CGr: Capa de células Granular

CMT: Capa de células Mitral/*tufted*

Gr: Célula Granular

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

RMS: *Rostral Migratory Stream*

P15: Estadio de 15 días postnatal

P30: Estadio de 30 días postnatal

P60: Estadio de 60 días postnatal

P150: Estadio de 150 días postnatal

P180: Estadio de adulto

C.E.: Coeficiente de error

GABA: Ácido γ -aminobutírico

V1R: Receptor Vomeronasal 1

V2R: Receptor Vomeronasal 2

RESUMEN

El fenómeno de neurogénesis adulta (NA) en mamíferos es un mecanismo de plasticidad cerebral ampliamente estudiado. En el Sistema Vomeronasal (SVN), un subsistema de tipo olfatorio asociado a la modulación de las conductas socio-sexuales, ocurre la integración de nuevas neuronas en el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA). Las nuevas neuronas, principalmente interneuronas de tipo Yuxtaglomerular y Granular (Gr) se insertan de manera funcional en el BOA afectando los procesos de aprendizaje y memoria asociados a la percepción de semioquímicos. El BOA recibe las proyecciones de dos poblaciones neuronales, las que divergen de acuerdo a la expresión diferencial de las proteínas G; estas poblaciones conectan al BOA, donde se constituyen dos subdominios segregados anatómicamente: anterior (aBOA) y posterior (pBOA). Algunos mamíferos exhiben diferencias morfométricas entre ambos subdominios del BOA, asociadas a distintos parámetros socio-ecológicos. En particular, el roedor caviomorfo *Octodon degus* exhibe un aBOA que posee el doble de volumen que el pBOA, junto con un mayor número de glomérulos y de neuronas de proyección secundaria, sin embargo, no se conoce si estas diferencias están presentes entre las interneuronas granulares asociadas a las células de proyección secundaria. En este trabajo se propone caracterizar, desde un punto de vista anatómico, parámetros morfométricos asociados a la Capa de Células Granulares de ambos subdominios del BOA de *O. degus*. Con este fin, se recurrió al uso de tinciones de cuerpos neuronales y métodos estereológicos de cuantificación. Los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticamente significativas en el volumen ocupado y número total de células Gr entre aBOA y pBOA para el estadio adulto, y la posible presencia de la misma en los estadios de P15, P30, P60 y P150. Lo anterior podría estar asociado a relación entre la actividad fisiológica y los procesos de memoria de este sistema.

ABSTRACT

The phenomenon of Adult Neurogenesis (AN) in mammals is a mechanism of brain plasticity widely studied. In the Vomeronasal System (VNS), an olfactory subsystem associated with the modulation of socio-sexual behaviours, occurs the integration of new neurons in the Accessory Olfactory Bulb (AOB). The new neurons, mainly Juxtglomerular and Granular (Gr) interneurons, are functionally inserted in the AOB affecting learning and memory processes associated with the perception of semiochemicals. The AOB receives projections from two neuronal populations, which differ according to the differential expression of G proteins; these populations connect differentially to two AOB subdomains that are anatomically segregated: anterior (aAOB) and posterior (pAOB). Some mammals exhibit morphometric differences between the two subdomains of the AOB, associated with different socio-ecological parameters. In particular, the caviomorph rodent *Octodon degus* exhibits an aAOB that has twice the volume of pAOB, along with a greater number of glomeruli and secondary projection neurons. However, it is not known whether these differences are present between the granular interneurons, which are associated with the secondary projection cells. In this work, we characterize, from an anatomical point of view, morphometric parameters associated with the Granule Cell Layer of the two subdomains of the AOB from *O. degus*. With this objective, we use staining for cell bodies and stereological quantification methods. The results show statistically significant differences at the volume and total number of granular cells between aAOB and pBOA in the adult stage and the possible presence of this heterogeneity in stages P15, P30, P60 and P150. This could be associated with the relationship between physiological activity and memory process of this system.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Estructura del Bulbo Olfatorio Accesorio

Dentro de la clase *Mammalia* la mayoría de las especies exhiben dos Subsistemas olfatorios, El Sistema Olfatorio Principal (SOP) y el Accesorio (SOA). El SOP está compuesto, en principio, de un epitelio sensorial (Epitelio Olfatorio) y de una región blanco en el telencéfalo (Bulbo Olfatorio Principal); de esta misma forma, el SOA se compone de un epitelio conocido como Órgano Vomeronasal (OVN) cuyo blanco es el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA) (Meisami y Bhatnagar, 1998). En particular, el Sistema Olfatorio Accesorio o Vomeronasal participa de la modulación de conductas sociales y reproductivas en mamíferos (Reynolds y Kerverne, 1979; Suárez y col., 2011b).

Los Epitelios Olfatorios, Principal y Vomeronasal, se caracterizan por contener células receptoras de odorantes (Oboti y Peretto, 2015), además, se ha descrito que cada una de estas células expresa solo un tipo de proteína receptora de odorantes cuya activación y transducción de la señal depende de la unión con odorantes de cierta similitud estructural (Buck y Axel, 1991; Krautwurst y col., 1998).

El OVN contiene neuronas de tipo olfatorio que segregan en dos grupos, las halladas en la región apical y la región basal; estas regiones se diferencian en la expresión de las proteínas de tipo G, G_{α} (apical) y G_{α} (basal) (Halpern y Martínez-Marcos, 2003). Cada una de estas poblaciones neuronales proyectan segregadamente al telencéfalo, donde sus axones forman parte de la capa glomerular de ambos subdominios del BOA: anterior (aBOA) y posterior (pBOA) (Jia y Halpern, 1996), respectivamente.

A modo general, el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA) es una estructura laminar en forma de lente, que se aloja en la región dorsal del Bulbo Olfatorio. Está estructurado en capas, donde cada una de ellas está caracterizada por una población celular altamente representada; es esta dominancia la que determina tanto el funcionamiento de la capa como el nombre de la misma (Larriva-Sahd, 2008). Siguiendo el eje dorsal-ventral, estas

se conocen como Capa Glomerular, Capa Plexiforme Externa, Capa de Células Principales y Capa de Células Granulares.

La Capa Glomerular (CG) del SOA contiene Células Yuxtaglomerulares, principalmente del tipo Periglomerular (interneuronas), Glomérulos y también el Nervio Vomeronasal (Larriva-Sahd, 2008; Simpson y Sweazey, 2013). A nivel de esta capa es posible identificar una invaginación en el eje anterior posterior (*ver flechas Figura 1C*), marca anatómica que coincide con la separación asociada a la expresión diferencial de proteínas de tipo G, $G_{i\alpha}$ y $G_{o\alpha}$, de los dominios anterior y posterior del BOA, respectivamente (Suárez y Mpodozis, 2009). Es a partir de ésta que se puede delimitar un plano descendente a través de todo el órgano que divide la mitad anterior de la posterior del BOA y que se conoce como *línea alba*.

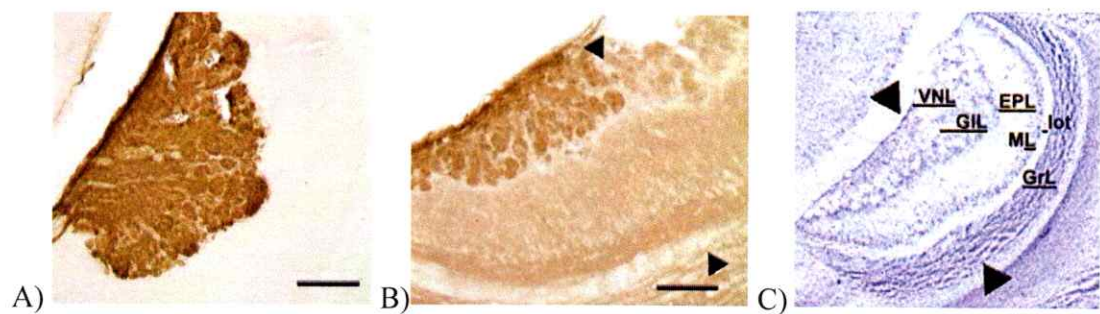


Figura 1: A) Marca Inmunohistoquímica para la proteína $G_{i\alpha}$; B) Marca Inmunohistoquímica para la proteína $G_{o\alpha}$; flecha destaca la hendidura que coincide con la división de la expresión de las diferentes proteínas G en la figura 1B); C) Capas del BOA. VNL: Capa del Nervio Vomeronasal, GIL: Capa Glomerular, EPL: Capa Plexiforme Externa, ML: Capa de las Células Principales, lot: tracto olfatorio lateral, GrL: Capa Granular. (Suárez y Mpodozis, 2009). Barra de calibración en A) y B) corresponde a 200 μ m; flechas destacan marcas anatómicas de la línea alba.

Los glomérulos que componen esta capa en el BOA han sido descritos como confluentes, pseudoestratificados y de mayor tamaño en relación a los que componen la misma capa en el Bulbo Olfatorio Principal (BOP) (Larriva-Sahd, 2008).

La Capa Plexiforme Externa es una de las más voluminosas en el BOA. Esta capa se compone de diversos tipos celulares, especialmente de una amplia variedad de interneuronas, astrocitos, células de tipo *tufted* y las dendritas apicales de células de la Capa Granular (Hamilton *y col.*, 2005; Larriva-Sahd, 2008; Simpson y Sweazey, 2013). La morfología de las células que componen la Capa Plexiforme Externa es multipolar (Gall *y col.*, 1986; Kosaka *y col.* 1994) y se sugiere que estas células interactúan con las dendritas de las células granulares (Shepherd *y col.*, 2007).

La siguiente es la Capa de Células Principales o Capa Mitral/*tufted* (CMT), es una fina capa que contiene a la mayoría de los somas de las Células de Proyección Secundaria de tipo Mitral y *tufted*, donde también es posible detectar la presencia de fibras centrífugas de los blancos telencéfalicos del BOA (ver *Figura 2*). Es, además, en esta capa donde ocurre el proceso de modulación de la señal recibida por la Células de Proyección Secundaria guiado por las interneuronas Granulares (Simpson y Sweazey, 2013).

Le sigue a esta capa el tracto Olfatorio Lateral (tOL), que corresponde a un conjunto compacto de fibras compuesto por eferencias de Células Mitral/*tufted* y axones provenientes de Fibras Centrífugas Superficiales (Larriva-Sahd, 2008).

Finalmente, la Capa Granular (CGr) se extiende desde el tracto Olfatorio Lateral hasta la materia blanca bulbar, en su límite anterior contacta con el extremo caudoventral de la Capa Granular del Bulbo Olfatorio Principal y en su límite posterior la sección dorsal y medial del Núcleo Olfatorio Anterior (NOA) (Larriva-Sahd, 2008). Esta capa contiene principalmente interneuronas de tipo Granular, axones primarios y colaterales de Células Mitral/*tufted* (Simpson y Sweazey, 2013). Las Células Granulares, las principales de esta capa, carecen de axón y la inhibición que realizan sobre las Células de Proyección Secundaria corresponden a sinapsis del tipo dendrodendrítica (ver *Figura 2*) mediada por el neurotransmisor GABA (Rall *y col.* 1966; Jahr y Nicoll, 1980; Egger y Urban, 2006).

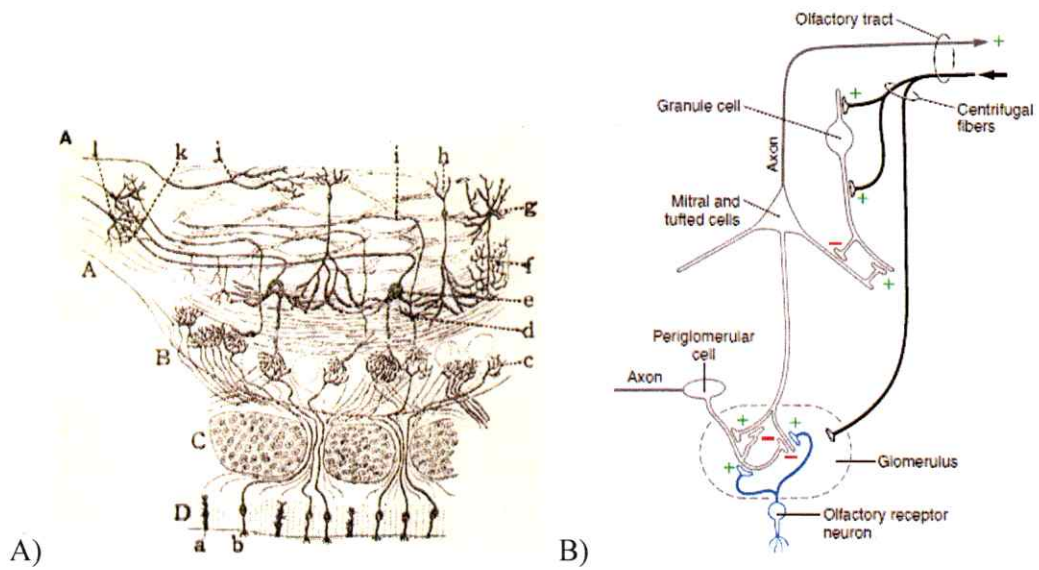


Figura 2: A) Esquema dibujado por Santiago Ramón y Cajal que muestra la Conectividad del Sistema Olfatorio, donde es posible ubicar las células del Epitelio Olfatorio, los glomérulos, las Células Mitrал/*tufted*, y las Células Granulares (Figueres-Oñate y col. 2014) B) Esquema resumen del circuito de excitación/inhibición del Bulbo Olfatorio, donde se muestra la interacción sináptica entre los principales tipos celulares; el símbolo (+) representa los contactos sinápticos de tipo excitatorios mientras que (-) representa los inhibitorios (Simpson y Sweazey, 2013).

La neuropila de la Capa Glomerular es inervada por las células de proyección secundaria, las que a su vez proyectan a cuatro blancos telencéfalicos: el Núcleo del lecho del Tracto Olfatorio Accesorio, el Núcleo del lecho de la Estría Terminal, la Amígdala Medial y el Núcleo Cortical Posteromedial de la Amígdala (Brennan y Keverne, 2004; Kang y col. 2011). De esta forma, el efecto final de la activación de las vías vomeronasales se produce a nivel hipotalámico, mediando principalmente cambios de tipo hormonal (Wang y col., 1997).

3.2. Neurogénesis en el Sistema Olfatorio Accesorio

La neurogénesis adulta (NA) es un fenómeno relativamente nuevo que fue descrito durante el siglo XX (Altman, 1963; Altman y Das, 1965; Altman, 1969; Bayer, 1983; Gross, 2000; Peretto y Bonfanti, 2015), el que conlleva la proliferación de células progenitoras asociadas a zonas discretas del cerebro adulto (Gross, 2000). Inicialmente fueron descritos los nichos neurogénicos del Giro Dentado del Hipocampo, la Zona Subventricular y el Bulbo Olfatorio (Altman y Das, 1965; Altman, 1969; Bayer, 1983).

Con la introducción del uso de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) nace una nueva forma de estudiar la neurogénesis (Taupin, 2007), ya que la inserción de esta molécula en el material genético de las células durante la fase S podía ser revelada mediante inmunohistoquímica (Gratzner *y col.*, 1975).

Esta capacidad de generar nuevas células juega un rol clave en la plasticidad neuronal asociada a habilidades cognitivas o de adaptación al medio (Bonfanti y Peretto, 2011; Peretto y Bonfanti, 2015) y sufre variaciones durante el desarrollo de los animales (Hinds y McNelly, 1977; Kuhn *y col.*, 1996).

Se conoce la participación de la NA en la plasticidad neuronal adulta, y su relación con parte de los sistemas sensoriales presentes en los vertebrados (Peretto *y col.*, 2014). El rol de la NA es decisivo en la adaptación de los sistemas dinámicos, como el sistema olfatorio (Graziadei y Monti-Graziadei, 1985), ya que permite la especialización conductual y la adaptación del organismo a los cambios del ambiente (Peretto *y col.*, 2014).

Tanto la mantención de contactos sinápticos como la inhibición de los procesos apoptóticos y la proliferación celular al interior de un sistema se ha mostrado asociada a la existencia de actividad neuronal y a la formación de un contacto sináptico estable (Mennerick y Zorumski, 2000; Yu *y col.*, 2004; Heck *y col.* 2008; Stülz *y col.*, 2009). Un ejemplo de procesos dinámicos durante el desarrollo de un sistema será visto en la siguiente sección.

La incorporación de células en los Sistemas Olfatorio Principal (SOP) y Accesorio (SOA) ocurre tanto en el Epitelio Olfatorio como en el Bulbo Olfatorio. Las células que se

incorporan al Bulbo Olfatorio tienen su origen en la Eminencia Ganglionar Lateral, previo al nacimiento, y la Zona Subventricular en los estadios postnatales (Bovetti *y col.*, 2007; Nuñez-Parra *y col.*, 2011). Dentro de este proceso se ha cuantificado que alrededor del 75-80% de las células que componen Bulbo Olfatorio tienen su origen previo al nacimiento, dejando a un porcentaje no menor (20-25%), principalmente células yuxtglomerulares y granulares, las que sufren un recambio constante y por lo mismo son incorporadas durante etapas de la vida del animal (Bayer, 1983).

Las nuevas neuronas migran por la corriente migratoria rostral (ó *rostral migratory stream*) y se insertan como interneuronas yuxtglomerulares y granulares. Las células yuxtglomerulares forman parte de la Capa Glomerular, formando contactos sinápticos con los terminales de las neuronas vomeronasales; mientras que las granulares, en la Capa Granular, conectan principalmente con las células de proyección secundaria (Bayer, 1983; Schoppa y Urban, 2003; Egger y Urban, 2006).

La temporalidad de la proliferación de células, asociada al crecimiento de este sistema, se ha estudiado durante las diferentes etapas de desarrollo en ratas (cepa Purdue-Wistar) y ha sido observada hasta el estadio P180 en el Bulbo Olfatorio Principal, mientras que en Bulbo Olfatorio Accesorio ha sido observado hasta P60 (Bayer, 1983). Más aún el aumento en el volumen del BOA ha sido datado hasta P60 en la misma cepa (Rosselli-Austin *y col.*, 1987).

Mientras lo anterior caracteriza al BO, en los Epitelio Olfatorios las células son reemplazadas a lo largo de toda la vida del animal y además son capaces de repoblar el epitelio luego de un traumatismo (Barber y Raisman, 1977). Sin embargo, ha sido descrita una disminución postnatal de la tasa de proliferación en el Órgano Vomeronasal (OVN) de mamíferos, junto con cambios en la distribución de las células proliferativas durante el periodo postnatal (Weiler *y col.*, 1999).

Un punto a destacar es el efecto que tiene la actividad espontánea generada internamente en la mayoría de los circuitos en fases tempranas del desarrollo neural, que además estaría determinando la estructura final de los mismos (Goodman y Shatz, 1993; Spitzer, 2006).

Luego de la maduración las estructuras estabilizan una conformación, asociada a los efectos que tiene la experiencia sensorial sobre los sistemas (Katz y Shatz., 1996). Sería esta combinación secuencial entre la actividad neuronal espontánea y la dependiente de la experiencia la que dota al cerebro de una capacidad permanente para dar cabida a los cambios de forma dinámica durante el desarrollo (Katz y Shatz, 1996).

3.3. Caso particular, *Octodon degus*

Hace algunos años el Sistema Olfatorio Accesorio de especies pertenecientes al infraorden *Caviomorpha* (orden *Hystricognathi*) tomó notoriedad, debido a las descripciones de Suárez y Mpodozis (2009 y 2011a) que mostraban la existencia de diferencias volumétricas entre las regiones anterior y posterior del BOA de *Octodon degus* y de *Hydrochoerus hydrochaeris*.

Respecto de *Octodon degus*, se observó que el volumen total del aBOA duplica el del pBOA, con un mayor número y tamaño de glomérulos en aBOA (Suárez y Mpodozis, 2009); lo opuesto fue observado en *H. hydrochaeris* (Suárez y col., 2011a). Por otro lado, ha sido descrita la pérdida de algunos de estos subdominios, aBOA o PBOA, en especies con altos niveles de dimorfismo sexual (Suárez y col., 2011b).

Siguiendo estos estudios, en *O. degus* adultos se realizaron mediciones estereológicas de número, densidad y volumen ocupado por las células de proyección secundaria (de tipo *mitral/tufted*), donde fueron observadas diferencias significativas en el número de las neuronas de proyección secundaria (*mitral/tufted*) y del volumen de la Capa Mitral/*tufted* que las contiene (Delgado y col., 2013).

Los datos anteriores estarían dando cuenta de que las formas de vida podían estar asociadas a características anatómicas propias de cada especie, en especial el tipo de odorantes a los que se ven expuestos (Suárez y Mpodozis, 2009; Suárez y col., 2011a; Suárez y col., 2011b)

En un trabajo paralelo a este, se describió la dinámica general del desarrollo del Sistema Vomeronasal de *Octodon degus*. En este se encontró en etapas prenatales la segregación de ambos subdominios, tanto en el OVN como en el BOA. A partir de lo cual, el desarrollo del BOA en *O. degus* correspondería a un proceso dinámico, con marcados crecimientos y decrecimientos en fases críticas, sin embargo, la heterogeneidad volumétrica descrita por Suárez (2009) en *Octodon degus* no sería innata, sino que surge durante el desarrollo postnatal (Ver Figura 3). Debido a lo anterior, podría asociarse la generación de la heterogeneidad volumétrica con la maduración y la organización de los tipos neuronales que lo componen en un determinado contexto social (Fernández-Aburto, 2016).

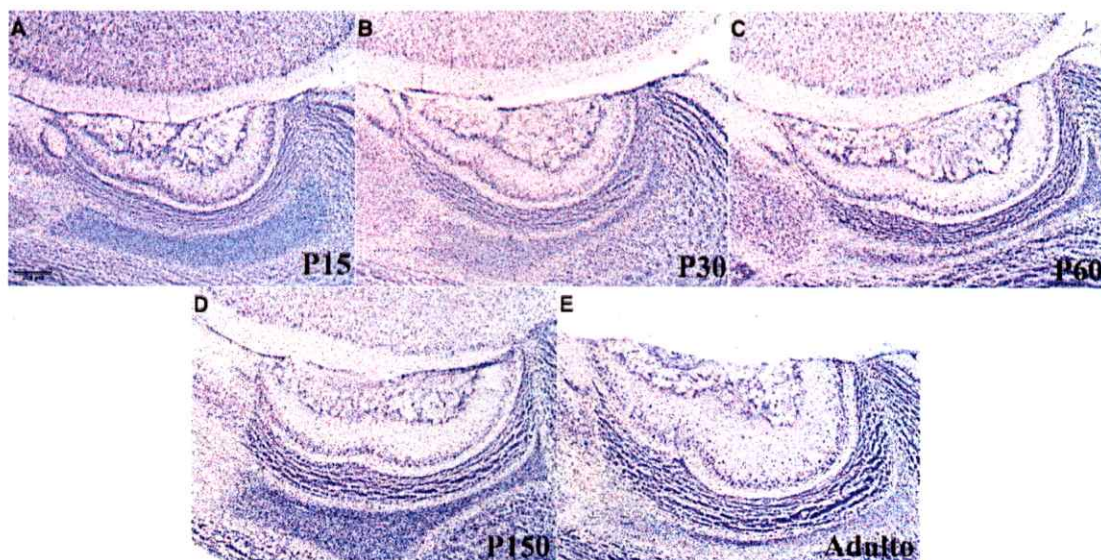


Figura 3: Desarrollo del Bulbo Olfatorio Accesorio de *O. degus* entre los estadios P15 y el estadio adulto. A) BOA en P15, B) BOA de una cría en P30, C) BOA de una cría en P60, D) BOA de una cría en P150, E) BOA de un adulto que creció en cautiverio. Las flechas marcan los extremos de la línea alba. Barra de calibración: 200 μ m

Sin embargo, la participación que tienen las células granulares en el establecimiento de la heterogeneidad del SOA no es clara y tiene la peculiaridad de que estas células tienen un

recambio constante a lo largo de la vida del animal; el que ocurre en un periodo relativamente corto, entre 20 y 26 días (Lemasson, y col., 2005). Por lo anterior, un primer paso para estudios más profundos corresponde a la caracterización de los cambios de la CGr y de su posible participación en el establecimiento de la heterogeneidad.

La vinculación de la NA en los procesos de adaptación es evidente, sin embargo, la forma en que esta ocurre y los factores que la determinan aún no lo son. Así, el Sistema Olfatorio Accesorio de *Octodon degus* constituye un modelo interesante, tanto en su fase adulta como durante el desarrollo, para estudiar en profundidad la NA. Las características anatómicas que exhibe lo convierten en un modelo interesante ya que ambos subsistemas pueden ser diferenciados sin necesidad de tratamientos previos (como inmunohistoquímica o hibridación *in situ*), permitiendo así la aplicación de otras técnicas, hasta el momento complejas en otros modelos.

Lo anterior requiere conocer más a fondo el SOA de *O. degus*, ya que hasta el momento no existen datos sobre los cambios que ocurren en el desarrollo en especies caviomorfas, siendo este trabajo uno de los primeros en analizar la neurogénesis de este sistema a través de la caracterización de la citoarquitectura de la Capa de Células Granulares de este infraorden. Se espera que su introducción en esta temática pueda contribuir a la comprensión de este fenómeno y con ello avanzar en el entendimiento de los fenómenos de incorporación y proliferación celulares en sistemas altamente plásticos y su potencial uso en campos en la investigación básica o aplicada.

3.4. Hipótesis y Objetivos:

Hipótesis:

-La incorporación y/o proliferación de células granulares en la Capa Granular del BOA de *O. degus* exhibe un sesgo hacia rostral que puede hallarse durante el desarrollo.

Objetivos:

-Caracterizar mediante métodos estereológicos la heterogeneidad citoarquitectónica de la Capa Granular del BOA de *Octodon degus* durante el desarrollo postnatal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Los experimentos serán desarrollados en 5 individuos adultos y 3 crías de cada uno de los siguientes estadios: P15, P30, P60 y P150 de *Octodon degus*, todos crecidos en cautiverio. Estos han sido mantenidos en un vivero bajo condiciones naturales de temperatura y un fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad. Se mantendrán separados machos y hembras en jaulas de 50 cm x 60 cm x 40 cm (ancho, largo, alto), con comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales se seguirán de acuerdo a "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publicación n° 86 (23), 1985) y se cuenta con la aprobación de protocolos de parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, de acuerdo a la legislación chilena. Estos animales serán sobrealterados con una mezcla de quetamina y xilacina (2,4 y 0,4 mL/kg respectivamente) y perfundidos usando la aorta ascendente con suero salino (NaCl 0,1 M a 37°C), seguido de una solución fijadora de paraformaldehído 4% en buffer fosfato a pH 7,4.

4.2. Tinción de Cresil Violeta

Secciones sagitales del Bulbo Olfatorio de *Octodon degus* serán cortadas a 40µm con un micrótopo de congelación y mantenidas en buffer fosfato pH 7.4. Luego, su montaje será en portaobjetos gelatinizados. Durante la tinción los cortes serán lavados en Cloroformo, rehidratados y teñidos con Cresil Violeta, luego deshidratados y cubiertos con Permount.

4.3. Mediciones morfométricas

Secciones seriadas serán examinadas bajo microscopio de luz y analizadas usando el programa StereoInvestigator® (MBF Bioscience). La determinación de los volúmenes se realizará mediante el Estimador de Cavalieri utilizando una grilla de 30x30 µm con un intervalo de 2. Para el conteo estereológico se utilizará la modalidad del "Optical Fractionator Workflow" midiendo secciones con un intervalo de 2, en las que se contornea el área de la capa de Células Granulares (CGr) de ambos subdominios del BOA, se utilizará un marco de conteo de 30µmx30µm en una grilla que será determinada para cada

estadio y especie de acuerdo a la Tabla 1, todas tendrán asignadas un ángulo de rotación de 0°. El grosor de cada corte será evaluado en cada sitio de conteo y se utilizará un disector óptico de 15µm el que se ubicara centrado en el ancho del corte. Se medirán las secciones donde sea posible discriminar ambos subdominios identificando la hendidura que divide las regiones anterior y posterior (Suárez y Mpodozis, 2009) distinguiéndolas siguiendo la marca de la línea alba (Larriva-Sahd, 2008). El número estimado de células será calculado utilizando la ecuación descrita por West para cuantificaciones estereológicas (1991).

	Marco de conteo	Grilla	Disector óptico
<i>O. degus</i> P15	30µmx30µm	125µmx200µm	15µm
<i>O. degus</i> P30	30µmx30µm	125µmx200µm	15µm
<i>O. degus</i> P60	30µmx30µm	150µmx200µm	15µm
<i>O. degus</i> P150	30µmx30µm	150µmx200µm	15µm
<i>O. degus</i> adulto	30µmx30µm	150µmx250µm	15µm

Tabla 1: Resumen de las configuraciones utilizadas en la configuración del “Optical Fractionator Workflow” según estadio analizado para la medición de la densidad y el número de células en la Capa Granular del Bulbo Olfatorio Accesorio.

4.4. Análisis estadísticos

Para el análisis de datos se utilizara el programa Statistica10® en su modalidad de pruebas no-paramétricas: Para la comparación de ambos subdominios del Bulbo Olfatorio Accesorio se utilizara la prueba “Wilcoxon matched pairs” y para la comparación de las características de cada subdominio en los diferentes estadios se utilizara la prueba “Kruskal-Wallis ANOVA and median”.

4.5. Edición de Imágenes

Las imágenes que se presentan en el este trabajo fueron tomadas utilizando el microscopio Olympus® BX51 y capturadas con el software Spot 5.1 de SpotImaging™ asociada a la cámara “25.4 2MP Slider” de Diagnostic Instruments™. Las figuras fueron editadas

utilizando ImageJ en su versión de 64 bits 1.8.0_77 (Schneider y col., 2012) y el complemento FigureJ (Mutterer y Zinck, 2013).

4.6. Otras metodologías utilizadas

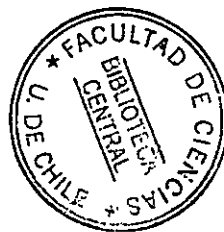
4.6.1. Medición estereológica de la Capa Mítral

La configuración para realizar la estimación del volumen de la Capa de células Mítral/*tufted* del BOA se realizará utilizando descrita para la CGr. La modalidad “Optical Fractionator Workflow” para la CMT se realizara con un intervalo de 2 para las secciones, un marco de conteo de 50 μ m x50 μ m y una grilla de 100 μ m x 100 μ m con un angulo de inclinación de 0°. El grosor de cada corte será evaluado en cada marco de conteo y se utilizará un disector óptico de 15 μ m centrado a lo ancho del corte.

4.6.2. Inyecciones de BrdU

Las inyecciones de BrdU serán realizadas en individuos de *Rattus norvegicus* de la cepa *Sprague-Dawley*. El procedimiento propuesto fue planeado a partir de los trabajos de Oboti y colaboradores (2009 y 2011) y los de Núñez-Parra y colaboradores (2011) en los que se inyecta una dosis de BrdU de 100mg/kg de peso corporal vía intraperitoneal en animales anestesiados, con dos o más pulsos cada dos horas. Entre 28 y 30 días después de la inyección los animales serán sacrificados de la manera descrita anteriormente (*ver sección 4.1*).

Las secciones obtenidas del Bulbo Olfatorio y del Órgano Vomeronasal serán incubadas, en placas para cultivo de tejido, durante 10 minutos en una solución 0,3% de H₂O₂ en PBS, seguido por un tratamiento de 10 minutos en Ácido Clorhídrico (HCl) 2N, luego de lo cual sigue una solución de suero 3%, 0,4 % Triton X-100 en PBS por 1 hora. Habiendo terminado los pasos ya indicados, los cortes serán incubados con inmunoglobulinas monoclonales anti BrdU (Dako) con Triton X-100 0,4% en PBS por 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones serán incubadas en anticuerpo secundario biotinilado por 2 horas y procesadas con el complejo avidin-biotin (ABC Elite Kit; Vector Laboratories). El revelado se realizará con 4% 3,3-diaminobenzidina (Sigma) y 0,03% de H₂O₂ en PBS por 2-4 minutos.



5. RESULTADOS

Durante este trabajo se estudiaron los cambios que ocurren en la capa granular (CGr) del BOA a fin de dar cuenta de cómo se establece la heterogeneidad de esta capa durante el desarrollo de estos animales. Para ello se analizaron los estadios P15, P30, P60, P150 y el estadio adulto (P180).

En cada una de las muestras se realizaron mediciones estereológicas de densidad, número de células y volumen que se describen a continuación y cuyo error de Gundersen asociado osciló entre 0,009 y 0,070 (Para más información *ver Tabla 1 del Anexo*).

5.1. Volumen ocupado por las células

Un primer acercamiento a la heterogeneidad de la Capa Granular se realizó utilizando el Estimador de Cavalieri del programa StereoInvestigator®, algoritmo que usando el principio del mismo nombre estima el volumen total del tejido como la suma de los volúmenes de una parte de las secciones que lo componen. Las mediciones no estandarizadas y el volumen del cerebro estimado a partir del peso del mismo se observan en la Figura 4.

Al observar la Figura 4 se puede notar que si bien el volumen del cerebro total aumenta entre cada estadio analizado, ambos subdominios del BOA fluctúan respecto de los valores del volumen de cada uno de los estadios y por tanto no siguen el comportamiento general de desarrollo; además los valores estandarizados en relación al volumen del cerebro se resumen en la Tabla 2.

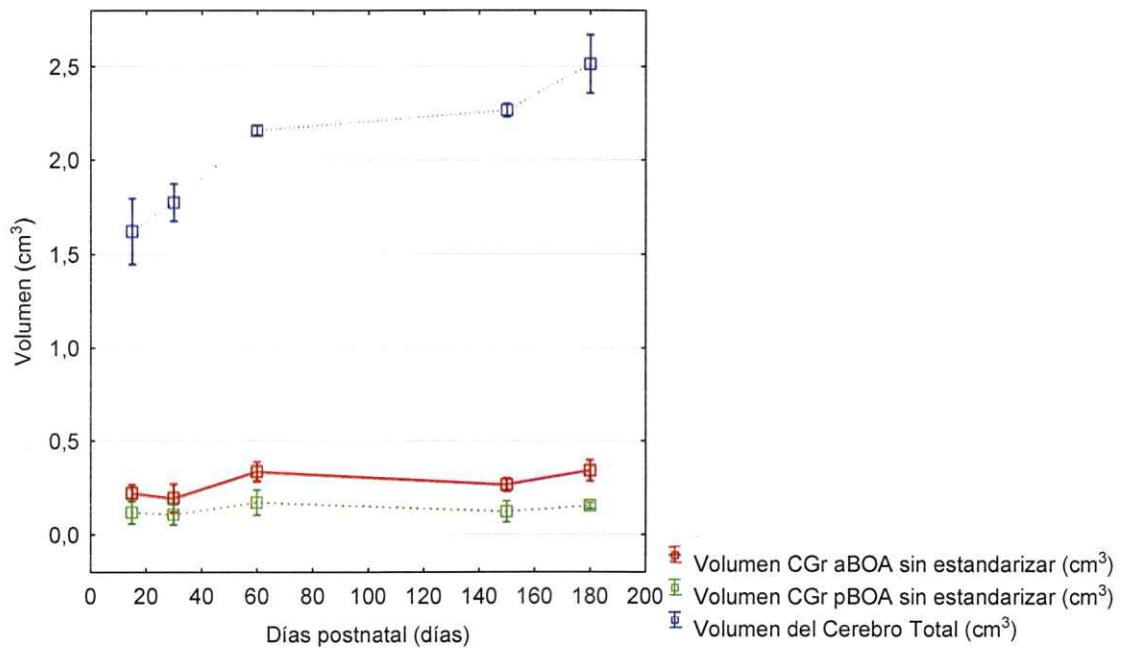


Figura 4: Volúmenes sin estandarizar de la Capa Granular (CGr) de ambos Subsistemas del Bulbo Olfatorio Accesorio y el Volumen del Cerebro Completo para cada uno de los estadios analizados. (P15: n=3; P30: n=3; P60: n=3; P150: n=3; P>180: n=6)

	Volumen Capa de Células Granulares			
	aBOA	pBOA	aBOA/pBOA	Wilcoxon matched pairs test*
P15	0,134 ± 0,035	0,070 ± 0,043	2,18 ± 0,66	z=1,603567, p=0,108810, n=3
P30	0,104 ± 0,049	0,054 ± 0,031	2,01 ± 0,78	z=1,603567, p=0,108810, n=3
P60	0,153 ± 0,023	0,076 ± 0,031	2,14 ± 0,50	z=1,603567, p=0,108810, n=3
P150	0,115 ± 0,014	0,051 ± 0,024	2,47 ± 0,71	z=1,603567, p=0,108810, n=3
P180	0,146 ± 0,034	0,063 ± 0,011	2,30 ± 0,44	z=2,201398, p=0,027709, n=6

*Valores muestran diferencias significativamente estadísticas al considerar un $p < 0,05$.

Tabla 2: Resumen de los volúmenes de la Capa de Células Granulares estandarizados por el volumen total del seso para cada uno de los estadios analizados, la proporción entre ambos subdominios y la prueba de Wilcoxon respectiva. Notar que los volúmenes son adimensionales debido a la estandarización y se expresan de la forma (promedio ± error estándar).

Un punto a considerar es la significancia estadística del cambio producido, lo que es analizado mediante la prueba de “Kruskal-Wallis”, cuyo resultado es que no se observan cambios significativos de volumen en el aBOA ($\chi^2_{(4)}=2,000$, $p=0,7358$) ni en el pBOA ($\chi^2_{(4)}=2,000$, $p=0,7358$).

Con estos datos se podría señalar que la Capa de Células Granulares no aumenta su volumen significativamente durante el desarrollo, a diferencia de lo observado para el volumen total del cerebro ($\chi^2_{(4)}=17,000$, $p=0,0019$) y del Bulbo Olfatorio Completo (Fernández-Aburto, 2016).

Las diferencias de volumen entre cada uno de los subsistemas en la Capa Granular llega a ser al menos el doble en todos los estadios observados, no obstante la prueba estadística de Wilcoxon muestra que esas diferencias no son significativas en los estadios tempranos del desarrollo. Solo en el caso de los individuos adultos esta diferencia es significativa ($p=0,027709$), posiblemente atribuible al bajo número de casos obtenidos para los estadios previos ($n=3$).

Para continuar el análisis centrado en la heterogeneidad, será introducido un factor artificial que durante este trabajo se denominará “*coeficiente aBOA/pBOA*” (ver Figura 5 y Tabla 2, columna *aBOA/pBOA*) y se referirá a la división del valor estimado para el aBOA por el valor de pBOA en la misma medición.

Hallamos que el *coeficiente aBOA/pBOA* no sufre variaciones estadísticamente significativas durante el desarrollo ($\chi^2_{(4)}=2,000$, $p=0,7358$), fluctuando entre los valores $2,01\pm 0,78$ y $2,47\pm 0,71$.

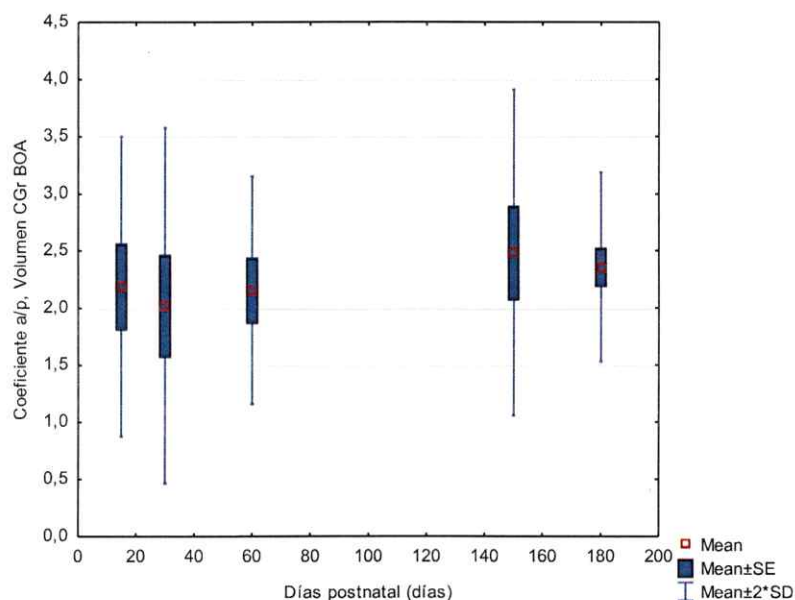


Figura 5: Variación de la relación anterior/posterior en el BOA de los volúmenes de la Capa Granular correspondientes a los diferentes estadios analizados

Otra forma de observar los cambios es mediante el cociente del valor inicial, en este caso el valor de la medición en P15 y el valor respectivo de cada uno de los estadios sucesivos (*ver Tabla 3*).

Mediante este cociente es posible detectar 2 estadios donde ambos subdominios sufren una leve disminución del volumen ocupado por las Células Granulares, P30 y P150. Es notorio que en el caso del subdominio posterior del BOA el volumen de la Capa de Células Granulares del estadio adulto es menor que el inicial (P15).

	aBOA	pBOA
P15/P15	1,000	1,000
P30/P15	0,776	0,777
P60/P15	1,143	1,087
P150/P15	0,862	0,732
P180/P15	1,092	0,894

Tabla 3: Cuociente entre volumen promedio obtenido en los diferentes estadios postnatales de *O. degus* y el estadio postnatal inicial (P15), correspondientes a los subdominios aBOA y pBOA (En base a los datos expuestos en la Tabla 2). Se destacan los eventos de disminución de tamaño con respecto a la etapa inicial (rojo).

A modo de resumen, respecto del volumen estimado de la Capa de Células Granulares sólo fueron observadas diferencias estadísticamente significativas en el caso de los individuos adultos, lo que podría asociarse al tamaño de la muestra obtenida para cada estadio. Además se dio cuenta de una tendencia de reducción del volumen de ambos subdominios en los estadios P30 y P150.

5.2. Densidad de Células

Una vez se obtuvo el dato de las diferencias volumétricas entre ambos subdominios del Bulbo Olfatorio Accesorio se analizó la heterogeneidad a niveles más detallados, como la densidad celular. Los datos obtenidos para la medición de densidad se resumen en la Figura 6 y la Tabla 4.

La Figura 6 resume la dinámica de variaciones de la densidad de la Capa de Células Granulares en los estadios observados en sus valores absolutos, se observa un decaimiento en la densidad de células de la región pBOA, comportamiento que no sigue la región anterior.

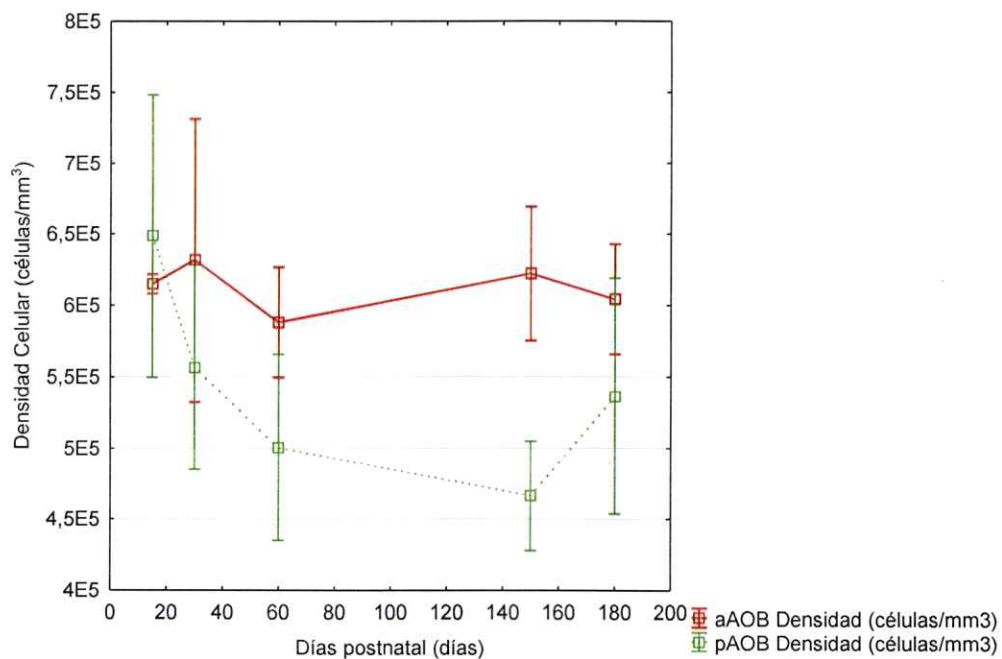


Figura 6: Densidades sin estandarizar de la Capa Granular (CGr) de ambos Subsistemas del Bulbo Olfatorio Accesorio de *Octodon degus* en los diferentes estadios postnatales. (P15: n=3; P30: n=3; P60: n=3; P150: n=3; P>180: n=5)

	Densidad de células (cm ⁻³)			
	aBOA	pBOA	aBOA/pBOA	Wilcoxon matched pairs test *
15 dpn	614046 ± 66973	647981 ± 99063	0,96 ± 0,15	z=0,534522, p=0,592980, n=3
30 dpn	630921 ± 9949	555732 ± 71448	1,13 ± 0,06	z=1,603567, p=0,108810, n=3
60 dpn	587304 ± 38516	499601 ± 65504	1,18 ± 0,08	z=1,603567, p=0,108810, n=3
150 dpn	621584 ± 46742	465726 ± 38457	1,34 ± 0,04	z=1,603567, p=0,108810, n=3
>180 dpn	621685 ± 52108	551054 ± 79447	1,15 ± 0,18	z=1,213560, p=0,224917, n=5

*Valores muestran diferencias significativamente estadísticas al considerar un $p < 0,05$.

Tabla 4: Resumen de las densidades celulares de la Capa Granular, obtenidas utilizando el Método de Fraccionador Óptico, la proporción entre ambos Subdominios del BOA y la comparación entre las regiones anterior y posterior mediante la Prueba de Wilcoxon. Notar que los valores se expresan de la forma (promedio ± error estándar).

Estos valores fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon para comparar entre el valor de la región anterior y la posterior de cada uno de los estadios (*ver columna, Wilcoxon matched pairs test, Tabla 4*), en este caso, ninguno de los estadios mostró diferencias estadísticamente significativas entre la región anterior y posterior.

Utilizando el test de Kruskal-Wallis, se analizaron las variaciones de densidad de la Capa de Células Granulares durante el desarrollo; este análisis registró que la densidad de los estadios analizados de la región anterior del BOA no muestra diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2_{(4)}=5,0000$, $p=0,2873$), al igual que la región posterior ($\chi^2_{(4)}=7,66667$, $p=0,1046$), revelando así que no existirían variaciones de densidad en los subdominios del BOA entre los estadios del desarrollo analizados.

Respecto del *coeficiente aBOA/pBOA* (*ver Tabla 4, columna aBOA/pBOA*) se observa que sufre fluctuaciones, sin embargo mantiene valores cercanos a 1 (*ver Figura 7*), mostrando que la densidad de células de la Capa Granular es similar entre ambas regiones, anterior y posterior, durante todo el desarrollo.

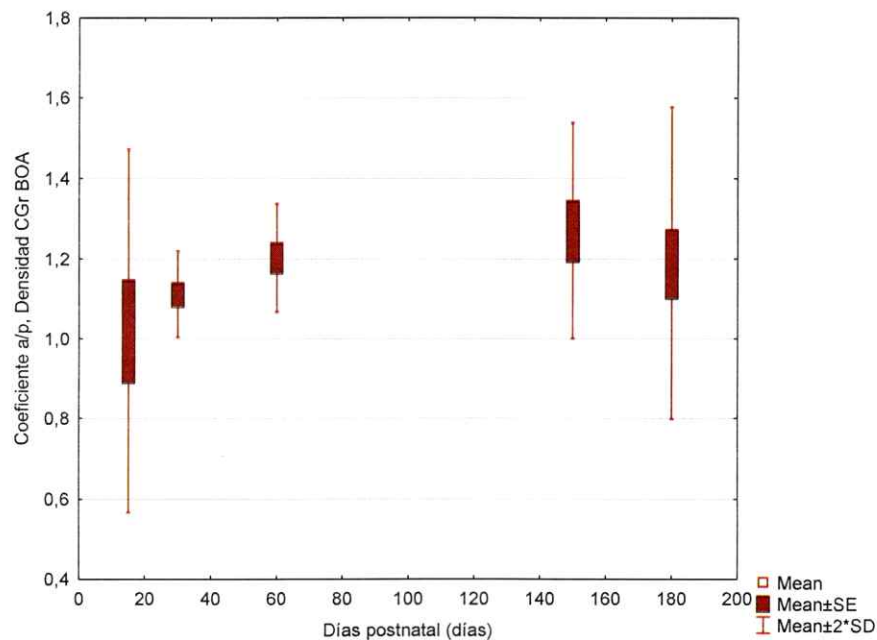


Figura 7: Variación de la relación anterior/posterior de la Densidad Celular en la Capa de Células Granulares del BOA en relación a las densidades correspondientes a los diferentes estadios analizados.

También se realizó la comparación de este coeficiente mediante el Test de Kruskal-Wallis, cuyo resultado respecto del *coeficiente aBOA/pBOA* entrega que estos pertenecen a una misma población ($\chi^2_{(4)}=1,479630$, $p=0,8302$) y por tanto no habrían variaciones estadísticamente significativas para este coeficiente.

Por otro lado, utilizando el cociente del valor encontrado en cada estadio dividido por el valor inicial, que en este caso correspondería a P15, se construyó la Tabla 5, donde además se puede notar que todos los valores encontrados en la región posterior de los estadios posteriores a P15 son menores que éste.

	aBOA	pBOA
P15/P15	1,000	1,000
P30/P15	1,027	0,858
P60/P15	0,956	0,771
P150/P15	1,012	0,719
P180/P15	1,012	0,850

Tabla 5: Cuociente entre la densidad celular promedio obtenida en los diferentes estadios postnatales de *O. degus* y el estadio postnatal inicial (P15), correspondientes a los subdominios aBOA y pBOA (En base a los datos expuestos en la Tabla 4). Se destacan los eventos de disminución de tamaño con respecto a la etapa inicial (rojo).

Finalmente, respecto de la densidad encontrada no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas respecto de la comparación entre la región aBOA y la pBOA de la Capa de Células Granulares en ningún estadio del desarrollo, como tampoco en la proporción aBOA/pBOA. Además, es posible notar que respecto del estadio postnatal de 30 días, la densidad tiene a una leve disminución en la región posterior del Bulbo Olfatorio Accesorio.

5.3. Número total de células

El dato que integra el volumen ocupado y la densidad de células en la Capa de Células Granulares es el número total de células; debido a que fue posible encontrar diferencias significativas entre la región anterior y posterior en el volumen del estadio adulto, no así en la densidad, se plantea analizar el número total de células contenidas en la Capa Granular. Esta característica fue medida utilizando el modo “Fraccionador Óptico” del programa StereoInvestigator®.

El número total de células estimado de ambas regiones del BOA se muestra en la Figura 8, en este gráfico es posible notar las fluctuaciones que sufre el total de células, indicando dos momentos donde el total de células fluctua en ambos subdominios.

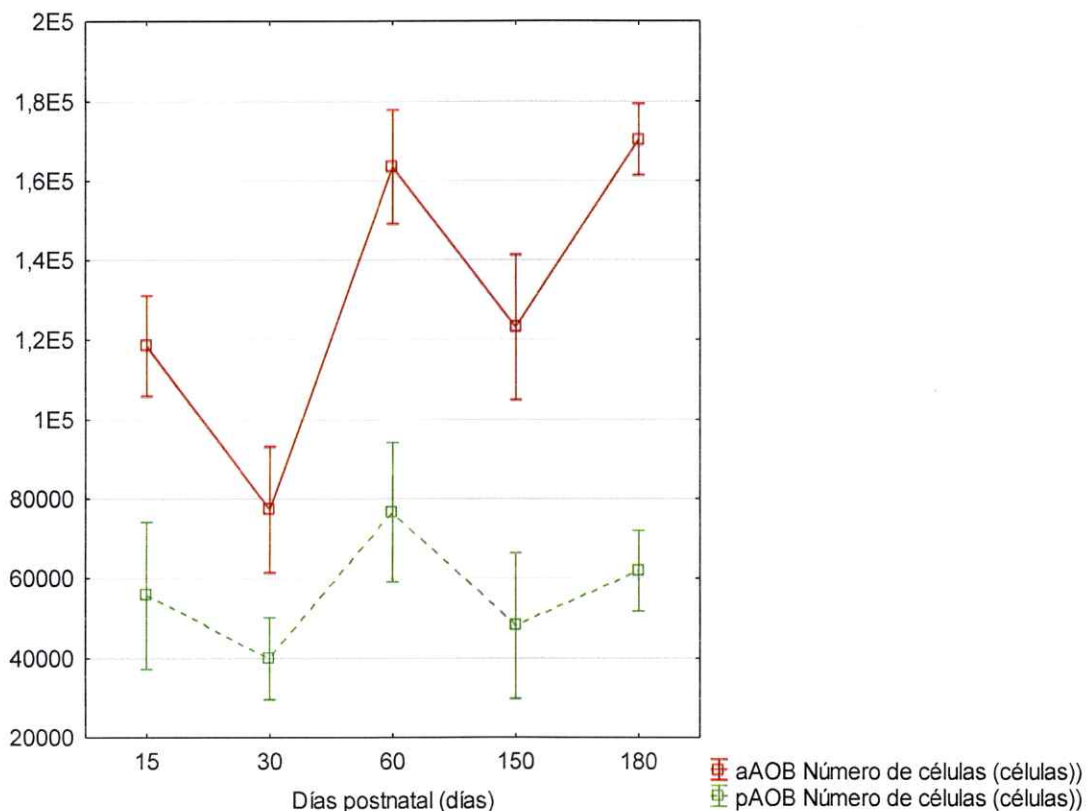


Figura 8: Número de células de la Capa Granular de cada uno de los Subsistemas del Bulbo Olfatorio Accesorio de *Octodon degus* para cada estadio posnatal analizado. (P15: n=3; P30: n=3; P60: n=3; P150: n=3; P>180: n=5)

Respecto de la heterogeneidad de esta capa, en la Tabla 6 se resume el número total de células encontrado en la CGr, mostrando además la proporción entre ambas regiones y la comparación a través del Test de Wilcoxon. Respecto de este último, el estadio donde las diferencias se tornan significativas es el estadio adulto ($p=0,043115$), sin embargo, la proporción entre ambos estadios en el adulto es similar a todos los demás estadios.

	Número de células			
	aBOA	pBOA	aBOA/pBOA	Wilcoxon matched pairs test *
P15	118179 ± 21718	55417 ± 31811	2,47 ± 0,92	$z=1,603567, p=0,108810, n=3$
P30	76989 ± 27513	39642 ± 17720	2,02 ± 0,63	$z=1,603567, p=0,108810, n=3$
P60	163137 ± 24843	76332 ± 30334	2,34 ± 0,78	$z=1,603567, p=0,108810, n=3$
P150	122839 ± 31503	47878 ± 31522	2,99 ± 1,00	$z=1,603567, p=0,108810, n=3$
P180	184144 ± 35098	66636 ± 20718	3,03 ± 1,23	$z=2,022600, p=0,043115, n=5$

*Valores muestran diferencias significativamente estadísticas al considerar un $p<0,05$.

Tabla 6: Resumen del número total de células obtenido utilizando el Método de Fraccionador Óptico, la proporción entre ambos Subdominios del BOA y la comparación entre las regiones anterior y posterior mediante la Prueba de Wilcoxon. Notar que los valores se expresan de la forma (promedio ± error estándar).

La proporción o *coeficiente aBOA/pBOA* en el caso del número total de células de la Capa Granular del BOA de *O. degus* (ver Figura 9 y Tabla 6, columna aBOA/pBOA) fluctúa entre los valores $2,02\pm 0,63$ y $3,03\pm 1,23$.

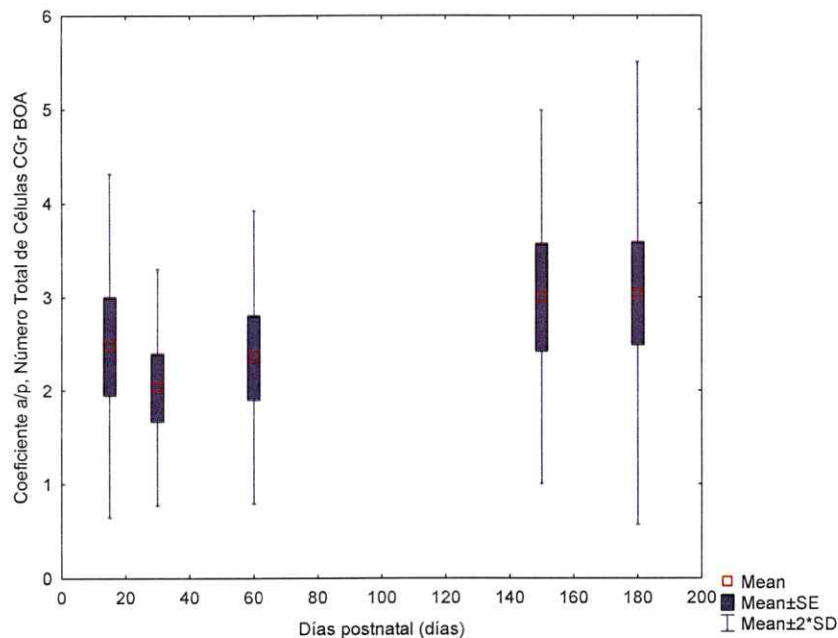


Figura 9: Variación de la proporción en ambos Subdominios, anterior y posterior, del número total de células contenido de la Capa Granular del BOA en los diferentes estadios analizados.

Se realizó un análisis comparativo entre los valores observados en todos los estadios para el *coeficiente aBOA/pBOA* utilizando el Test de Kruskal-Wallis ($\chi^2_{(4)}=1,479630$, $p=0,8302$), que mostró para esta característica ninguna variación significativa entre los estadios analizados. Lo que también ocurre al comparar el cambio observado en la Capa de Células Granulares del BOA: ni la región aBOA ($\chi^2_{(4)}=8,0000$, $p=0,0916$) ni pBOA ($\chi^2_{(4)}=2,3333$, $p=0,6747$) muestran variaciones estadísticamente significativas.

Respecto de la heterogeneidad de la Capa Granular, a pesar de mantener cuocientes entre ambas regiones entre $2,02 \pm 0,63$ y $3,03 \pm 1,23$, éstas sólo es posible detectarlas con el Test de Wilcoxon en el estadio adulto (con un $n=5$). Esto podría deberse a que los estadios previos el número de muestras con las que fue posible contar para este trabajo fue un $n=3$.

El cociente entre el valor de cada estadio y el estadio más temprano en el desarrollo es mostrado en la Tabla 7, donde es posible observar una temporalidad similar a la del volumen, con decrecimientos en los estadios de P30 y P150; sin embargo, es notorio que la región posterior del adulto es menor que la misma en P15, dando cuenta de un decrecimiento, tanto en volumen como en número de células en esta región.

	aBOA	pBOA
P15/P15	1,000	1,000
P30/P15	0,577	0,618
P60/P15	1,021	1,005
P150/P15	0,732	0,600
P180/P15	1,038	0,802

Tabla 7: Cuociente entre el número total promedio obtenido en los diferentes estadios postnatales de *O. degus* y el estadio postnatal inicial (P15), correspondientes a ambos subdominios del BOA (En base a los datos expuestos en la Tabla 6). Se destacan los eventos de disminución de tamaño con respecto a la etapa inicial (rojo).

Finalmente, respecto del número total de células estimado sólo fue posible demostrar estadísticamente la heterogeneidad entre la región aBOA y la pBOA del adulto, no así entre los estadios más tempranos del desarrollo, donde es posible notar que respecto del estadio postnatal de 15 días, el número de células totales fluctúa.

5.4. Comentarios de los resultados

En conjunto estas observaciones llevan a indicar la existencia de una heterogeneidad de tipo morfométrica en la Capa de Células Granulares respecto del volumen y el número total de células en el estadio adulto.

Debido a que en este trabajo no fue posible contar con un mayor número de muestras en los estadios tempranos del desarrollo los datos no son concluyentes respecto de la presencia o ausencia de una heterogeneidad a nivel de la Capa de Células Granulares de *Octodon degus* en etapas tempranas del desarrollo y tampoco lo son para las tendencias exhibidas, tanto en volumen, densidad y número.

No obstante, los coeficientes aBOA/pBOA sugieren que la heterogeneidad volumétrica y numérica podría estar presente desde el estadio inicial, y que ésta tendería a acentuarse en los estadios posteriores.

Las fluctuaciones observadas en las características de la CGr, además de la temporalidad de estas y las propiedades de la células granulares, estarían indicando que esta capa, más que participar de la adquisición de la heterogeneidad, estaría respondiendo a los cambios de las otras capas, como por ejemplo la CMT.

6. DISCUSIÓN

6.1. Capa de Células Granulares en contexto

Las células granulares del BOA inhiben la actividad de las células mitral/*tufted* selectivamente, proceso que se sugiere modularía la actividad interna del Bulbo Olfatorio Accesorio (Shepherd *y col.*, 2007; Simpson y Sweazey, 2013; Peretto *y col.*, 2014).

Las observaciones respecto de la naturaleza neuroquímica de las células granulares muestran su naturaleza GABAérgica, sin embargo, los efectos de su actividad van más allá de esta característica. Experimentos han asociado la neurogénesis de la Zona Subventricular y la sobrevivencia de las células granulares en el BOA con procesos complejos relacionados a una interacción de tipo socio-sexual mediada por la actividad de las células granulares del Sistema Vomeronasal; cuyo efector final serían las hormonas adenohipofisarias y gonadales (Peretto *y col.*, 2014).

Se sugiere además que estímulos de tipo social y reproductivo favorecen la sobrevivencia e integración de las neuronas dentro de una ventana temporal del desarrollo previo a la maduración (Oboti *y col.*, 2009; Oboti *y col.*, 2011; Wu *y col.*, 2013), efecto que estaría asociado a la presencia de feromonas masculinas, inhibición realizada por las CGr y la actividad de calpaínas (Kaba y Keverne, 1988; Brennan *y col.*, 1995). Este proceso afectaría principalmente el Bulbo Olfatorio Accesorio de las hembras de la respectiva especie (*ver Figura 10*) (Brennan, 2004; Oboti *y col.*, 2009; Wu *y col.*, 2013).

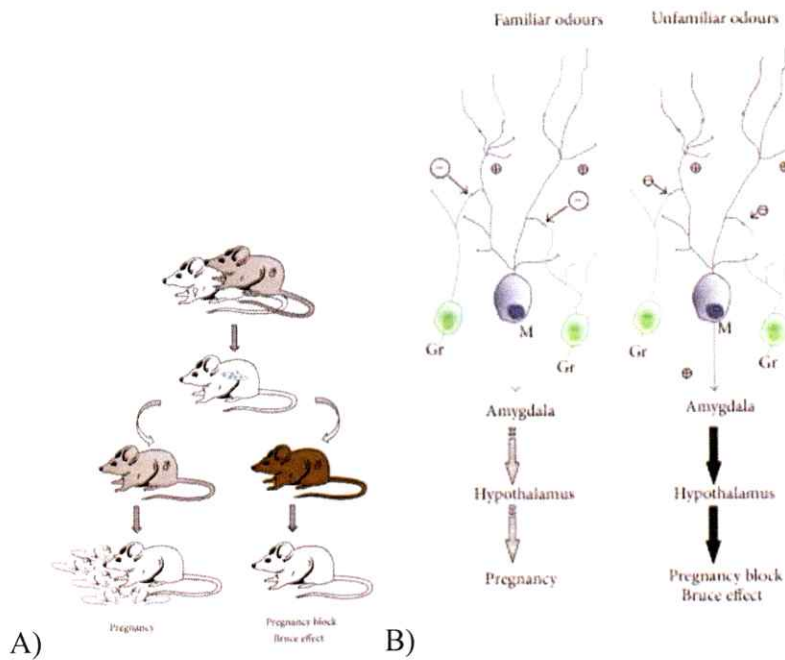


Figura 10: Células granulares y su efecto en el bloqueo del estado de preñez en roedores. A) El efecto de Bruce es el fenómeno mediante el cual una hembra preñada aborta espontáneamente al ser expuesta a la orina de un macho desconocido. B) Este efecto no se observa si la hembra es expuesta a las feromonas de un macho familiar, debido a que en este caso las células granulares inhiben las señales generadas por las células mitrales; en caso contrario, la actividad de las células granulares o la incorporación de éstas (Oboti *y col.*, 2011) se induciría el Efecto de Bruce (Peretto *y col.*, 2014).

La percepción de feromonas masculinas es capaz de desencadenar la integración de nuevas células granulares en el Bulbo Olfatorio Accesorio por medio de la actividad sensorial de las vías Vomeronasales y la actividad centrifuga de la Amígdala Medial (Peretto *y col.*, 2014), sin embargo, el amplio impacto de los estímulos sociales reproductivos en diferentes regiones del cerebro estaría señalando que otros circuitos pueden estar involucrados (Oboti *y col.*, 2009; Peretto *y col.*, 2014).

Debido a lo anterior, algunos autores señalan a las células granulares del BOA como las células implicadas en la “memoria” de las señales semioquímicas del Sistema

Vomeronasal (Kaba y Keverne, 1988; Brennan, 2004; Peretto *y col.*, 2014). Esto remarca la relevancia funcional que tienen las células granulares, ya que estas células estarían constituyendo la memoria del SOA a pesar de la renovación constante que tienen.

6.2. Células Granulares en el Desarrollo

Trabajos previos del laboratorio señalan que durante el desarrollo las regiones anterior y posterior del BOA estarían cambiando de acuerdo a la estimulación que recibe cada uno de los subdominios, y cuyo efecto final se observa en el estadio adulto (Fernández-Aburto, 2016). La región pBOA exhibe una tendencia a decrecer o mantenerse durante el desarrollo de *O. degus*, tanto por un efecto de la especie, donde el marcaje territorial esta mediado por semioquímicos principalmente de tipo volátil (asociados a la región aBOA) y en una proporción menor a los no volátiles (asociados a la región pBOA) (Suárez *y col.*, 2011b), como por un efecto de las condiciones sociales en las que creció el animal.

Cómo varían las granulares durante el desarrollo o cuál es la proporción entre ambos subdominios del Bulbo Olfatorio Accesorio de *Octodon degus* era desconocido hasta ahora. Sólo se podía inferir a partir de lo que se conocía que ocurría en *Rattus norvegicus*. Este último dato corresponde a un trabajo de 1987 de Rosselli-Austin, en donde se caracterizaron los cambios en el desarrollo de las células granulares del Bulbo Olfatorio Accesorio. Lo más notorio de este caso es que entre P25 y P30 el número de células granulares parece estabilizarse.

Los datos presentados en la Figura 11 estarían apoyando la idea de que la madurez sexual del animal estabiliza o sella los cambios que se desarrollan durante el crecimiento del animal tanto por un efecto de las condiciones en que fue criado el animal como por la capacidad de respuesta de la especie frente a ciertos semioquímicos (Suárez *y col.*, 2011b).



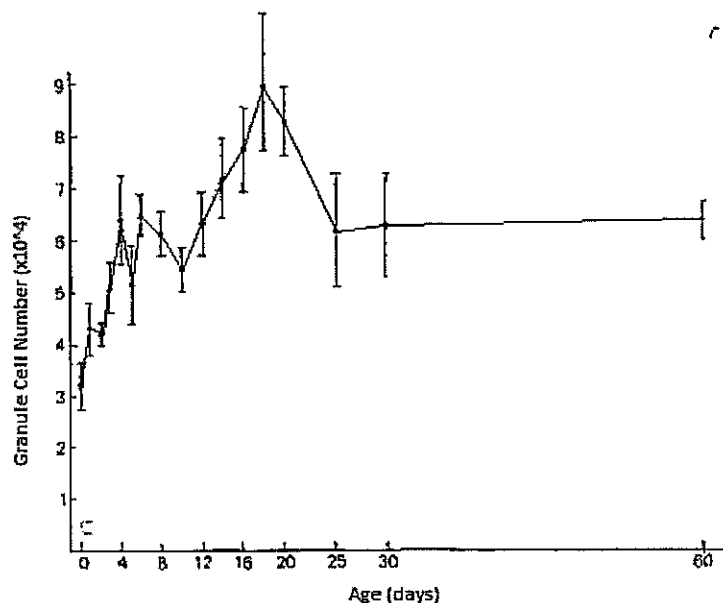


Figura 11: Cambios durante el desarrollo en el número de células granulares de la Capa Granular del Bulbo Olfatorio Accesorio de *Rattus norvegicus* cepa Purdue-Wistar considerando las regiones anterior y posterior como una sola. (Modificado de Rosselli-Austin y col., 1987).

6.3. Análisis Estadísticos y el Número de Muestras

Un problema bastante generalizado durante este trabajo fue la obtención de muestras de las crías de *Octodon degus*, ya que durante el año solo podemos acceder a un número reducido de hembras preñadas de esta especie. Debido a esto el nivel de significancia de los test estadísticos se vio afectado.

En su mayoría los valores obtenidos en el "Wilcoxon matched pairs test" que comparaba las regiones anterior y posterior del Bulbo Olfatorio Accesorio obtenían valores similares, lo que podría deberse al bajo número de muestras.

En el análisis mediante el test de Wilcoxon del Volumen fue observado un *P-value* de 0,027709 en el estadio adulto ($n=6$) con un *coeficiente aBOA/pBOA* de $2,30 \pm 0,44$, mientras el estadio anterior (P150) exhibe una proporción *aBOA/pBOA* de $2,47 \pm 0,71$. La

proporción encontrada en P150 corresponde a un valor mayor que el encontrado en el estadio adulto y por tanto una diferencia mayor entre ambos subdominios, sin embargo, el *P-value* del test de Wilcoxon no mostró valores significativos para un $n=3$.

Debido a lo anterior, la heterogeneidad volumétrica de la Capa de Células Granulares pudiese haber sido detectada en otros estadios pero debido al bajo número de muestras los resultados en el desarrollo los datos obtenidos no son concluyentes y poco puede hacerse referencia a ellos.

Con respecto a la densidad celular de la Capa de Células Granulares, esta muestra valores cercanos a 1,00 en el *coeficiente aBOA/pBOA*, y ningún valor significativo en el test de Wilcoxon; por lo tanto las pequeñas diferencias de densidades entre ambos subdominios podrían deberse a la alta variabilidad de este muestreo y no responderían a diferencias reales. Sin embargo, esta afirmación también requiere de un aumento en el número de crías analizadas para su validez.

Al observar los valores para el número de células granulares de la capa del mismo nombre, se detecta un *P-value* de 0,108810 ($n=3$) y otro de 0,043115 ($n=5$) para valores que mostraban un similar *coeficiente aBOA/pBOA* ($2,99\pm 1,00$ y $3,03\pm 1,23$, respectivamente) (ver Tabla 6), lo que podría asociarse al número de muestras de cada estadio postnatal. Estas proporciones entre ambos subdominios podrían dar cuenta de la existencia de diferencias, las que no son detectadas en el test estadístico.

Considerando las salvedades producto del bajo n de muestreo, puede indicarse que la heterogeneidad numérica y volumétrica de la CGr podría estar presente desde el estadio P15 en *Octodon degus*, y que esta heterogeneidad se acentuaría al llegar a P150.

6.4. Células Mitral/*tufted* y Granulares

Las capas del Bulbo Olfatorio Accesorio mantienen una estrecha interacción; de ellas, la Capa Granular se asocia con la Capa de Células Principales (Mitral/*tufted*) o de proyección secundaria; estas células son las que conectan principalmente con 4 blancos telencéfalicos,

el Núcleo del Lecho de la Estría Terminal, el Núcleo del Lecho del Tracto Olfatorio Accesorio, la Amígdala Medial y el Núcleo Cortical Posteromedial de la Amígdala (ver *Figura 12*), núcleos que median la respuesta frente a odorantes (Brennan, 2004).

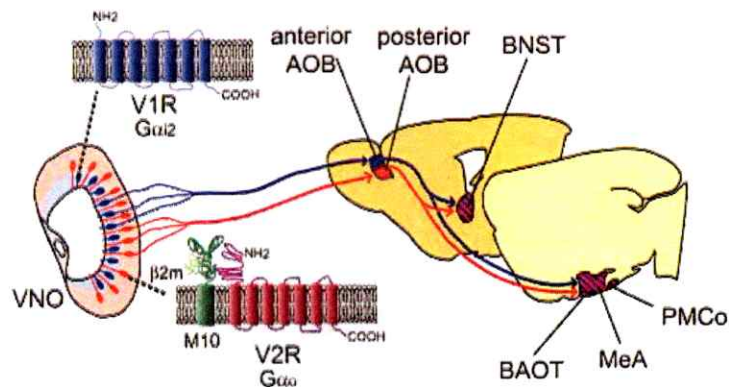


Figura 12: La actividad de las vías del Órgano Vomeronasal es procesada en el Bulbo Olfatorio Accesorio, cuya señal proyecta hacia el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo del tracto olfatorio accesorio, la amígdala medial y el núcleo cortical posteromedial de la amígdala (Brennan, 2004).

Así, un coeficiente interesante de observar es la proporción entre células Mitral/*tufted* y granulares, ya que es una aproximación a cuántas células granulares conectan a una célula mitral o *tufted*, resultado que se observa en la Tabla 2 de la sección de Anexos.

Respecto de la comparación de la proporción entre las células Granulares y Mitral/*tufted* (Gr/MTC), el test de Wilcoxon no mostró diferencias significativas entre subdominios del BOA ($z= 1,603567$, $p=0,108810$, $n=3$). Para comprobar si estas son diferentes se debe aumentar el número de muestras para las mediciones en el número de células MT en animales crecidos en cautiverio.

En la Tabla 3 de la sección “Anexos”, se presenta con un mayor detalle de cada una de las mediciones que fueron resumidas en la Tabla 2 de la misma sección. Esta tabla da cuenta

de que la heterogeneidad de la Capa de Células Granulares no es del todo general en los individuos de una población crecida en cautiverio. Por ejemplo, el individuo A1 muestra una alta heterogeneidad tanto en la Capa de Células principales (2,38) como en la Capa Granular (5,07), a diferencia del individuo A6, que muestra una baja diferencia entre las proporciones anterior y posterior en ambas capas.

El estudio publicado por Rosselli-Austin en 1990 y el de Rochefort de 2002, muestran los efectos que tienen en el desarrollo las condiciones en que crece un animal. Estos estudios muestran que una mayor estimulación sensorial olfatoria puede generar un aumento en el número de células del Bulbo Olfatorio Principal y del Accesorio, como, por ejemplo las células granulares y mitral/*tufted*. Resultados análogos a los obtenidos en experimentos de privación sensorial (Benson *y col.*, 1984). Estos estudios podrían indicar que los resultados observados en la Tabla 3 (*Anexos*) estarían asociados a las condiciones diferenciales en las que crecieron los individuos A1 y A6.

6.5. Inyecciones de BrdU

En este trabajo se planteó como objetivo inicial la estimación de una tasa de incorporación de células granulares, por lo que fue probada la inyección de BrdU y posterior inmunohistoquímica correspondiente. Para generar un protocolo a trabajar en *Octodon degus*, fue probado un protocolo de pulso y caza en dos ocasiones en un modelo de estudio bastante general y sometido a observación en diversos laboratorios del mundo con resultados exitosos, *Rattus norvegicus*. Luego de no obtener resultados en estos casos se decidió desistir (*Ver Figura 1 de la sección de Anexos*). En ambas ocasiones el procedimiento fue el mismo.

En ese sentido, la metodología utilizada es bastante generalizada en este tipo de experimentos (Ming y Song, 2005; Ming y Song, 2011) y ha sido probado en otros animales modelo con resultados exitosos (Shingo *y col.*, 2003; Oboti *y col.*, 2009; Núñez-Parra *y col.*, 2011; Oboti *y col.*, 2011; Corona *y col.*, 2016).

Paralelamente también se realizó la inmunohistoquímica anti-BrdU en cortes coronales del Órgano Vomeronasal (*Ver Figura 2 de la sección de Anexos*) y la marca específica para el anticuerpo fue hallada. Así se puede señalar que el procedimiento logró incorporar el BrdU al interior de la sangre del animal. Sin embargo, con esta prueba no es posible determinar claramente la causa de la falla, ya que una de las razones puede haber sido que el BrdU no pasó la barrera hematoencefálica. Para determinar la causa de la falla debería haberse probado la inmunohistoquímica anti-BrdU en otro nicho neurogénico del cerebro (como el *Gyrus dentatus*), experimento que en esta ocasión no fue realizado.

La ausencia de marca en el BOA se puede atribuir a dos factores:

- 1) La edad de las ratas de este estudio era desconocida y por lo tanto no se puede asegurar la mantención de la proliferación en el BOA en las ratas utilizadas. Se ha observado en esta especie (en la cepa Purdue-Wistar) hasta P60 el crecimiento del BOA y la incorporación de granulares (Bayer, 1983; Rosselli-Austin *y col.*, 1987). Debido a lo anterior, un error en este experimento pudo haber sido la edad de las ratas utilizadas en este trabajo (se sabe que las ratas pesaron entre 250 y 390 gramos).
- 2) El tiempo que se utilizó entre la inyección de BrdU y la muerte de cada individuo, el que fue datado entre 28 y 30 días, lo que pudo influir en el resultado; se ha descrito la dependencia entre el tiempo de migración de los neuroblastos desde el *rostral migratory stream* (RMS) hasta la Capa de Células Granulares y la edad del animal, siendo el óptimo para animales de P60 la observación 20 días postinyección, ya que después de este tiempo desaparece la marca BrdU+ en el RMS.

Los resultados obtenidos por Lemasson y colaboradores (2005) estarían indicando que las células que se incorporan al Bulbo Olfatorio tienen diferentes características asociadas al momento en que tuvieron su origen: las células con origen en P3 muestran una mayor longevidad que las que tuvieron su origen a los P60. Esto estaría indicando que no sólo la proliferación de estas células disminuye con la edad del animal sino que su longevidad también cambia de la misma forma.

Esta característica podría estar asociada a una disminución de la concentración de factores de crecimiento esenciales, paralelo al decrecimiento de la tasa de proliferación y la disminución de tamaño de los nichos neurogénicos, debido a que la mitosis de las células madres no es del todo simétrica (Muschler y col. 2003).

La ausencia de marca de BrdU podría deberse a la edad de los animales y el tiempo postinyección utilizado en este trabajo, por lo tanto se recomienda que las próximas pruebas de este tipo estos factores sean considerados antes de comenzar la etapa experimental.

7. CONCLUSIÓN

A modo de cierre, este trabajo sienta las bases para señalar la existencia de una heterogeneidad a nivel anatómico en la Capa de Células Granulares del BOA de *Octodon degus* que posiblemente sea mantenida a lo largo del desarrollo postnatal y la vida del animal.

Las células granulares estarían respondiendo a los cambios generales que ocurren en todo el Bulbo Olfatorio Accesorio por lo que no estarían participando en la formación de la heterogeneidad. De esta forma, las de células Mitral/*tufted* podrían influenciar la incorporación de células granulares durante el desarrollo.

Octodon degus ha demostrado ser un buen modelo de estudio y ha contribuido en otras áreas de investigación (Braid y col., 2012), sin embargo, poco se conoce de como el desarrollo afecta los procesos neurogénicos del BOA de esta especie. Así este trabajo es un acercamiento al estudio ontogénico de los procesos de neurogénesis en un animal no convencional, que debido a sus características se ha vuelto un interesante modelo a estudiar.

8. BIBLIOGRAFIA

- Altman, J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical Record*, 145(4): 573-591.
- Altman, J., Das, G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3): 319-335.
- Altman, J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4): 433-457.
- Bayer, S. A. 1983. 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Experimental Brain Research*, 50(2-3): 329-340.
- Barber, P. C., Raisman, G. 1978. Replacement of receptor neurones after section of the vomeronasal nerves in the adult mouse. *Brain research*, 147(2), 297-313.
- Benson, T. E., Ryugo, D. K., Hinds, J. W. 1984. Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system: a light and electron microscopic, morphometric analysis. *The Journal of neuroscience*, 4(3): 638-653.
- Bonfanti, L., Peretto, P. 2011. Adult neurogenesis in mammals—a theme with many variations. *European Journal of Neuroscience*, 34(6): 930-950.
- Bovetti, S., Peretto, P., Fasolo, A., De Marchis, S. 2007. Spatio-temporal specification of olfactory bulb interneurons. *Journal of molecular histology*, 38(6), 563-569.
- Braidy, N., Munoz, P., Palacios, A. G., Castellano-Gonzalez, G., Inestrosa, N. C., Chung, R. S., Sachdev, P., Guillemin, G. J. 2012. Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *Journal of neural transmission*, 119(2): 173-195.
- Brennan, P. A., Kendrick, K. M., Keverne, E. B. 1995. Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience*, 69(4): 1075-1086.

- Brennan, P. A. 2004. The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Hormones and behavior*, 46(3): 231-240.
- Brennan, P. A., Keverne, E. B. 2004. Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Current Biology*, 14(2): R81-R89.
- Buck, L., Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1): 175-187.
- Corona, R., Retana-Márquez, S., Portillo, W., Paredes, R. G. 2016. Sexual Behavior Increases Cell Proliferation in the Rostral Migratory Stream and Promotes the Differentiation of the New Cells into Neurons in the Accessory Olfactory Bulb of Female Rats. *Frontiers in neuroscience*, 10.
- Delgado, S. E., Fernández-Aburto, P., Mpodozis, J. 2013, Octubre; Heterogeneous distribution of Mitral/tufted cells of the Accessory Olfactory Bulb in *Octodon degus* Rodentia: Hystricognathi. Póster presentado en el IX Congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencias, Valparaíso, Chile.
- Egger, V., Urban, N. N. 2006. Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Seminars in cell and developmental biology* 17(4): 424-432.
- Fernández-Aburto, P. 2016. Desarrollo de la heterogeneidad morfométrica entre las vías vomeronasales V1R y V2R en mamíferos: El caso de *Octodon degus* (Tesis doctoral). Programa de doctorado en ciencias mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Figueres-Oñate, M., Gutiérrez, Y., López-Mascaraque, L. 2014. Unraveling Cajal's view of the olfactory system. *Frontiers in neuroanatomy*, 8.
- Gall C, Seroogy KB, Brecha N. 1986. Distribution of VIP- and NPY-like immunoreactivities in rat main olfactory bulb. *Brain Res* 374(2):389-394.
- Goodman, C. S., Shatz, C. J. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell*, 72: 77-98.

- Gratzner, H. G., Leif, R. C., Ingram, D. J., Castro, A. 1975. The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Experimental cell research*, 95(1): 88-94.
- Graziadei, P. P. C., Monti-Graziadei, G. A. 1985. Neurogenesis and Plasticity of the Olfactory Sensory Neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 457(1): 127-142.
- Gross, C. G. 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1): 67-73.
- Halpern, M., Martinez-Marcos, A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in neurobiology*, 70(3): 245-318.
- Hamilton, K. A., Heinbockel, T., Ennis, M., Szabo, G., Erdelyi, F., Hayar, A. 2005. Properties of external plexiform layer interneurons in mouse olfactory bulb slices. *Neuroscience*, 133(3): 819-829.
- Heck, N., Golbs, A., Riedemann, T., Sun, J. J., Lessmann, V., Luhmann, H. J. 2008. Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 18(6): 1335-1349.
- Hinds, J. W., McNelly, N. A. 1977. Aging of the rat olfactory bulb: growth and atrophy of constituent layers and changes in size and number of mitral cells. *Journal of Comparative Neurology*, 171(3): 345-367.
- Jahr, C. E., Nicoll, R. A. 1980. Dendrodendritic inhibition: demonstration with intracellular recording. *Science*, 207(4438): 1473-1475.
- Jia, C., Halpern, M. 1996. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins G α_2 and G α_a and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain research*, 719(1): 117-128.
- Kaba, H., Keverne, E. B. 1988. The effect of microinfusions of drugs into the accessory olfactory bulb on the olfactory block to pregnancy. *Neuroscience*, 25(3): 1007-1011.

- Kang, N., Baum, M.J., Cherry, J. A. 2011. Different Profiles of Main and Accessory Olfactory Bulb Mitral/Tufted Cell Projections Revealed in Mice Using an Anterograde Tracer and a Whole-Mount, Flattened Cortex Preparation, *Chem. Senses* 36(3): 251–260.
- Katz, L. C., Shatz, C. J. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274(5290): 1133.
- Krautwurst, D., Yau, K. W., Reed, R. R. 1998. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell*, 95(7): 917-926.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., Gage, F. H. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 16(6): 2027-2033.
- Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. 1994 Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Experimental Brain Research* 99(2): 191–204.
- Larriva-Sahd, J. 2008. The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *Journal of Comparative Neurology*, 510(3): 309-350
- Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J. C., Lledo, P. M. 2005. Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *The Journal of neuroscience*, 25(29): 6816-6825.
- Meisami, E., Bhatnagar, K. P. 1998. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy research and technique*, 43(6): 476-499.
- Mennerick, S., Zorumski, C. F. 2000. Neural activity and survival in the developing nervous system. *Molecular neurobiology*, 22(1-3): 41-54.
- Ming, G. L., Song, H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28: 223-250.
- Ming, G. L., Song, H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), 687-702.

- Muschler, G. F., Midura, R. J., Nakamoto, C. 2003. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. *BioMed Research International*, 2003(3): 170-193.
- Mutterer, J., Zinck, E. 2013. Quick - and - clean article figures with FigureJ. *Journal of microscopy*, 252(1): 89-91.
- Nuñez-Parra, A., Pugh, V., Araneda, R. C. 2011. Regulation of adult neurogenesis by behavior and age in the accessory olfactory bulb. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 47(4): 274–285.
- Oboti, L., Savalli, G., Giachino, C., De Marchis, S., Panzica, G. C., Fasolo, A., Peretto, P. 2009. Integration and sensory experience-dependent survival of newly-generated neurons in the accessory olfactory bulb of female mice. *European Journal of Neuroscience*, 29(4): 679-692.
- Oboti, L., Schellino, R., Giachino, C., Chamero, P., Pyrski, M., Leinders-Zufall, T., Frank Zufall F., Fasolo A., Peretto, P. 2011. Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb promote mate recognition in female mice. *Frontiers in neuroscience*, 5: 113.
- Oboti, L., Peretto, P. 2015. How neurogenesis finds its place in a hardwired sensory system. Adult neurogenesis twenty years later: physiological function versus brain repair. *Frontiers in Neuroscience* 9:71. doi: 10.3389/fnins.2015.00071.
- Peretto, P., Schellino, R., De Marchis, S., Fasolo, A. 2014. The Interplay between Reproductive Social Stimuli and Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Neural plasticity* vol. 2014: Article ID 497657
- Peretto, P., Bonfanti, L. 2015. Adult neurogenesis 20 years later: physiological function vs. brain repair. *Frontiers in neuroscience*, 9:71. DOI 10.3389/fnins.2015.00071
- Rall, W., Shepherd, G. M., Reese, T. S., Brightman, M. W. 1966. Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Experimental neurology*, 14(1): 44-56.

- Reynolds, J., Keverne, E. B. 1979. The accessory olfactory system and its role in the pheromonally mediated suppression of oestrus in grouped mice. *Journal of reproduction and fertility*, 57(1): 31-35.
- Rocheffort, C., Gheusi, G., Vincent, J. D., Lledo, P. M. 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience*, 22(7): 2679-2689.
- Rosselli-Austin, L., Hamilton, K. H., Williams, J. 1987. Early postnatal development of the rat accessory olfactory bulb. *Developmental Brain Research*, 36(2): 304-308.
- Rosselli-Austin, L., Williams, J. 1990. Enriched neonatal odor exposure leads to increased numbers of olfactory bulb mitral and granule cells. *Developmental Brain Research*, 51(1): 135-137.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7): 671-675.
- Schoppa, N. E., Urban, N. N. 2003. Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends in neurosciences*, 26(9): 501-506.
- Shepherd, G. M., Chen, W. R., Willhite, D., Migliore, M., Greer, C. A. 2007. The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain research reviews*, 55(2): 373-382.
- Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross J.C., Weiss, S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, 299(5603): 117-120.
- Simpson K.L., Sweazey, R.D. 2013. *Olfaction and Taste*. En Haines, D. E., Ard, M. D. eds. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*, pp 314-320, Elsevier Health Sciences.
- Spitzer, N. C. 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120): 707-712.

- Suárez, R., Mpodozis, R. 2009. Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb AOB of *Octodon degus* Rodentia: Hystricognathi, *Behavioural Brain Research* 198(2): 306-312.
- Suárez R, Santibáñez R, Parra D, Coppi AA, Abrahão LM, Sasahara TH, Mpodozis J. 2011a. Shared and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semi aquatic capybara. *Journal of Anatomy* 218(5): 558-65.
- Suárez, R., Fernández-Aburto, P., Manger, P. R., Mpodozis, J. 2011b. Deterioration of the G α Vomeronasal Pathway in Sexually Dimorphic Mammals. *PLoS one*, 6(10): e26436
- Sülz, L., Astorga, G., Bellette, B., Iturriaga, R., Mackay-Sim, A., Bacigalupo, J. 2009. Nitric oxide regulates neurogenesis in adult olfactory epithelium *in vitro*. *Nitric Oxide*, 20(4): 238-252.
- Taupin, P. 2007. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews*, 53(1): 198-214.
- U.S. Department of Health and Human Services. 1985. Principles of Laboratory Animal Care. *National Institute of Health* 86 (23).
- Wang, Z., Hulihan, T. J., Insel, T. R. 1997. Sexual and social experience is associated with different patterns of behavior and neural activation in male prairie voles. *Brain research*, 767(2): 321-332.
- Weiler, E., McCulloch, M. A., Farbman, A. I. 1999. Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development. *European Journal of Neuroscience*, 11(2), 700-711.
- West, M. J., Slomianka, L. H. J. G., Gundersen, H. J. G. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, 231(4): 482-497.
- Wu, J. H., Han, Y. T., Yu, J. Y., Wang, T. W. 2013. Pheromones from males of different familiarity exert divergent effects on adult neurogenesis in the female accessory olfactory bulb. *Developmental neurobiology*, 73(8): 632-645.

-Yu, C. R., Power, J., Barnea, G., O'Donnell, S., Brown, H. E., Osborne, J., Axel, R., Gogos, J. A. 2004. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*, 42(4): 553-566.

9. ANEXOS

		Número de Células (células)	Densidad Celular (células/mm ³)	C.E. Gundersen (Número y Densidad)	C.E. Cruz-Orive (Número y Densidad)	Volumen (cm ³)	C.E. Gundersen (Volumen)
A1 (adulto)	aBOA	185825	587563	0,030	0,01686	0,3970	0,010
	pBOA	36649	417508	0,070	0,03226	0,1585	0,017
A2 (adulto)	aBOA	180995	585859	0,030	0,05403	0,3761	0,012
	pBOA	69417	587002	0,060	0,08889	0,1358	0,015
A4 (adulto)	aBOA	-	-	-	-	0,3474	0,011
	pBOA	-	-	-	-	0,1565	0,013
A6 (adulto)	aBOA	145628	580360	0,040	0,04137	0,2599	0,011
	pBOA	84143	482571	0,050	0,02182	0,1630	0,012
A7 (adulto)	aBOA	167861	661290	0,030	0,00521	0,2979	0,012
	pBOA	56378	540123	0,060	0,00191	0,1238	0,013
M633 (adulto)	aBOA	240411	693355	0,030	0,00340	0,4487	0,005
	pBOA	86592	612795	0,050	0,05055	0,1718	0,013
R2M1 (P15)	aBOA	142548	606633	0,030	0,05028	0,2586	0,010
	pBOA	90976	758759	0,040	0,05277	0,1776	0,011
R4M3 (P15)	aBOA	100868	615848	0,040	0,03683	0,1686	0,012
	pBOA	29659	617284	0,070	-	0,0616	0,016
R4M4 (P15)	aBOA	111121	619658	0,040	0,05594	0,2141	0,009
	pBOA	45617	567901	0,060	0,04155	0,0916	0,014
R3H3 (P30)	aBOA	95083	591866	0,040	0,00205	1,7950	0,011
	pBOA	59736	506507	0,050	0,00269	1,1333	0,019
R3H2 (P30)	aBOA	45328	556878	0,050	-	0,1978	0,020
	pBOA	26251	523008	0,070	-	0,0680	0,022
M0 (P30)	aBOA	90555	744018	0,030	0,01204	0,1067	0,020
	pBOA	32939	637681	0,050	0,00505	0,0693	0,022
R5H2 (P60)	aBOA	136873	543032	0,030	0,05005	0,2763	0,009
	pBOA	43071	425240	0,060	0,04086	0,1076	0,015
R3H2 (P60)	aBOA	186260	605775	0,040	0,05907	0,3316	0,010
	pBOA	83454	524796	0,050	0,06699	0,1461	0,013
R3H3 (P60)	aBOA	166278	613105	0,030	0,00330	0,3800	0,010
	pBOA	102472	548765	0,030	0,00263	0,2382	0,009

Tabla 1: Datos obtenidos a partir de las mediciones estereológicas, los datos se muestran sin estandarizar y con los respectivos Coeficientes de Error (C.E.) calculados de dos diferentes maneras para la mayoría de los casos (continua)

		Número de Células (células)	Densidad Celular (células/mm ³)	C.E. Gundersen (Número y Densidad)	C.E. Cruz-Orive (Número y Densidad)	Volumen (cm ³)	C.E. Gundersen (Volumen)
M3 (P150)	aBOA	158777	659515	0,030	0,03847	0,2999	0,011
	pBOA	84260	506173	0,040	0,00915	0,1806	0,011
H1 (P150)	aBOA	99992	635872	0,040	0,01571	0,2464	0,017
	pBOA	30641	461376	0,070	0,04983	0,0824	0,018
M2 (P150)	aBOA	109747	569366	0,040	0,00698	0,2359	0,016
	pBOA	28734	429630	0,070	0,00862	0,0850	0,022

Tabla 1: Datos obtenidos a partir de las mediciones estereológicas, los datos se muestran sin estandarizar y con los respectivos Coeficientes de Error (C.E.) calculados de dos diferentes maneras para la mayoría de los casos (continuación)

	aBOA	pBOA	aBOA/pBOA
<i>Mitral/tufted</i>	8324,71±1220,96	4177,10±1178,71	2,05±0,36
Granular	76939,56±20232,96	28215,14±10725,01	3,14±1,73
CGr/CMT	20,99±5,16	15,36±5,48	

Tabla 2: Comparación de las proporciones existentes entre la Capa de Células Mitral/*tufted* y de Células Granulares, entre los subdominios anterior y posterior del Bulbo Olfatorio de *Octodon degus* adultos crecidos en cautiverio. Para esta estimación se utilizaron los datos de los individuos A1, A2 y A6.

	CMT			CGr			CGr/CMT	
	aBOA	pBOA	aBOA/pBOA	aBOA	pBOA	aBOA/pBOA	aBOA	pBOA
A1	8795,7	3688,2	2,38	185825,28	36648,89	5,07	21,13	9,94
A2	6938,4	3321,5	2,09	180994,91	69416,67	2,61	26,09	20,90
A6	9240,0	5521,6	1,67	145628,09	84142,65	1,73	15,76	15,24

Tabla 3: Detalles de la comparación respecto de las proporciones existentes entre la Capa de Células Mitral/*tufted* y de Células Granulares, entre los subdominios anterior y posterior del Bulbo Olfatorio de los individuos A1, A2 y A6. CMT: Capa de Células Mitral/*tufted*, CGr: Capa de Células Granulares, aBOA: Región anterior del Bulbo Olfatorio Accesorio, pBOA: Región posterior del BOA, aBOA/pBOA: Coeficiente anterior/posterior.

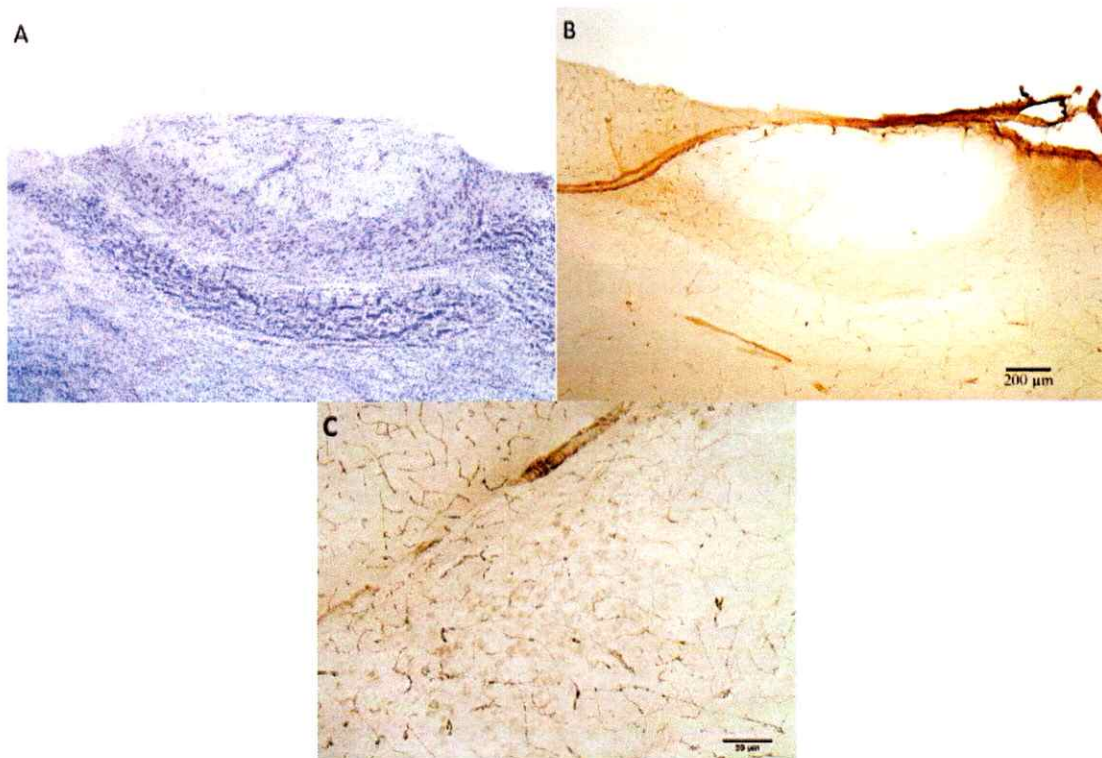


Figura 1: Fotomicrografía (4X) del Bulbo Olfatorio Accesorio de *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley. A) Tinción de Cresil-Violeta, B) Inmunohistoquímica anti BrdU a 4X, C) Aumento de la inmunohistoquímica anti BrdU a 40X.

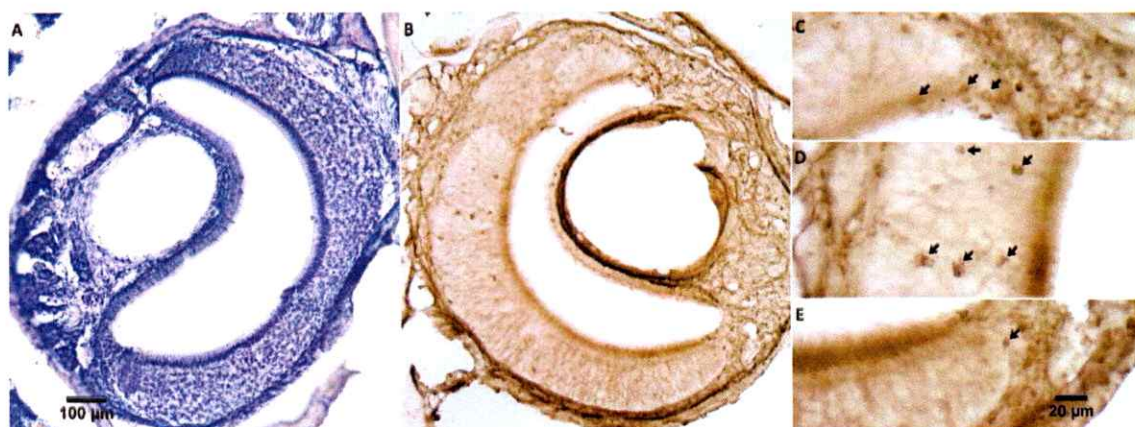


Figura 2: Fotomicrografía del Órgano Vomeronasal de *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley. A) Tinción de Cresil-Violeta a 10X, B) Inmunohistoquímica anti BrdU del OVN a 10X, C), D) y E) corresponden a aumentos B a 40X.