



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLÓGÍA**

“ESTUDIO FISIOLÓGICO DEL LIMBO OLFATORIO DE LA RATA ADULTA”

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

M. en C. VICTOR MANUEL VARGAS BARROSO

TUTOR PRINCIPAL

DR JORGE LARRIVA SAHD

INB

COMITÉ TUTOR

DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA

INB

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

FM

CAMPUS JURIQUILLA, UNAM NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Actualmente, es aceptado que los sistemas olfatorio principal y accesorio (SOP y SOA, respectivamente) manifiestan respuestas sobrelapadas ante la presencia de odorantes y feromonas. Durante este estudio, se llevaron a cabo registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en modalidad de célula completa con el objetivo de definir si existen interacciones entre los primeros relevos centrales de estos sistemas: el bulbo olfatorio principal (BOp) y accesorio (BOA). Se evaluaron las respuestas de neuronas principales (NPs) del BOA anterior (BOAa) ante la aplicación de estímulos eléctricos extracelulares en el BOp postero-dorsal. Adicionalmente, aplicamos estimulación eléctrica en el BOA posterior (BOAp) para determinar si hay interacciones neuronales entre ambas mitades del BOA; registros complementarios fueron hechos en el BOAp para evaluar si las interacciones eran recíprocas. Encontramos que neuronas del BOAa ($n= 6$) emiten colaterales hacia el BOp postero-dorsal, dada la activación antidrómica de estas células ante la estimulación del BOp en presencia de inhibidores glutamatérgicos (CNQX y APV). Las NPs del BOAa respondieron con potenciales excitatorios post-sinápticos (PEPS; $n= 6$) o con potenciales de acción (PAs) antidrómicos ($n= 8$) a los estímulos aplicados en el BOAp; mientras que en los registros complementarios de BOAp ($n= 20$) 7 y 2 NPs manifestaron respuestas antidrómicas y PEPS, respectivamente. La inspección de las neuronas registradas a nivel del microscopio óptico reveló que en efecto, neuronas del BOAa envían colaterales al BOp postero-dorsal y que ambas mitades del BOA están recíprocamente conectadas a través de axones que cruzan la *línea alba*. Reportamos también la presencia de una sub-población de NPs del BOA que exhiben ráfagas de PAs rítmicas, dependientes de voltaje y generadas endógenamente. Este proyecto permite concluir que: 1) hay una sub-población de NPs del BOAa que emite pequeñas colaterales a la región del BOp postero-dorsal, 2) que ambas mitades del BOA se encuentran recíprocamente conectadas y que 3) un porcentaje de NPs (~25%) del BOA corresponde a neurona de tipo marcapaso previamente no descritas en el BOA

SUMMARY

It is accepted that the main- and accessory- olfactory systems exhibit overlapping responses to pheromones and odorants. We performed whole-cell patch-clamp recordings in adult rat olfactory bulb slices to define a possible interaction between the first central relay of these systems: the accessory olfactory bulb (AOB) and the main olfactory bulb (MOB). This was tested by applying electrical field stimulation in the dorsal part of the MOB while recording large principal cells (LPCs) of the anterior AOB (aAOB). Additional recordings of LPCs were performed at either side of the plane of intersection between the aAOB and posterior-AOB (pAOB) halves, or *linea alba*, while applying field stimulation to the opposite half. A total of 92 recorded neurons were filled during whole-cell recordings with biocytin and studied at the light microscope. Neurons located in the aAOB (n = 6, 8%) send axon collaterals to the MOB since they were antidromically activated in the presence of glutamate receptor antagonists (APV and CNQX). Recorded LPCs evoked orthodromic excitatory post-synaptic responses (n = 6, aAOB; n = 2, pAOB) or antidromic action potentials (n = 8, aAOB; n = 7, pAOB) when applying field stimulation to the opposite half of the recording site (e.g., recording in aAOB; stimulating in pAOB, and vice-versa). Observation of the filled neurons revealed that indeed, LPCs send axon branches that cross the *linea alba* to resolve in the internal cellular layer. Additionally, LPCs of the aAOB send axon collaterals to dorsal-MOB territory. Notably, while performing AOB recordings we found a sub-population of neurons (~25% of the total) that exhibited voltage-dependent bursts of action potentials. Our findings support the existence of: 1) a direct projection from aAOB LPCs to dorsal-MOB, 2) physiologically active synapses linking aAOB and pAOB, and 3) pacemaker-like neurons in both AOB halves.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia al Dr. Benito Ordaz Sánchez por enseñarme la técnica en la que se basa todo este trabajo, sin su ayuda no hubiera podido hacer mucho, pero agradezco y valoro más su amistad.

Agradezco al Dr. Fernando Peña Ortega por darme la oportunidad de hacer experimentos en su laboratorio sin ningún tipo de restricción, por el apoyo brindado durante todo el doctorado y por los consejos que me ha dado; agradezco de igual manera a la Dra Rosalinda Guevara Guzmán, por apoyarme a lo largo del doctorado, por aportar opiniones y consejos valiosos durante los tutelares de este ciclo que se termina.

Agradezco de manera especial al Dr. Jorge Larriva Sahd, mi tutor principal. Por brindarme toda su confianza, por apoyarme siempre y por ser una persona ejemplar; después de 7 años en el laboratorio, no puedo más que agradecer y estar seguro de que haber venido a su laboratorio fue la mejor decisión que pude tomar.

Agradezco a la M. en C. Gema Martínez Cabrera, por apoyarme siempre en lo que fuera necesario.

Agradezco a la M. en C. Leonor Casanova Rico por su gran apoyo en todos los trámites administrativo.

Agradezco a todos los doctores del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con los que he platicado o tomado clases y/o consejos.

Agradezco a Fernando Rodríguez Flores y a Alejandra Castilla León por siempre brindarme un servicio excelente en el bioterio.

Agradezco el apoyo brindado por parte del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al CONACyT, número de becario 289638.

Agradezco a la dirección general de estudios de posgrado de la UNAM, no. cuenta 511007011.

ÍNDICE

• Resumen.....	I
• Summary.....	II
• Agradecimientos.....	III
• Lista de abreviaturas.....	IV
• Introducción	1
• Antecedentes	6
• Epitelio olfatorio.....	6
• Bulbo olfatorio principal.....	7
• Órgano vomeronasal.....	15
• Epitelio vomeronasal.....	18
• Bulbo olfatorio accesorio.....	22
• Interacciones entre el SOA y el SOP, respuestas compartidas.....	26
• Objetivo	32
• Justificación	32
• Estrategia experimental y métodos	33
• Animales.....	33
• Obtención de rebanadas viables de encéfalo y registro electrofisiológico.....	33
• Histoquímica.....	36
• Resultados	38
• Discusión	51
• Conclusiones	59
• Bibliografía	60
• Índice de figuras	75

LISTA DE ABREVIATURAS

Bulbo olfatorio accesorio.....	BOA
Bulbo olfatorio accesorio anterior.....	BOAa
Bulbo olfatorio accesorio posterior.....	BOAp
Bulbo olfatorio principal.....	BOp
Capa celular externa.....	CCE
Capa glomerular.....	CGl
Capa plexiforme externa.....	CPE
Epitelio olfatorio.....	EO
Familia de receptores asociados a trazas de amina.....	TAARs
Familia de receptores a péptidos formilados.....	FPRs
Familia de receptores vomeronasales 1.....	V1R
Familia de receptores vomeronasales 2.....	V2R
Limbo olfatorio.....	LO
Líquido cefalorraquídeo artificial modificado.....	LCRAm
Neurona empenachada(s).....	EMs
Neurona granular(es).....	Grs
Neurona mitral(es).....	MIs
Neuronas principales del BOA.....	NPs
Órgano vomeronasal.....	OVN
Potencial(es) de acción.....	PAs
Potenciales excitatorios post-sinápticos.....	PEPS
Sistema nervioso central.....	SNC
Sistema olfatorio accesorio.....	SOA
Sistema olfatorio principal.....	SOP
Tracto olfatorio lateral.....	TOL

I. Introducción

Los seres vivos poseemos diversos sistemas sensoriales que en conjunto nos permiten interactuar con el ambiente que nos rodea (Wolfson & Landry, 1998; Elhilali & Shamma, 2008; Sosulski et al., 2011). Estas interacciones se dan gracias a que algunas de las manifestaciones energéticas (estímulos) que son susceptibles de incidir en un individuo son capaces de ser detectadas por dichos sistemas sensoriales, hecho que permite a los seres vivos dotados de un sistema nervioso generar representaciones internas del mundo exterior (Sosulski et al., 2011). Una vez que se ha llevado a cabo la detección del estímulo en un órgano sensorial (p. ej., retina, epitelio olfatorio, piel, cóclea o papilas gustativas), el sistema nervioso lleva a cabo un proceso de transducción, en el que las cualidades de los estímulos, como pueden ser el color o la orientación de un objeto (visión; Crouzet & Serre, 2011; Wolfson & Landy, 1998), la concentración o discriminación de un olor (olfato; Banerjee et al., 2015; Rokni et al., 2014) y la amplitud o la frecuencia de vibraciones en el aire (audición; Elhilali & Shamma, 2008; McDermott, 2009), son representadas por un código de actividad eléctrica neuronal. Las características del estímulo -contenidas en patrones determinados de actividad neuronal- son conducidas jerárquicamente a regiones cerebrales progresivamente más complejas en donde finalmente ocurre la percepción subjetiva de las sensaciones.

En la naturaleza, existe una proporción considerable de animales que guían algunas de sus conductas basados en la percepción de moléculas (químicos) que se desprenden de otros individuos u objetos; éstas moléculas son comúnmente denominadas odorantes (Dicke & Takken, 2006; Lledo et al., 2005) y su detección por parte de un sistema sensorial especializado (el olfato) le permite a dichos individuos identificar alimentos, congéneres y potenciales depredadores (Howard et al., 1968; Blaustein, 1981). Otro tipo de químicos fundamentales para la comunicación animal, sobre todo en roedores, son las feromonas (ver abajo; Boschhat et al., 2002; Del Punta et al., 2002a). La unión de odorantes y feromonas a sus respectivos receptores (proteínas de membrana) en el epitelio olfatorio (EO) o en el órgano vomeronasal (OVN), ubicados ambos dentro de la cavidad nasal, generará un proceso de transducción, es decir, ocurrirá una conversión del tipo de energía que caracteriza al estímulo –en este caso química– en otro tipo de energía (para los seres vivos dotados de sistema nervioso en energía eléctrica) (Buck & Axel, 1991).

El estímulo, que es internalizado una vez que ha ocurrido el proceso de transducción, será conducido (a

través de la vía anatómica correspondiente) en forma de un código neuronal a las regiones correspondientes en el sistema nervioso central (SNC), en donde eventualmente se generará una representación interna de la experiencia sensorial que le permite al sujeto obtener información de algunos atributos de la naturaleza, como depredadores y comida en el caso de la comunicación olfativa (Buck, 1996; Haberly, 2001), o de estados sociales de otros individuos de la misma especie encaminados a asegurar la supervivencia y la reproducción, en el caso de las feromonas (Boschat et al., 2002; Del Punta et al., 2002a).

Los olores

Entre los grupos de vertebrados que pueblan la Tierra existe un grupo de mamíferos que utiliza la percepción de odorantes como principal indicador de lo que ocurre en torno a ellos (Howard et al., 1968; Blaustein, 1981), éstos mamíferos son conocidos como macrosmáticos y a diferencia de los primates, que son mamíferos cuyas conductas se basan principalmente en la obtención de información visual (Laska et al., 2000), los mamíferos macrosmáticos guían sus conductas y el reconocimiento de otros individuos, lugares u objetos preferentemente por medio de la inspección olfativa (Reece, 2009).

Las neuronas sensoriales que residen en el EO conducen sus axones hacia el bulbo olfatorio principal (BOp; Fig. 1) y establecen contactos sinápticos excitatorios con procesos neuronales ubicados en los glomérulos (ver abajo; Gire et al., 2012). El BOp es una estructura telencefálica organizada a manera de capas de la siguiente manera: en la porción superficial se encuentran la capa glomerular (CGl), cuya estructura está constituida por un neuropilo que aloja los procesos centrales (axón) de las neuronas sensoriales, las dendritas apicales de neuronas principales -mitrales (MI) y empenachadas (EM)- y los procesos dendríticos y axonales de interneuronas (Pinching & Powell, 1971; Shepherd, 1972). Por debajo de los glomérulos se ubica la capa plexiforme externa (CPE), que como su nombre lo indica tiene una alta densidad de procesos neuronales, es hipocelular y contiene los cuerpos neuronales de las neuronas EMs así como también dendritas basales y apicales de neuronas MIs y granulares (Grs), respectivamente (Shepherd, 1972).

La capa MI se encuentra en posición ventral a la CPE, y contiene de manera exclusiva los cuerpos de las neuronas MIs (Shepherd, 1972). Por debajo de la capa MI se ubica una segunda capa plexiforme, denominada interna; ésta es más delgada que la CPE y contiene las fibras colaterales de las neuronas

EMs, botones terminales de fibras centrífugas y procesos dendríticos y axonales de neuronas profundas de axón corto (Valverde, 1965; Eyre et al., 2008). Por otro lado, las dendritas apicales de las neuronas Grs atraviesan esta capa de manera radial (Shepherd, 1972).

Finalmente, la capa más profunda del BOp se denomina granular, en ella se encuentra la población neuronal más numerosa del BOp (Levine & Marcillo, 2008; Shepherd, 1972), las llamadas células Grs, que son neuronas locales, o interneuronas que generalmente ejercen una acción inhibitoria sobre su blanco post-sináptico y juegan un papel fundamental en el procesamiento de la información olfativa (Hirata et al., 1964; Yokoi et al., 1995; Galán et al., 2006; Schoppa, 2006; Arevian et al., 2008; Burton & Urban, 2015). La información de los odorantes que es procesada -en el BOp- a nivel de los glomérulos y de la capa granular, eventualmente será conducida, a través de potenciales de acción (PAs) generados por neuronas MIs y EMs, a las áreas corticales correspondientes ubicadas en el lóbulo temporal (Ojima, 1984; Sosulski et al., 2011).

Las feromonas

Ahora bien, existe otro tipo de estímulos de naturaleza química que son detectados en un órgano sensorial que, al igual que el EO se encuentra dentro de la cavidad nasal y recibe el nombre OVN (Fig. 2). La estructura de éste último y las proyecciones de los procesos centrales de sus neuronas sensoriales (que serán discutidas con detalle más adelante) difieren considerablemente de la estructura del sistema olfatorio principal (SOP), lo que ha sugerido una segregación funcional para ambos sistemas (Raisman, 1971; Halpern & Martínez-Marcos, 2003; Tirindelli et al., 2009).

El OVN detecta moléculas que son secretadas por otros individuos y que tienen que disolverse en la mucosa nasal para poder unirse a sus receptores respectivos; en última instancia, dicha molécula tiene la capacidad de generar una respuesta fisiológica en el individuo receptor (Halpern & Martínez-Marcos, 2003; Tirindelli et al., 2009). Las proyecciones -axones- del OVN se dirigen a una estructura que también tiene un arreglo laminar y que se ubica en la porción dorsal y posterior del BOp, dicha estructura ha sido denominada bulbo olfatorio accesorio (BOA; Larriva-Sahd, 2008). La organización anatómica del BOA es similar a la del BOp; sin embargo, estudios citoarquitectónicos detallados han demostrado que hay diferencias importantes con respecto al BOp e incluso se ha propuesto modificar la nomenclatura de las capas celulares debido a las disparidades en la organización celular y en las

poblaciones neuronales presentes en el BOA (Fig. 4; Larriva-Sahd, 2008).

En 1959, los entomólogos Peter Karlson y Martin Lüscher acuñaron el término *feromona* para referirse a ciertas sustancias biológicamente activas que son secretadas “hacia afuera” por un individuo y son percibidas por otro de la misma especie, en el que se desencadena una respuesta conductual o de desarrollo específica (Karlson & Lüscher, 1959). En el mismo año Butenandt caracterizó la primera feromona de la que se tuvo conocimiento; el *bombykol*, cuya secreción por parte del gusano de seda hembra tiene un efecto de atracción en los machos de la misma especie (Tirindelli et al., 2009).

En épocas recientes, se asumió que las funciones tanto del SOP como del sistema olfatorio accesorio (SOA) son distintas, de tal forma que el primero de ellos está encargado de detectar los estímulos categorizados como “odorantes comunes/volátiles”, mientras que el segundo hace lo propio con las feromonas. La evidencia estructural y funcional apoya en cierta medida lo anterior (Raisman, 1971; Halpern & Martínez-Marcos, 2003; Tirindelli et al., 2009), sin embargo, durante los últimos años han surgido trabajos, tanto de descripción anatómica como fisiológicos, en los que se sugiere contundentemente o incluso se demuestra que ambos sistemas son capaces de detectar, o por lo menos de participar en la detección de ambos tipos de estímulos -odorantes y feromonas- (Trinh & Storm, 2003; Lin et al., 2004; Xu et al., 2005; Spehr et al., 2006; Larriva-Sahd, 2008 & 2012; Matsuo et al., 2015).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar las propiedades electrofisiológicas y de conectividad de una población neuronal ubicada en el BOA anterior (BOAa). El BOAa forma parte del limbo olfatorio (LO; Figs. 5 y 6), ésta última es una zona de transición ubicada entre el BOp y el BOA que ha sido descrita recientemente (Larriva-Sahd, 2012). En breve (ver abajo), se destaca que la estructura laminar de ambos bulbos desaparece gradualmente en el LO (Fig. 6). La región que se encuentra entre el BOAa y la porción posterior-dorsal del BOp parece ser importante para la detección de una gran cantidad de estímulos químicos importantes para la generación de respuestas adaptativas (ver antecedentes y resultados). Las evidencias de conectividad de las neuronas que fueron estudiadas, sus relaciones morfológicas con los elementos circundantes y sus propiedades electrofisiológicas sugieren que la población celular aludida durante este proyecto podría estar involucrada en el procesamiento de información relacionada con la detección de tipos particulares de estímulos químicos importantes para

la emergencia de conductas que son vitales para la supervivencia del individuo.

Para lograr dicho objetivo se obtuvieron rebanadas viables de encéfalos de rata adulta en orientación sagital, se llevó a cabo el registro de la actividad electrofisiológica de las neuronas ubicadas en el LO en la modalidad de *patch-clamp* y se estudiaron las respuestas de éstas últimas ante la estimulación eléctrica del BOp y del BOA. De manera simultánea al registro electrofisiológico las neuronas fueron llenadas con biocitina, cuyo ulterior procesamiento permite analizar las características morfológicas de la neurona registrada. A continuación, en la sección de Antecedentes se discutirá con mayor detalle los elementos que componen al SOP y al SOA, así como también las características celulares y de conectividad del LO; posteriormente, en la sección de Material y Métodos discutiremos el diseño experimental del proyecto llevado a cabo, los Resultados obtenidos y finalmente se discutirá la interpretación de los mismos y la posible implicación que podrían tener los resultados obtenidos.

II. Antecedentes

2.1 Epitelio olfatorio

La detección de odorantes volátiles comienza en el EO, esta es una estructura neuroepitelial que se encuentra en la región posterior de la cavidad nasal. El EO podría ser conceptualizado como una interfase entre el “mundo olfatorio exterior” y la representación del mismo generada por un código subyacente a la actividad neuronal a lo largo del SOP. Las neuronas encargadas de transducir los estímulos olfativos no se encuentran, como es común en otras modalidades sensoriales, en un ganglio; sino que componen, junto con otros tipos celulares, un neuroepitelio (Graziadei & Monti-Graziadei, 1979). Destaca que las neuronas sensoriales del EO son capaces de regenerarse a lo largo de la vida a partir de una población de células progenitoras que igualmente residen en el neuroepitelio (Moulton et al., 1970; Graziadei & Metcalf, 1971; para revisión, ver Schwob, 2002).

Los odorantes que acceden a la cavidad nasal se unen a receptores olfatorios (ROs) en el EO, dichos ROs pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G; la sub-familia de ROs fue inicialmente clonada en roedores (Buck & Axel, 1991), en donde se demostró en el trabajo seminal de Richard Axel y Linda Buck, que los roedores disponen de al menos 1000 genes dedicados a la detección de odorantes; mientras que en humanos existen ~300 (Ben-Arie et al., 1994). El descubrimiento de esta familia tan grande de genes, dedicada exclusivamente a la detección de odorantes, impulsó la investigación de esta modalidad sensorial y estudios posteriores determinaron que de este gran repertorio de genes, cada célula sensorial en el EO expresa uno y sólo un RO de manera mono-alélica (Chess et al., 1994; Ishii et al., 2001; Lewcock & Reed, 2004).

Estudios posteriores demostraron que en el EO hay un arreglo espacial que manifiesta una incipiente topografía en función del RO expresado por cada neurona, de tal forma que las neuronas sensoriales del EO se encuentran distribuidas en zonas a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral; la expresión de los ROs es simétrica entre ambos EOs y el patrón de expresión de los receptores es bastante similar entre individuos (Strotmann et al., 1992; Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994). Sin embargo, cabe destacar que las neuronas sensoriales que expresan el mismo RO no se encuentran todas en un mismo sitio de expresión, por lo que emerge un patrón no contiguo de neuronas con mismos perfiles de expresión de ROs (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994).

La demostración de que sólo un RO se expresa en cada neurona sensorial y lo hace de manera monoalélica (Lewcock & Reed, 2004), condujo a la hipótesis de que probablemente el gen del RO sería importante para la sorprendente convergencia axonal que manifiestan las neuronas sensoriales que expresan el mismo receptor al formar glomérulos en el BOp (ver abajo; Fig. 1). En efecto, se demostró que deleciones o mutaciones puntuales en los genes olfativos se manifestaban en una conducción deficiente del axón hacia el glomérulo correspondiente (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998).

La idea esbozada en el párrafo anterior es de suma importancia, ya que unos años antes se había demostrado que todas y cada una de las neuronas sensoriales del EO que expresan el mismo receptor, conducen sus axones a uno o dos glomérulos del BOp ipsilateral (Fig. 1; Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Mombaerts et al., 1996); el anterior es uno de los ejemplos más sorprendentes de convergencia axonal hasta ahora conocidos en el SNC. Evidentemente, este descubrimiento inmediatamente sugirió la noción de que los estímulos sensoriales detectados en el EO eran representados en el BOp a manera de un mapa espacial de activación glomerular. Por lo tanto, los experimentos tratando de comprobar esta idea no se hicieron esperar y se demostró de manera contundente que las aferencias sensoriales procedentes del EO generan un mapa espacial de actividad glomerular para representar las cualidades de los odorantes en BOp (Fig. 1; Rubin & Katz, 1999; Uchida et al., 2000; Wachowiak & Cohen, 2001; Spors & Grinvald, 2002; Lin et al., 2006).

2.2 Bulbo olfatorio principal

Los axones de las neuronas sensoriales proyectan hacia el BOp y ahí establecen contactos sinápticos excitatorios en estructuras esféricas denominadas glomérulos. Los glomérulos son un neuropilo conformado por las dendritas apicales de neuronas MIs y EMs -que constituyen el componente eferente del BOp-, por los procesos neuronales de interneuronas de la CGI, denominadas en conjunto neuronas juxtglomerulares y por los propios axones de las neuronas sensoriales (Fig. 1; Golgi, 1875; Ramón & Cajal, 1890; Valverde, 1965). Como se ha mencionado anteriormente, cada glomérulo en el BOp recibe aferencias de neuronas sensoriales que expresan el mismo RO, lo que genera un patrón de actividad espacial en el BOp ante la estimulación sensorial (Rubin & Katz, 1999; Uchida et al., 2000; Wachowiak & Cohen, 2001; Spors & Grinvald, 2002; Lin et al., 2006). En la CGI y posteriormente en

la granular, complejas interacciones neuronales y de procesamiento de información ocurren a este nivel tan “temprano” en la jerarquía de procesamiento de la vía olfativa, a continuación se dará un breve resumen del conocimiento que hasta ahora se ha generado al respecto.

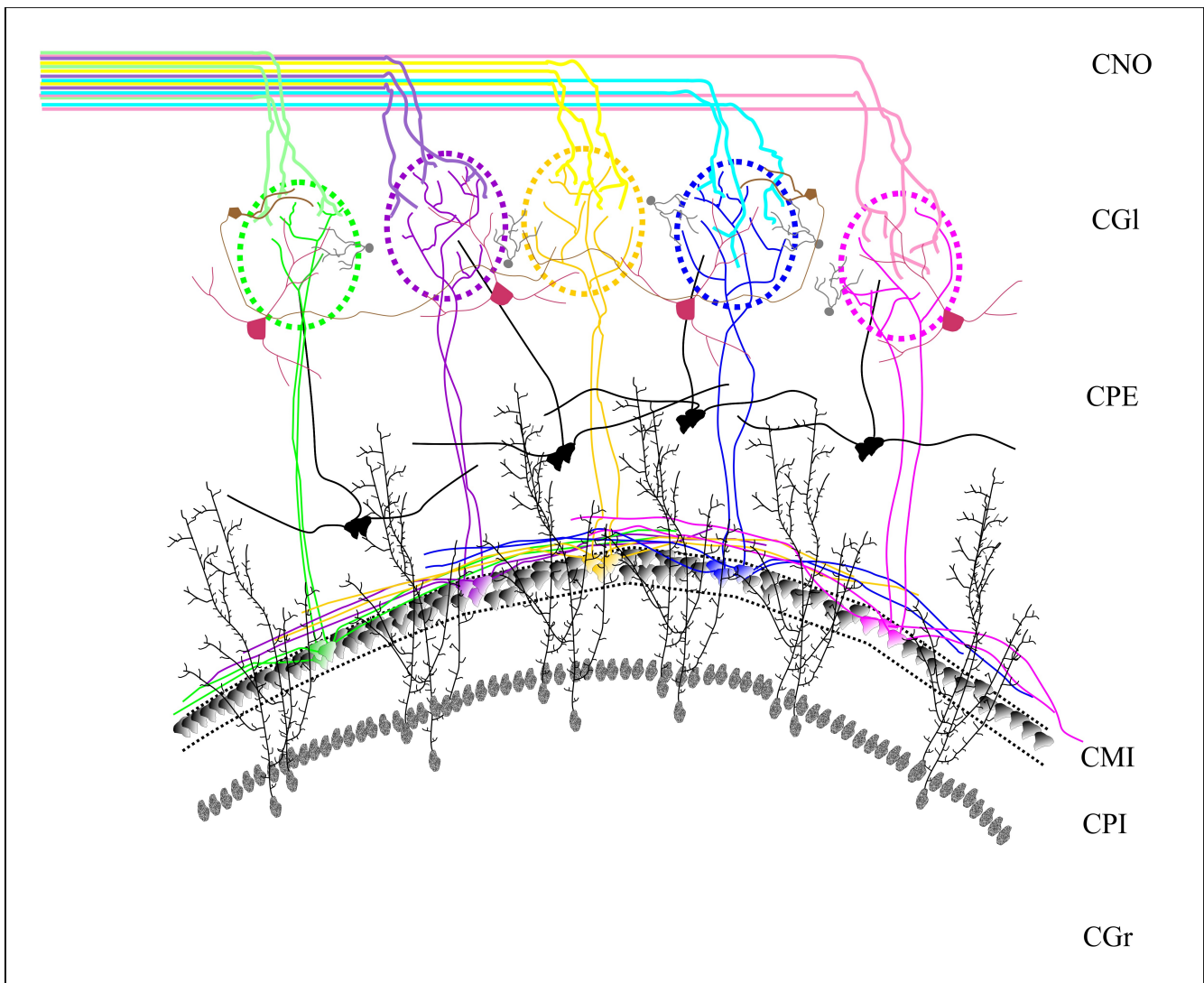


Figura 1. Esquema representativo del BOp. En el esquema se representan los tipos celulares presentes en cada capa; CGI: neuronas periglomerulares (gris), neuronas superficiales de axón corto (café), neuronas empenachadas externas (rosa); CPE: neuronas empenachadas (negro); CMI: neuronas mitrales (diversos colores, afiliadas a un sólo glomérulo); CGr: neuronas granulares (gris). Nótese como los axones de las neuronas sensoriales que expresan el mismo receptor (mismo color) hacen sinapsis en un mismo glomérulo. CNO; capa de nervios olfatorios; CPI; capa plexiforme interna.

Neuronas juxtglomerulares

En la CGI, además de las dendritas apicales de neuronas MIs y EMs, residen interneuronas locales que participan en el procesamiento y decodificación de los impulsos nerviosos procedentes de las neuronas sensoriales. Las neuronas superficiales de axón corto, las neuronas periglomerulares (Pinching &

Powell, 1971) y la neuronas EMs externas (Tatti et al., 2014) en conjunto, son conocidas como neuronas juxtaglomerulares (Fig. 1; Nagayama et al., 2014). En general las neuronas juxtaglomerulares son una población neuronal compleja, en la que continuamente se proponen nuevos sub-tipos neuronales en base a marcadores celulares de distinta naturaleza (Nagayama et al., 2014; Kosaka & Kosaka, 2015).

Las neuronas superficiales de axón corto, que sintetizan y liberan tanto GABA como dopamina (Hökfelt et al., 1975; Liu et al., 2013; Banerjee et al., 2015; consultar Aungst et al., 2003) emiten axones largos que pueden alcanzar distancias de hasta ~15 glomérulos (Fig. 1; Aungst et al., 2003; Kiyokage et al., 2010). Estas neuronas reciben sinapsis excitatorias de neuronas sensoriales y de neuronas EMs externas (Aungst et al., 2003). Por lo tanto, la activación de las neuronas superficiales de axón corto en una unidad glomerular podría: 1) inducir la inhibición di-sináptica de MIs/EMs ubicadas en glomérulos lejanos, a través de los -paradójicamente- largos axones de estas células que predominantemente activarían neuronas periglomerulares (Aungst et al., 2003), 2) directamente inhibir neuronas EMs externas (Whitesell et al., 2013) y/o 3) tener un efecto bi-fásico (inhibitorio-excitatorio) sobre neuronas EMs externas, mediado respectivamente por la liberación de GABA y dopamina (Kiyokage et al., 2010; Liu et al., 2013). Más aún, estudios recientes hechos *in vivo*, sugieren que esta población neuronal ejerce funciones que permiten modular de manera directa la intensidad de las aferencias sensoriales (ganancia de control) en la actividad del micro-circuito, posibilitando la modulación de la actividad “de salida” del glomérulo a través de interacciones sinápticas y eléctricas con neuronas EMs externas (Banerjee et al., 2015), éstas últimas son consideradas importantes “compuertas” de la eferencia glomerular (De Saint Jan et al., 2009).

Las neuronas periglomerulares son las más pequeñas y numerosas de la CGl (Fig. 1; Parrish-Aungst et al., 2007). En base a la orientación de sus procesos neuronales y las aferencias que reciben se han clasificado en dos grupos; las de tipo I, que reciben sinapsis por parte de las neuronas sensoriales y las de tipo II, que no reciben aferencias de neuronas sensoriales pero participan en el procesamiento de información intraglomerular (Shao et al., 2009; Kosaka et al., 1997; Najac et al., 2015). Así como las neuronas superficiales de axón corto, las neuronas periglomerulares también han sido reportadas como células capaces de co-liberar GABA y dopamina (Kosaka & Kosaka, 2007, Maher & Westbrook, 2008). Al respecto, se ha propuesto que neuronas periglomerulares y superficiales de axón corto

GABA⁺/dopamina⁺, se podrían distinguir por el tamaño del cuerpo y por su origen embrionario (Pignatelli et al., 2005; Kosaka & Kosaka, 2009). Las descripciones originales de las neuronas periglomerulares atribuían a este tipo celular la posesión de un axón (Pinching & Powell, 1971), sin embargo, también han sido descritas como neuronas sin axón (Najac et al., 2015). Al parecer, el impacto funcional de estas neuronas en el circuito intraglomerular es ubicuo y sinápticamente se han relacionado a prácticamente todos los tipos celulares de la CGI (Nagayama et al., 2014); de manera específica, se ha descrito que estas células inhiben pre-sinápticamente a las aferencias sensoriales (Hsia et al., 1999) y son importantes mediadores de la inhibición intraglomerular, constituyendo así un elemento más que regula la actividad eferente del glomérulo (Gire & Schoppa, 2009; Najac et al., 2015).

Con respecto a las neuronas EMs externas, se han descrito al menos dos sub-poblaciones de este tipo celular (Fig. 1; Macrides & Schneider, 1982, Schoenfeld et al., 1985). Una de ellas carece de dendritas basales, su cuerpo se restringe exclusivamente a la CGI y su axón al BOp, es decir, no proyecta a regiones extra-bulbares (ver abajo); la otra población tiene características opuestas; posee dendritas basales, el cuerpo puede ubicarse en la CPE y son neuronas de proyección (Macrides & Schneider, 1982, Schoenfeld et al., 1985). Un estudio más reciente en el que se corroboraron los aspectos morfológicos de estas dos sub-poblaciones, contribuyó datos adicionales que muestran que estos dos tipos de neuronas EMs externas también difieren en sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas (Antal et al., 2006).

Se ha demostrado en repetidas ocasiones y de manera clara que las neuronas EMs externas poseen actividad rítmica generada endógenamente y dependiente de voltaje (McQuiston & Katz, 2001; Hayar et al., 2004a; Liu & Shipley, 2008). La actividad de estas neuronas es potencialmente muy relevante, dado que se ha descrito que los axones de las neuronas EMs externas constituyen el llamado sistema de asociación intra-bulbar, que conecta glomérulos mediales y laterales que reciben aferencias de neuronas sensoriales que expresan el mismo receptor (Schoenfeld et al., 1985; Liu & Shipley, 1994; Belluscio et al., 2002; Lodovichi et al., 2003). Más aún, algunas de estas neuronas EMs externas, emiten axones que decusan a través de la comisura anterior y terminan en la porción externa del núcleo olfatorio anterior, en donde a su vez, neuronas piramidales emiten axones que modulan la actividad de glomérulos homotípicos contra-laterales (Yan et al., 2008). Sería interesante conceptualizar a estas neuronas EMs

rítmicas que establecen circuitos de asociación intra- e inter-bulbares como agentes de sincronización entre regiones de un mismo bulbo o de ambos bulbos para posiblemente generar ventanas temporales de excitación o inhibición que propiciaran que la información relacionada a ROs semejantes se transmitiera fielmente a estructuras cerebrales mayores en la jerarquía del procesamiento de información.

Finalmente, hace un par de años se reportó una sub-población más de neuronas EMs externas (Fig. 1), cuya ubicación (cuerpo celular) se restringe exclusivamente a la CGI; las características electrofisiológicas y morfológicas son similares a las de las neuronas EMs externas descritas aquí correspondientes a la CGI, sin embargo, destaca de manera importante que el 30% de esta novedosa sub-población también es capaz de sintetizar y liberar GABA (Tatti et al., 2014). Funcionalmente, los autores encontraron que estas neuronas son importantes en la transferencia de información dentro de un glomérulo, ya que la opto-estimulación de estas neuronas EMs externas es seguida de la inhibición de la actividad de neuronas MIs y EMs (Tatti et al., 2014).

Neuronas mitrales y empenachadas

Las neuronas principales del BOp, esto es, neuronas que emiten dendritas glomerulares (generalmente sólo una) y reciben aferencias mono-sinápticas de las neuronas sensoriales, envían sus axones a regiones cerebrales extra-bulbares y liberan glutamato, son las células MIs y EMs. Las neuronas MIs residen exclusivamente en la capa homónima (Fig. 1; Golgi, 1875; Ramón & Cajal, 1890; Valverde, 1965), mientras que las EMs se distribuyen en la extensión dorso-ventral de la CPE (Fig. 1; Haberly & Price, 1977).

Diversos estudios recientes han sugerido que las neuronas MIs/EMs podrían codificar aspectos complementarios de la información contenida en un estímulo odorífero. Específicamente, se ha demostrado que las neuronas EMs reciben de manera preferente contactos mono-sinápticos por parte de las neuronas sensoriales (Hayar et al., 2004a; De Saint Jan et al., 2009; Gire et al., 2012), que requieren de menores concentraciones de un estímulo para responder a él y lo hacen de manera invariante a cambios de concentración (Igarashi et al., 2012; Kikuta et al., 2013) y que la actividad de ambos tipos celulares predomina en fases opuestas del ciclo respiratorio (Fukunaga et al., 2012). Un elegante estudio *in vitro*, demostró que una buena parte de estas diferencias se debe a distintas propiedades

biofísicas entre neuronas MIs y EMs, en particular, a que las neuronas EMs son intrínsecamente más excitables que las MIs (Burton & Urban, 2014).

Estas valiosas contribuciones forman parte de un marco teórico emergente en el que se construye una noción general del papel que juega cada una de estas dos poblaciones de neuronas principales en el procesamiento de odorantes. De tal forma, se ha propuesto que las neuronas EMs podrían representar en su actividad electrofisiológica la identidad del estímulo (Igarashi et al., 2012; Fukunaga et al., 2012), mientras que las neuronas MIs representarían en su forma de disparo cualidades dinámicas del estímulo, dependientes de contexto y susceptibles de ser modificadas en el tiempo (Igarashi et al., 2012; Fukunaga et al., 2012).

Mecanísticamente y de acuerdo a la información mostrada aquí, la estimulación sensorial, que activaría preferentemente a las neuronas EMs (Gire et al., 2012) provocaría que éstas últimas excitaran a neuronas juxtaglomerulares (Hayar et al., 2004a); de manera paralela y dependiente de concentración, establecerían contactos sinápticos excitatorios con neuronas MIs (De Saint Jan et al., 2009) pertenecientes a la misma “columna” o módulo glomerular (Willhite et al., 2006; Kikuta et al., 2013) y/o, a través del reclutamiento de neuronas periglomerulares tendrían la facultad de inhibir disinápticamente a las neuronas MIs, “retrasando” así las respuestas de éstas últimas a la estimulación sensorial (Fukunaga et al., 2012).

Los patrones de proyección axonal de las neuronas MIs/EMs del BOp también han sido estudiados desde hace décadas. Estudios pioneros de trazado axonal de neuronas únicas demostraron que las células MIs distribuyen sus axones en prácticamente todos los relevos centrales de la vía olfativa (Ojima et al., 1984), mientras que las neuronas EMs restringen la inervación axonal a estructuras rostrales (Haberly & Price, 1977; Scott, 1981). De manera más específica, estudios recientes han demostrado a través del trazado de axones de neuronas MIs y EMs comprometidas en la detección de odorantes, que efectivamente, las neuronas EMs proyectan exclusivamente a el núcleo olfatorio anterior, al tubérculo olfatorio y a la corteza piriforme anterior (Nagayama et al., 2010; Igarashi et al., 2012), mientras que las neuronas MIs proyectan a las mismas estructuras y además a la corteza piriforme posterior, a la corteza entorrinal lateral, al núcleo del tracto olfatorio lateral (TOL) y a los núcleos corticales anterior y postero-lateral de la amígdala (Nagayama et al., 2010; Igarashi et al.,

2012). Destaca que las proyecciones de ambos tipos neuronales no se superponen en las regiones bulbares rostrales en las que coinciden (Nagayama et al., 2010; Igarashi et al., 2012) y también que existen reportes de que las proyecciones del BOp hacia la corteza piriforme y la amígdala difieren en su “flexibilidad”, es decir, los axones bulbares en la corteza piriforme poseen un arreglo espacial distribuido y variable, mientras que los axones bulbares en la amígdala poseen un arreglo espacial estereotipado e invariable; los autores de este estudio sugieren que este puede ser el sustrato anatómico de circuitos involucrados en conductas aprendidas (piriforme) e innatas (amígdala; Sosulski et al., 2011).

Capa granular (neuronas)

La población celular más numerosa en el BOp y por lo tanto de interneuronas es la de las neuronas Grs (Fig. 1; Levine & Marcillo, 2008; Shepherd, 1972). Las neuronas Grs residen en la capa homónima y regularmente se agrupan en “islotos” horizontales (Shepherd et al., 2004); estas interneuronas GABAérgicas son pequeñas (6-8 μm) y carecen de axón (Golgi, 1875). El descubrimiento inicial de que este tipo neuronal establece sinapsis recíprocas con neuronas MIs (Hirata et al., 1964; Isaacson & Strowbridge, 1998) y la subsecuente manipulación farmacológica de las mismas condujo a hipotetizar que éstas eran importantes para la discriminación de odorantes estructuralmente similares (Yokoi et al., 1995). Sin embargo, en años recientes, diversos estudios han mostrado que las interacciones neuronales en la CGI son suficientes para la emergencia de procesos como el contraste o inhibición/activación entre glomérulos (Aungst et al., 2003; Shirley et al., 2010; Whitesell et al., 2013; Banerjee et al., 2015). Más aún, un estudio reciente ha demostrado que la inhibición evocada por estimulación sensorial persiste ante la inactivación de neuronas Grs pero se ve interrumpida ante la inhibición de la actividad glomerular (Fukunaga et al., 2014).

Sin embargo, la actividad inhibitoria de neuronas Grs se ha relacionado de manera importante con la fina modulación -control- temporal de la actividad eléctrica de neuronas MIs y EMs. Este aspecto del procesamiento olfativo es por demás importante, ya que esta regulación hipotéticamente establece el orden temporal de la información que será enviada a las áreas corticales correspondientes, de tal manera que la discriminación olfativa, entre otros procesos, sea efectiva. Diversos grupos han demostrado los efectos que tiene la inhibición establecida por neuronas Grs, como inhibición dependiente de actividad (Arevian et al., 2008; Geramita et al., 2016), regulación temporal de espigas

en neuronas MIs/EMs y/o sincronización (Schoppa, 2006) y des-inhibición de otros tipos neuronales (Burton & Urban, 2015)

Específicamente se ha demostrado que las neuronas Grs son capaces de ejercer influencias inhibitorias a distintas escalas temporales, al respecto se ha comprobado que esta variabilidad en el efecto temporal de la inhibición puede inducir correlaciones en el disparo de neuronas MIs/EMs (Giridhar et al., 2011). Por otro lado, este mismo año se ha demostrado también que las neuronas Grs son capaces de ejercer efectos inhibitorios en neuronas MIs y EMs dependiendo del estado de actividad en el que se encuentren éstas últimas (Geramita et al., 2016). Los autores demuestran que las neuronas EMs son efectivamente inhibidas cuando están activas en frecuencias de disparo bajas (~25 Hz), mientras que las neuronas MIs son inhibidas en rangos de actividad intermedios (~50 Hz), los autores proponen que esta inhibición diferencial surge por una concomitante conectividad diferenciada, es decir, neuronas EMs establecen conexiones sinápticas de manera preferente con neuronas Grs superficiales, que son intrínsecamente más excitables, mientras que las MIs hacen lo propio con neuronas Grs profundas (Geramita et al., 2016).

Estudios poblacionales de imagen han demostrado, a través del seguimiento temporal de la actividad de neuronas Grs, que la actividad poblacional es dinámica en el tiempo, pero que neuronas únicas poseen latencias de respuestas sorprendentemente constantes cuando se estimula el mismo glomérulo y latencias variables cuando se estimulan otros glomérulos; los autores concluyen que la actividad poblacional -inhibitoria- de neuronas Grs contribuye a generar patrones de actividad específicos en neuronas MIs (Kapoor & Urban, 2006). Estudios de imagen más recientes han permitido explorar la actividad de las neuronas Grs ante la presencia de odorantes *in vivo*, en donde se ha demostrado que las neuronas Grs son capaces de compartimentalizar su activación en distintos segmentos dendríticos, cuya actividad puede ser evocada por odorantes disímiles (Wienisch & Murthy, 2016).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que en registros electrofisiológicos poblacionales, la actividad de las neuronas MIs se de-correlaciona con el tiempo (Bathellier et al., 2008; Cury & Uchida, 2010); más tarde se demostró que este fenómeno se da gracias a la actividad inhibitoria de las neuronas Grs (Gschwend et al., 2015), cuyo efecto es el de mejorar el desempeño de roedores en tareas de discriminación olfativa (Abraham et al., 2010; Nunez-Parra et al., 2013). La aceleración de la

discriminación olfativa también ha sido demostrada al interrumpir la inhibición tónica a la que están sujetas las neuronas Grs (Nunes & Kuner, 2015) por parte de neuronas profundas de axón corto (Eyre et al., 2008; Boyd et al., 2012; Burton & Urban, 2015). Finalmente, es importante mencionar que las neuronas Grs son también moduladas por aferencias centrífugas que establecen contactos sinápticos en zonas dendríticas distintas de aquellas en las que las neuronas MIs efectúan las sinapsis recíprocas (Balu et al., 2007), lo que añade más complejidad al papel de las neuronas Grs en el procesamiento olfativo.

2.3 Órgano vomeronasal

En el año 1813, el anatomista danés Ludvig Jacobson describió la estructura de un órgano previamente desconocido ubicado dentro de la cavidad nasal de algunos mamíferos (Fig. 2); observó y describió de manera detallada su morfología glandular, inervación y la irrigación sanguínea; en su descripción original mencionó que “se encuentra tan cuidadosamente protegido que ha escapado al meticoloso escrutinio de los más grandes anatomistas, entre otras cosas por que el órgano se encuentra rodeado por una cápsula cartilaginosa” (Døving & Trotier, 1998). Jacobson asumió que dicha estructura era principalmente secretoria, pero también sospechó una función sensorial; el órgano aludido es conocido hoy como OVN y se sabe que la función del mismo tiene que ver con la percepción de feromonas (Døving & Trotier, 1998; Leinders-Zufall et al., 2000; Holy et al., 2000).

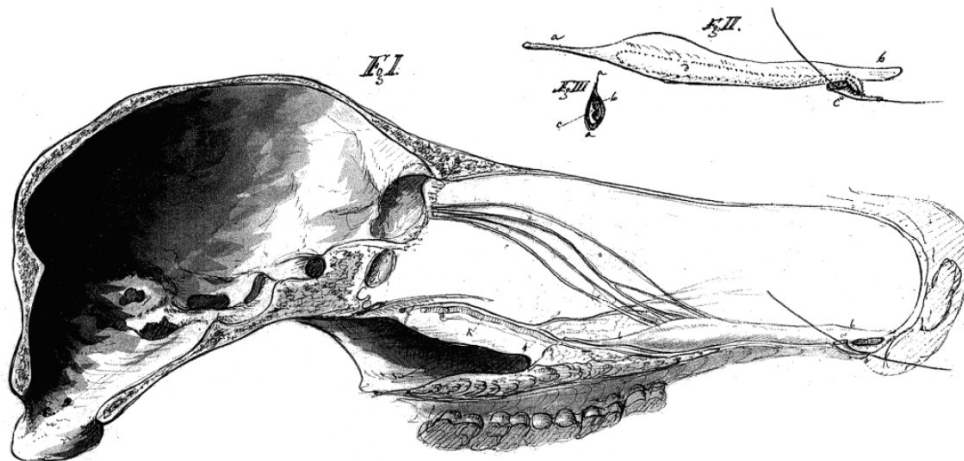


Figura 2. Dibujo del cráneo de un venado (*Cervus sp.*) y de su órgano vomeronasal. En **FI** se observan los nervios vomeronasales en su camino hacia el bulbo olfatorio accesorio, **FII** es un órgano aislado, la línea punteada delimita al lumen y **FIII** es un corte transversal del órgano, las imágenes no están a escala. Tomado de (Døving & Trotier, 1998).

Algunas décadas después surgió la primera evidencia experimental de que la estructura descubierta por Jacobson podría tener funciones sensoriales. Retzius en 1894, mediante impregnaciones de Golgi, observó que la morfología y el arreglo general de las células que componen al epitelio del OVN eran muy parecidas a las células sensoriales del BOp (Døving & Trotier, 1998). Las descripciones de Jacobson fueron profundas y las llevó a cabo en un gran número de animales, se basó principalmente en las observaciones hechas en animales domésticos, como el gato, el perro, la vaca, el caballo, el cerdo, la oveja y la cabra; pero también hizo estudios en tigre, camello, búfalo, venado y ballena (Døving & Trotier, 1998). La presencia de dicho órgano ha sido confirmada en la mayoría de los mamíferos y también está presente en marsupiales. Con respecto a los primates, el OVN se encuentra bien desarrollado en *Nycticebus tardigradus* (lémur) y *Cebus capucinus* o mono capuchino, mientras que está prácticamente ausente en el mono rhesus *Macaca mulatta* (Døving & Trotier, 1998).

El epitelio vomeronasal forma parte del OVN de Jacobson, un tejido con forma tubular que se encuentra contenido en una estructura ósea (en carnívoros y ungulados y cartilaginosa en lagomorfos y roedores; Salazar et al., 2008) a cada lado de la base del septo nasal; ambos OVNs (estructuras simétricas), junto con la vasculatura “cavernosa”, que adopta un arreglo elongado, se encuentran contenidos en las cavidades óseas y cartilaginosas mencionadas (Meredith & O'Connell, 1979). Debido a que la luz del ducto vomeronasal está orientada hacia la cavidad nasal (a diferencia de otros animales en los que se abre hacia la cavidad/canal nasopalatina), el mecanismo de acceso de los estímulos al órgano receptor se mantuvo como una incógnita, más aún si se toma en cuenta que la apertura del epitelio –en su porción anterior– es demasiado estrecha (~50-100 μm dependiendo de la especie), por lo que la entrada de partículas (estímulos) sería despreciable, o bien demasiado lenta (Meredith & O'Connell, 1979; Salazar et al., 2008). Probablemente Broman, en 1920 (Døving & Trotier, 1998), fue el primero en sugerir que el OVN era una estructura cuya función estaba basada en el transporte de moléculas a través de fluidos biológicos secretados por otros individuos; postuló que los químicos contenidos en dichos fluidos biológicos eran “succionados” al lumen del órgano a través de un mecanismo de bombeo; esta idea fue posteriormente confirmada (Fig. 3; ver abajo).

En 1961, el chileno Guillermo Mann llevó a cabo un elegante estudio histológico en una variedad de especies del orden *Chiroptera* (murciélagos) que abarcó 4 géneros, en dicho estudio observó que había un “elaborado y complejo tejido eréctil a lo largo del tubo que contiene al epitelio que sirve para

llenarlo y vaciarlo” (Fig. 2) (Mann, 1961). Observó también, en los 4 géneros, que individuos sexualmente motivados frecuentemente generaban una retracción del labio superior a través de la contracción del músculo *levator labii*, cuyo efecto es un desplazamiento hacia arriba de la porción anterior-dorsal del órgano de Jacobson y consecuentemente, que la porción anterior-ventral alcanzara una apertura máxima hacia el foramen incisivo; esta conducta (comúnmente conocida como *flehmen*), acoplada a la vaso-constricción del tejido eréctil contribuirían a que los estímulos tuvieran un acceso más facilitado al OVN (Mann, 1961).

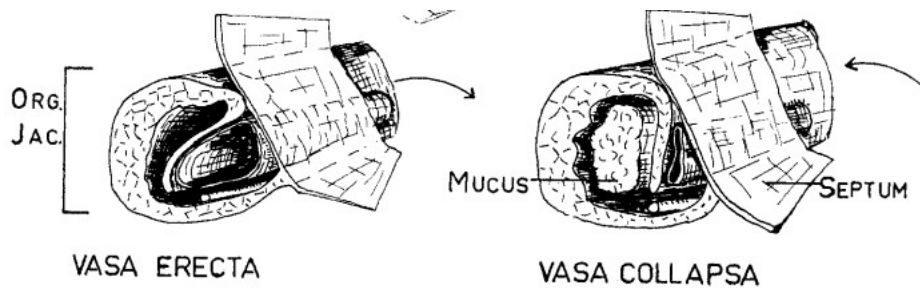


Figura 3. Órgano vomeronasal. Del lado izquierdo se observa la compresión ocasionada por el “aparato vascular constrictor” del lumen del órgano vomeronasal, con la consecuente evacuación de las secreciones nasales (flecha), del lado derecho se muestra el proceso inverso; el lumen de el OVN incorpora materia. Modificado de (Mann, 1961).

En 1979, Meredith y O'Connell, basados en los resultados de sus maniobras experimentales en hámsters, propusieron que existía un mecanismo por medio del cual era posible “jalar” material al lumen del OVN, de tal forma que los estímulos fueran accesibles a las células receptoras. De acuerdo a la interpretación hecha por parte de los autores, el mecanismo se basaba en un cambio local de la resistencia vascular, que redundaría en una mayor capacidad del OVN para engullir sustancias (Meredith & O'Connell, 1979; Eccles, 1982).

Los mencionados cambios en la resistencia de la vasculatura están controlados por fibras contenidas en el nervio nasopalatino, cuya estimulación eléctrica los activa. Además, demostraron que de manera independiente se podía provocar vaso-constricción (por activación de aferencias simpáticas), cuyo efecto es el de aumentar el flujo de líquido al interior del OVN, y vaso-dilatación (control parasimpático; Fig. 3), con un efecto opuesto al previo (Meredith & O'Connell, 1979; Eccles, 1982). Finalmente, a través de registros unitarios, demostraron que neuronas del BOA pueden ser afectadas por “odorantes” asociados al OVN cuando la aplicación de éstos últimos se encuentra acoplada a la estimulación del nervio nasopalatino (Meredith & O'Connell, 1979).

En resumen, debido a su inaccesibilidad, el epitelio vomeronasal no puede ser contactado por el flujo de aire y/o líquido que transita de ordinario en la cavidad nasal. Por tal motivo, para alcanzar dicho epitelio, las moléculas disueltas en el moco nasal deben ser succionadas hacia el lumen de dicha estructura (Fig. 3). Esto es conseguido gracias a que en las regiones laterales del lumen hay una gran cantidad de vasos sanguíneos cuyo control por parte del sistema nervioso autónomo permite que éstos capilares actúen de manera análoga a una bomba, logrando así un efecto de succión, además de que, como se ha mencionado, existe un mecanismo complementario que facilita el acceso de los estímulos al OVN (*flehmen*), por lo que ambas estrategias, ésta última conductual, le permiten a los individuos que las despliegan un “muestreo del ambiente feromonal” más eficaz (Meredith & O'Connell, 1979; Meredith et al., 1980; Meredith, 1994) .

2.4 Epitelio vomeronasal

En la parte medial del OVN (que posee una superficie cóncava) se encuentra alineado un neuroepitelio pseudoestratificado que está poblado por tres tipos celulares: neuronas sensoriales (en adelante neuronas vomeronasales), células de soporte y células basales; las células basales -como su nombre lo implica- se encuentran en una posición adyacente a la membrana basal del epitelio, sin embargo, a diferencia de las células basales del EO, no forman una capa propiamente dicho (p. ej. está desorganizada); las células de soporte se encuentran en la porción más superficial del epitelio (Giacobini et al., 2000).

En las ratas neonatas, el epitelio vomeronasal está poblado ya por los tres tipos de células mencionados, sin embargo, existe una cantidad similar de neuronas inmaduras y plenamente diferenciadas; alrededor de los ~14 días todas las neuronas presentan características ultraestructurales de neuronas maduras, como una cantidad considerable de retículo endoplásmico liso y rugoso, neurotúbulos, centriolos apicales y microvellosidades en el ápice de las células. Para los ~21 días, se considera que el epitelio vomeronasal es plenamente maduro (Garrosa & Coca, 1991). Las neuronas vomeronasales poseen una sola dendrita y vellosidades apicales, mientras que en la porción basal del epitelio los axones de dichas neuronas atraviesan la membrana basal y se fasciculan formando nervios vomeronasales que viajan entre ambos bulbos e ingresan a la región postero-dorsal de éstos (BOA).

En términos electrofisiológicos, las neuronas vomeronasales poseen resistencias de entrada demasiado altas (en el orden de los GΩ; Liman & Corey, 1996; Shimazaki et al., 2006), resultando esto en que una corriente entrante de unos pocos picoamperios sea capaz de llevar a la neurona a su umbral de disparo (Ackels et al., 2014). Estas características electrofisiológicas pasivas podrían constituir una de las razones por las que la actividad espontánea de estas neuronas es prominente (Holy et al., 2000) y por lo consiguiente su relación señal/ruido es demasiado alta (Arnson & Holy, 2011; Arnson & Holy, 2013). Sin embargo, las neuronas del BOA son capaces de mejorar dramáticamente (más del doble) la tasa de ruido-signal (Meeks et al., 2010). Otras características importantes son que las neuronas vomeronasales son especialmente sensibles a los estímulos que las activan, ya que son capaces de detectar feromonas en concentraciones muy bajas (de hasta 10^{-11} M; Leinders-Zufall et al., 2000) y al parecer, a diferencia de la mayoría de células sensoriales, no exhiben adaptación en sus respuestas (Holy et al., 2000).

Con respecto a la decodificación de los estímulos en el OVN, se ha demostrado que la actividad de neuronas únicas es capaz de detectar aspectos fundamentales como el género del que proviene la muestra (He et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado también que las neuronas vomeronasales que expresan receptores relacionados son capaces de detectar distintos intermediarios de una ruta metabólica (esteroides sulfatados, ácidos carboxílicos esteroideos; Arnson & Holy, 2013; Fu et al., 2015) o distintas proteínas urinarias mayores (Kaur et al., 2014) a través de la actividad combinada (que genera un código) de las neuronas vomeronasales activadas; este código combinatorio permitiría discriminar la identidad y la concentración de componentes de una “mezcla feromonal” (Arnson & Holy, 2013) así como también permitiría evocar conductas distintas en función de la combinación de feromonas presentes en una muestra (Kaur et al., 2014) y finalmente podría también representar una forma de detectar información a nivel individual y de cepa (He et al., 2008).

Las neuronas vomeronasales se encuentran segregadas formando dos poblaciones, una basal y otra apical (Giacobini et al., 2000). Se ha demostrado en una variedad de estudios y con diversas técnicas que en el neuroepitelio vomeronasal existen -al menos- 2 poblaciones de neuronas vomeronasales; uno de los estudios pioneros fue llevado a cabo en el conejo por Mori y colegas (Mori et al., 1987), en donde, a través de la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un homogenado de nervios (axones vomeronasales), descubrieron que un par de sus anticuerpos tenían afinidades selectivas por dos poblaciones axonales, aparentemente complementarias. Uno de esos anticuerpos, el

R4B12 marca de manera selectiva, y por lo tanto permite también la identificación de una subclase de neuronas receptoras que proyectan sus axones hacia el BOAa, mientras que otro anticuerpo, el R5A10 resultó ser selectivo a otra clase de neuronas receptoras que proyectan sus axones a el bulbo olfatorio accesorio posterior (BOAp), cabe destacar que los axones de ambos tipos de neuronas se encuentran “mezclados” en su trayecto hacia el bulbo, sin embargo, las regiones en las que establecen sus contactos sinápticos se encuentran segregadas (Mori et al., 1987).

La molécula de adhesión olfativa (OCAM, por sus siglas en inglés), es el antígeno reconocido por el anticuerpo R4B12, y se expresa solamente en las neuronas vomeronasales que poseen una dendrita corta y que proyectan al BOAa (von Campenhausen et al. 1997; Yoshihara et al., 1997); por otro lado, los anticuerpos CC1 y CC6, que también son monoclonales y cuyo antígeno de reconocimiento se encuentra en los glucolípidos, marcan neuronas sensoriales que proyectan sus axones a la región anterior y posterior, respectivamente (Schwartz & Crandall, 1991; Schwartz et al. 1994). La presencia y distribución diferencial de proteínas G en el OVN ha sido estudiada en la zarigüeya (Halpern et al., 1995) y en el ratón (Berghard & Buck, 1996) utilizando inmunoreactividad. En el neuroepitelio vomeronasal, el anticuerpo $G_{\alpha 2}$ se une a las neuronas vomeronasales apicales, mientras que el anticuerpo $G_{\alpha o}$ es inmunoreactivo a neuronas vomeronasales basales. La presencia de las proteínas G detectadas a través de este medio se encuentra enriquecida en las microvellosidades apicales de las neuronas vomeronasales, en donde ocurre la transducción del estímulo (Berghard & Buck, 1996).

La detección feromonal en el OVN por lo tanto, corre a cargo de al menos dos poblaciones neuronales que a nivel del epitelio vomeronasal se encuentran segregadas (Imamura et al., 1985; Mori et al., 1987). Las neuronas vomeronasales apicales expresan de manera exclusiva receptores vomeronasales de la familia 1 (V1R; Dulac & Axel, 1995), mientras que las neuronas vomeronasales ubicadas en la porción basal del epitelio expresan receptores vomeronasales de la familia 2 (V2R; Herrada & Dulac, 1997; Matsunami & Buck, 1997; Ryba & Tirindelli, 1997). Notablemente, la segregación recién descrita para las neuronas vomeronasales (apicales y basales), además de mantenerse en el BOA con respecto a las zonas de éste último que cada población de neuronas vomeronasales inerva, se manifiesta también con respecto a los ligandos que cada población reconoce (Fig. 4; ver abajo).

Es interesante mencionar que dentro de la sub-población de neuronas vomeronasales basales también

se ha descrito una sub-división en función de la expresión de genes del complejo *Mhc* de la clase I (genes *H2-Mv*). Las neuronas *H2-Mv⁺* y *H2-Mv⁻* (ambas poblaciones $V2R^+$) se encuentran, de manera respectiva en la porción superior e inferior de la base del epitelio vomeronasal y esta segregación se mantiene en las proyecciones de estas neuronas hacia el BOA, de tal forma que las células *H2-Mv⁺* proyectan hacia la porción más posterior del BOAp y las *H2-Mv⁻* a la región anterior del BOAp (Ishii & Mombaerts, 2008).

Funcionalmente, se ha demostrado que las neuronas vomeronasales apicales son activadas ante la presencia de feromonas que se encuentran en la orina de individuos de la misma especie (Leinders-Zufall et al., 2000; Boschat et al., 2002; Del Punta et al., 2002a), como los esteroides sulfatados (Nodari et al., 2008; Hammen et al., 2014) y los ácidos carboxílicos esteroideos, que podrían ser específicos al sexo del individuo (Fu et al., 2015). Adicionalmente, se ha descrito este mismo año que las heces fecales poseen altas cantidades de ácidos biliares (moléculas derivadas del colesterol producidas en el hígado) que al ser aisladas, constituyen una potente señal que activa a las neuronas apicales del OVN (Doyle et al., 2016). Por otro lado, las neuronas vomeronasales basales son activadas por proteínas y/o moléculas de mayor peso molecular, como las proteínas urinarias mayores (Chamero et al., 2007; Kaur et al., 2014), los ligandos peptídicos que se unen a los complejos mayores de histocompatibilidad (Leinders-Zufall et al., 2004) y por péptidos derivados de glándulas extralacrimales (Kimoto et al., 2005). De los anteriores estudios se ha derivado la noción de que, en general el sistema vomeronasal-apical-BOAa reconoce ligandos que tienen que ver con la reproducción y la detección de individuos de la misma especie, mientras que el sistema vomeronasal-basal-BOAp es activado por ligandos que evocan conductas de territorialidad y de agresión entre machos.

Una de las primeras distinciones importantes entre el SOP y el SOA es evidente en la conectividad establecida entre el órgano sensorial y el bulbo respectivo. En el caso del SOP, como se ha revisado ya, ocurre una convergencia axonal en la que todas las neuronas sensoriales del EO que expresan el mismo receptor convergen sus axones en uno o dos glomérulos; sin embargo, en el SOA, los axones de las neuronas vomeronasales no exhiben el grado de convergencia discutido y desafortunadamente son pocos los estudios que se han hecho para obtener información al respecto. Los primeros aportes evidenciaron la distinción mencionada, pues se demostró que cada neurona vomeronasal puede inervar entre 6 y 30 glomérulos (Belluscio et al., 1999; Rodriguez et al., 1999).

Estudios posteriores habían reportado que, a pesar de que cada neurona vomeronasal efectivamente inerva entre 3 y 10 glomérulos, las neuronas del BOA poseen dendritas multi-glomerulares que sin embargo, se afilian a glomérulos que reciben aferencias de neuronas vomeronasales expresando el mismo receptor (Del Punta et al., 2002b). No obstante, unos años después, se demostró que en el BOA se genera un mapa en la CGI, en el que cada glomérulo recibe aferencias de neuronas vomeronasales que expresan receptores de la misma sub-familia (Wagner et al., 2006). Los autores de este trabajo demuestran que una célula principal del BOA puede recibir aferencias -en un mismo glomérulo- de neuronas vomeronasales que expresen genes -V1R- distintos, pero de la misma sub-familia, lo que en teoría implicaría que una dada neurona principal (o glomérulo) integraría información procedente de ligandos estructuralmente similares (Fig. 4; Wagner et al., 2006; ver Meeks et al., 2010).

2.5 Bulbo olfatorio accesorio

Como se ha mencionado anteriormente, las proyecciones centrales de las neuronas vomeronasales se dirigen hacia la parte posterior-dorsal del BOp y ahí establecen contactos sinápticos excitatorios en los glomérulos del BOA. Éste es el primer relevo sináptico en el SNC de la información internalizada por las neuronas vomeronasales y es la primera estructura -al igual que el BOp con respecto a los odorantes- en la que la información contenida en los estímulos feromonales es procesada en el encéfalo. La detección feromonal desencadena varias conductas de detección intra-específicas, como la identificación del sexo, la reproducción y la agresión entre individuos de la misma especie (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002). Estudios clásicos han demostrado con claridad las conductas específicas y contexto-dependientes que son mediadas por el SOA (Bruce, 1959; Vandenberg, 1975).

A diferencia de la gran cantidad de investigadores estudiando el SOP, la atención centrada en los estudios del SOA y en particular del BOA ha sido mucho menor en impacto y cantidad. Virtualmente, no existe información disponible acerca de la fisiología y el papel que desempeñan los tipos celulares del BOA en aspectos puntuales del procesamiento de información, con algunas excepciones que serán discutidas a continuación; por tal motivo en esta sección se hablará de la estructura anatómica del BOA, enfatizando las distinciones con respecto al BOp y también se discutirán los estudios funcionales que se han hecho en el BOA.

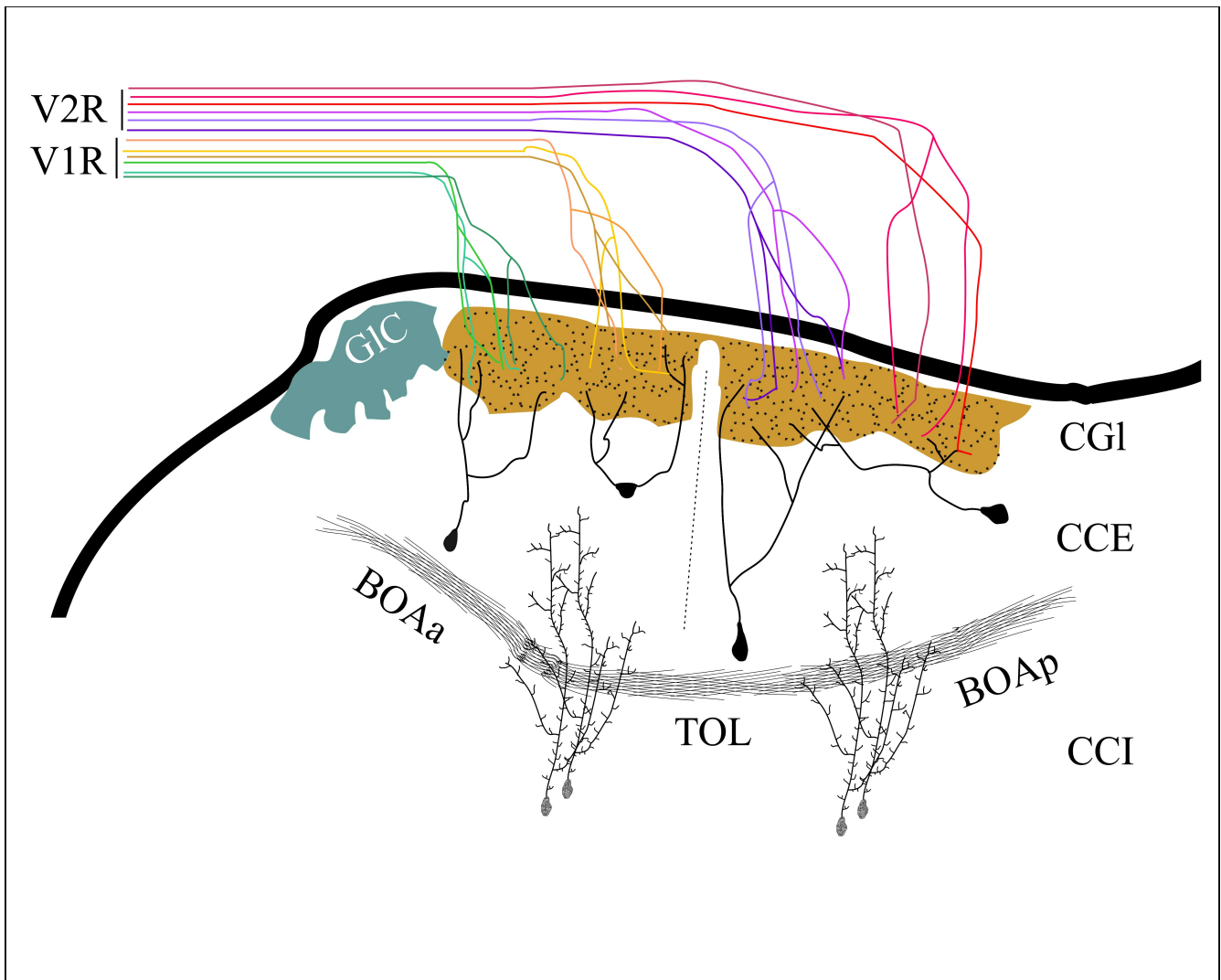


Figura 4. Esquema representativo del BOA. En el esquema se muestra la organización general del BOA, la línea vertical corresponde a la *línea alba* y divide al BOA en una porción anterior y posterior; cada mitad recibe aferencias de neuronas vomeronasales que expresan familias de genes distintos (V1R y V2R). CGI: glomérulos; CCE: las neuronas principales del BOA se distribuyen a lo largo del eje dorso-ventral de la capa celular externa, nótese que sus dendritas se afilian a más de un glomérulo distinto. CCI: en la capa celular interna se ubican las neuronas Grs del BOA. GIC: glomérulos del cuello. Los axones de neuronas que expresan receptores de la misma sub-familia (colores similares) pueden inervar el mismo glomérulo, referido de Wagner et al., 2006.

Anatomía del BOA

En breve, algunas de las diferencias anatómicas más notorias entre el BOp y BOA son que los axones que componen el nervio vomeronasal de éste, colateralizan antes de inervar su glomérulo correspondiente; adicionalmente, la CGI en el BOA es mucho más gruesa y los límites de los glomérulos son imprecisos. Por otra parte, no obstante que las neuronas de proyección del BOA comparten ciertas características con las neuronas MIs, rara vez presentan un cuerpo celular con morfología MI (ver Resultados), por lo que dicho término resulta inadecuado y las neuronas análogas a las MIs y EMs son referidas como neuronas principales (NPs). En lo referente al axón de la NP del

BOA, éste es recurrente y emite fibras colaterales en la extensión antero-posterior del BOA, antes de integrarse al TOL (ver Resultados; Larriva-Sahd, 2008).

Por otro lado, mientras que la localización de las células MIs en el BOp se circunscribe a una capa (MI), las NPs del BOA se estratifican y distribuyen en la extensión dorso-ventral de la capa celular externa (CCE; Takami & Graziadei, 1991; Yonekura & Yokoi, 2008; Larriva-Sahd, 2008). Con respecto a éste último término (CCE), es importante destacar que la nomenclatura de las capas del BOA, esencialmente por extensión, pero sobre todo por un desconocimiento citoarquitectónico fino de la estructura, fue homologada con la del BOp. Lo anterior fue expuesto claramente en el notable trabajo de Larriva-Sahd (2008), en el que además de la descripción detallada de las diferencias esbozadas en los párrafos previos con respecto a la estructura BOp, el autor exhibe de manera elegante numerosas razones por las cuáles la nomenclatura en las capas del BOA no corresponde con la del BOp, por lo que se sugiere denominarlas (de dorsal a ventral): CGI, CCE y capa celular interna (CCI); éstas dos últimas son intersectadas por el TOL (para detalles ver Larriva-Sahd, 2008).

Otra distinción importante del BOA con respecto al BOp, se manifiesta en la conectividad de las NPs con sus respectivos glomérulos, ya que se ha demostrado en varios estudios que éstas poseen dendritas multiglomerulares, es decir, generalmente las dendritas de una sola neurona inervan más de un glomérulo y este fenómeno muy probablemente implica que la integración de la información sensorial también difiere con respecto a la del BOp (Takami & Graziadei, 1991; Yonekura & Yokoi, 2008; Larriva-Sahd, 2008). Finalmente, un aspecto destacable de la organización del SOA, y por ende del BOA, es la segregación del sistema en -al menos- 2 “canales de procesamiento” desde el órgano sensorial hasta algunas de las regiones cerebrales más centrales en la jerarquía de la representación sensorial (Mohedano-Moriano et al., 2007; consultar Von Campenhausen & Mori, 2000). Como se ha discutido en la sección precedente, el epitelio vomeronasal alberga poblaciones de neuronas sensoriales que expresan familias de receptores distintas y que son activadas por estímulos diferentes. Las proyecciones centrales de dichas poblaciones de neuronas vomeronasales, se mantienen segregadas en sus blancos glomerulares en el BOA y por lo tanto emerge una organización celular que divide dicha estructura en dos porciones a lo largo del eje antero-posterior (ver Fig. 4; BOAa y BOAp).

Además de los marcadores moleculares que permiten la distinción entre estos dos sub-sistemas

(Halpern et al., 1995; Berghard & Buck, 1996; Mori et al., 1987; Yoshihara et al., 1997), existe también una referencia anatómica que divide al BOA en dos mitades especulares, denominada *línea alba* (Fig. 4; Larriva-Sahd, 2008). Al día de hoy, a saber del autor de esta tesis, no hay estudios que reporten si existen interacciones (conectividad) entre ambas mitades del BOA (ver Resultados), cuestión que es de suma relevancia para el entendimiento de cómo el BOA maneja la información procedente del OVN, pero sobre todo con respecto a la influencia que un tipo de sub-sistema (vomeronasal-apical-BOAa vs. vomeronasal-basal-BOAp) pueda tener sobre el otro.

Con respecto a los sitios de proyección de las NPs del BOA, se ha demostrado desde hace tiempo que éstas se dirigen hacia el núcleo lecho del TOL, el núcleo medial de la amígdala, el núcleo lecho de la estría terminal y al núcleo cortical postero-medial de la amígdala (Scalia & Winans, 1975; Davis et al., 1978; de Olmos et al., 1978; Yoshihara et al., 1999). Sin embargo, en años más recientes, un par de estudios han sugerido la convergencia de vías olfatorias y feromonales en neuronas GnRHérgicas del área pre-óptica medial (Boehm et al., 2005; Yoon et al., 2005). Por otro lado, se ha descrito una población de neuronas, también en el área pre-óptica medial que expresan *Galanina* y que aparentemente regulan de manera directa la emergencia de conductas parentales hacia individuos neonatos; notablemente, la actividad de estas neuronas depende de un OVN intacto (Wu et al., 2014).

Fisiología del BOA

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios de caracterización funcional del BOA (electrofisiológicos o de imagen), tanto *in vitro* como *in vivo*, son comparativamente mucho más escasos que lo reportado hasta ahora en el BOp, por lo que una discusión de las funciones atribuidas a capas o grupos neuronales en específico no es factible. Por tal motivo, se expondrán aquí los hallazgos funcionales más relevantes con respecto a cómo el BOA maneja la información procedente de las neuronas vomeronasales.

Debido a la dificultad que implica un registro *in vivo* en el BOA, son pocos los estudios que han reportado registros de la actividad eléctrica de neuronas en el BOA en respuesta a estímulos naturales controlados por el investigador (Luo et al., 2003; Zhang et al., 2007; Hendrickson et al., 2008; Ben-Shaul et al., 2010; Tolokh et al., 2013; Zylbertal et al., 2015; Kahan & Ben-Shaul, 2016). El primero de estos trabajos resalta por que en él se reportan respuestas de unidades antes estímulos feromonales

(exploración a otros animales), destacan las respuestas selectivas de algunas neuronas a combinaciones específicas de sexo y cepa, respuestas inhibitorias de algunas unidades ante la exploración y la persistencia en las respuestas a pesar de ya no haber estimulación sensorial (ver Discusión; Luo et al., 2003).

En Zhang et al., (2007) los autores llevan a cabo registros extracelulares *in vivo* de neuronas MIs del BOA en zarigüeyas; reportan que la mayoría de las neuronas (registradas en machos) responden de manera preferente a la orina de hembras (~70%). En general, los investigadores encontraron dos perfiles de respuesta ante la orina presentada, neuronas que podían responder al estímulo con incrementos en la frecuencia de disparo seguidos por periodos de inhibición y neuronas que exhibían decrementos en la frecuencia de disparo ante el estímulo (Zhang et al., 2007).

Trabajos posteriores con registros extracelulares *in vivo* confirmaron que las NPs del BOA son altamente selectivas en la detección de estímulos feromonales presentes en la orina (Hendrickson et al., 2008; Tolokh et al., 2013) y en la saliva (Ben-Shaul et al., 2010), la actividad de estas neuronas refleja la capacidad del SOA para discriminar entre orina procedente de hembras o machos (Hendrickson et al., 2008; Ben-Shaul et al., 2010; Tolokh et al., 2013). Un trabajo de este mismo año reporta por primera vez que la actividad de las neuronas del BOA es modulada por secreciones vaginales, orina y saliva en función de la cepa y el estado reproductivo del donador y que la detección de determinados estados fisiológicos (p ej., estro) requiere la actividad concertada de múltiples unidades (Kahan & Ben-Shaul, 2016). Más aún, se ha demostrado que la inhibición lateral en el BOA juega un papel importante en la detección de dichos estímulos, determinada por la selectividad de las respuestas neuronales en función del sexo del que proviene la muestra de orina (Hendrickson et al., 2008; Tolokh et al., 2013) y que la actividad de unas cuantas neuronas en el BOA, analizando los cambios en la tasa de disparo en escalas temporales de segundos, es suficiente para discriminar fielmente la cepa y el sexo de los individuos donadores (Tolokh et al., 2013).

2.6 Interacciones entre el SOA y el SOP, respuestas compartidas

En esta última sección dentro del apartado de Antecedentes, se discutirán las evidencias que muestran que ambos sistemas -SOA y SOP- son capaces de participar en la detección de odorantes y feromonas,

especialmente el BOp. Se revisarán vías paralelas dentro del SOP dedicadas a la detección de feromonas y se discutirán los novedosos descubrimientos hechos en años recientes relativos a nuevas familias de receptores descritas en los diversos órganos quimio-sensoriales presentes en la cavidad nasal. Destaca de manera importante que prácticamente todas las células sensoriales que expresan receptores no-canónicos (distintos de ROs, V1Rs y V2Rs) y que median conductas específicas proyectan sus axones a la zona de intersección entre el BOp y el BOA; el LO (Fig. 5).

La observación de que ambos sistemas pueden ser activados y/o son necesarios para la detección de odorantes y feromonas (Trinh & Storm, 2003; Lin et al., 2004; Xu et al., 2005; Spehr et al., 2006; Larriva-Sahd, 2008 & 2012; Ferrero et al., 2011; Matsuo et al., 2015) es relevante para el planteamiento de la hipótesis puesta a prueba en este estudio. La ausencia de interacciones neuronales reportadas entre el BOA y el BOp ha derivado en que las respuestas compartidas o “función cruzada” entre ambos sistemas sean atribuidas a la convergencia de información en áreas cerebrales “río abajo” en la jerarquía del procesamiento olfativo, por lo que uno de los objetivos del presente estudio fue preguntar si existen conexiones neuronales directas entre el BOA y el BOp.

Como se ha mencionado, el descubrimiento en los últimos ~15 años de una variedad de nuevas familias de receptores dedicados a la detección de estímulos químicos, que en la mayoría de los casos detectan moléculas que generan respuestas conductuales específicas o señalizan factores claves para la supervivencia del animal (Munger et al., 2010; Ferrero et al., 2011; Greer et al., 2016), sugiere que los sistemas de detección olfatorios actúan de manera sinérgica y que podría haber una comunicación directa entre el BOA y el BOp.

Por ejemplo, se reportó la presencia de una sub-clase de neuronas sensoriales en el EO que expresan a la guanilato ciclasa-D (GC-D) como receptor de membrana (Fulle et al., 1995; Juilfs et al., 1997); estas neuronas proyectan sus axones a la zona del LO, específicamente a la región de los glomérulos del cuello (Fig. 5; Shinoda et al., 1989; Cockerham et al., 2009b; Munger et al., 2010), que fueron descritos inicialmente como estructuras esenciales para las interacciones entre madre y cría durante la lactancia (Teicher et al., 1980). Se ha demostrado en años posteriores que estas neuronas detectan ligandos específicos como hormonas peptídicas y estímulos gaseosos (Leinders-Zufall et al., 2007; Hu et al., 2007; Cockerham et al., 2009b; Munger et al., 2010); notablemente y a diferencia de lo que ocurre en

los glomérulos canónicos del BOp, los glomérulos del cuello son inervados por neuronas sensoriales que expresan receptores distintos y existe una gran cantidad de conexiones neuronales entre estos glomérulos (Cockerham et al., 2009a).

Este mismo año se demostró que la población de neuronas sensoriales del EO que expresan a la GC-D como receptor, también expresa una familia novedosa de receptores denominados MS4A (4 dominios trans-membranales), los axones de las neuronas que expresan estos receptores proyectan de manera exclusiva a la región de los glomérulos del cuello -LO- (Fig. 5) y parecen ser activadas por ácidos grasos (presentes en semillas que constituyen parte de la dieta de roedores) y por una feromona naturalmente aversiva (Greer et al., 2016). El resultado más sobresaliente del estudio, debido a que implicaría un cambio de paradigma en la organización de los sistemas olfativos, es que las neuronas que expresan estos receptores, pueden expresar más de uno diferente en una sola célula (Greer et al., 2016).

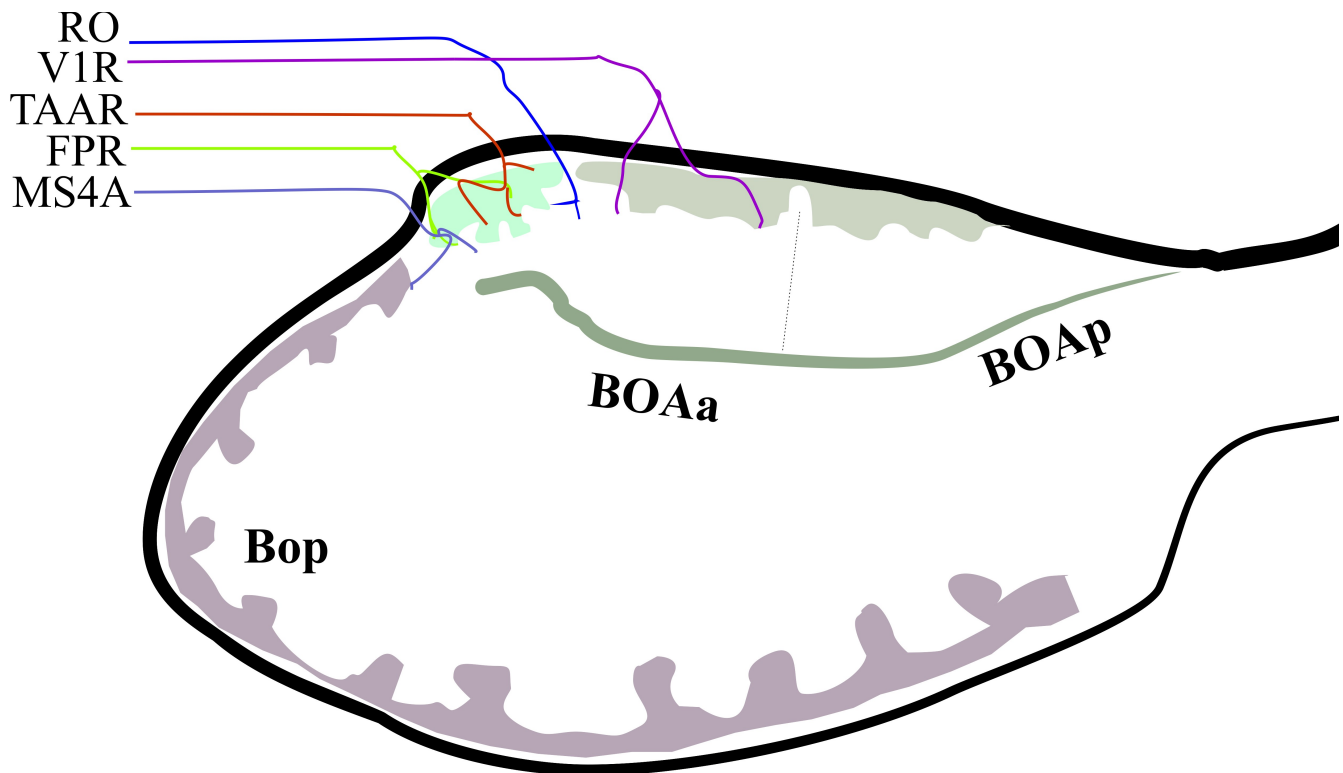


Figura 5. Aferencias sensoriales del limbo olfatorio. En el esquema se representa la variedad de axones expresando familias de genes distintos que inervan la zona del limbo olfatorio (RO, V1Rs, TAARs, FPRs, MS4As), en específico los glomérulos del cuello (azul claro).

Otra nueva familia de receptores en el EO fue descrita recientemente, los receptores asociados a trazas de aminas (TAARs por sus siglas en inglés; Liberles & Buck, 2006), que también son expresados en el ganglio de Grueneberg (Fleischer et al., 2007). Notablemente, se ha demostrado que los receptores TAAR4 y TAAR5 median, de manera respectiva, conductas de repulsión y de atracción específicas (Ferrero et al., 2011; Dewan et al., 2013) y que las proyecciones de estas neuronas inervan glomérulos adyacentes en la zona del LO (Fig. 5; Johnson et al., 2012). Todas las neuronas sensoriales del EO que expresan TAARs, convergen sus axones a la zona del LO (Johnson et al., 2012; Pacifico et al., 2012). Por otro lado, las neuronas en el ganglio de Grueneberg que expresan esta familia de receptores también envían sus axones a la zona del LO (Fuss et al., 2005; Storan & Key, 2006).

También en el EO, se demostró que existe una población neuronal que expresa el receptor TRPM5 y que éste es presuntamente activado por feromonas (Lin et al., 2007). Estudios subsecuentes demostraron que estas neuronas sensoriales forman parte de un circuito paralelo en el SOP dedicado a la detección de feromonas relevantes para la reproducción; específicamente, se demostró que estas neuronas proyectan sus axones a glomérulos ventro-mediales del BOp y que éstos, a su vez, envían la información de las feromonas detectadas a la amígdala medial (Thompson et al., 2012), un blanco sináptico no canónico del BOp (ver arriba). Estos reportes son consistentes con los de otro grupo que había descrito que el BOp ventral se activa ante la presencia de feromonas del sexo opuesto y que del BOp ventral emanan proyecciones que terminan en la amígdala medial (Kang et al., 2009 & 2011).

Con respecto al SOA, se ha demostrado que en la porción apical del epitelio vomeronasal, se expresan miembros de la familia de receptores a péptidos formilados (FPRs por sus siglas en inglés; Liberles et al., 2009; Riviere et al., 2009); la activación de estos receptores señala estados patológicos para el individuo receptor y su detección genera aversión (Boillat et al., 2015). Por otro lado, existe también un reporte de que en el OVN apical existen neuronas que expresan ROs canónicos (Levai et al., 2006) y también, este mismo año, se reportó la expresión del RO canónico *Olfcr692* en el OVN basal; dicha expresión presenta dimorfismo sexual y es dependiente del estado social del individuo (Nakahara et al., 2016). Las neuronas vomeronasales apicales que expresan FPRs y ROs canónicos proyectan a la región más anterior del BOAa (Dietschi et al., 2013; Levai et al., 2006). El reporte de la expresión de al menos dos tipos de ROs canónicos en el OVN abre la posibilidad de que el SOA sea capaz de detectar odorantes volátiles; alternativamente, los ligandos de estas neuronas vomeronasales podrían evocar

conductas específicas.

Como es claro, el reciente descubrimiento de varias familias de receptores sensibles a químicos mediadores de conductas específicas; le añade un grado más de complejidad al estudio y entendimiento del ya de por sí complicado sistema olfatorio. El hecho de que ciertas conductas específicas, desencadenadas por estímulos también muy específicos sean mediados por el SOP y que probablemente formen parte de circuitos genéticamente determinados es interesante y no se esperaría de acuerdo a la concepción tradicional de que el SOP detecta principalmente odorantes volátiles. Estas respuestas cruzadas deben ser estudiadas a fondo y una nueva hipótesis de trabajo debe emerger con respecto a la detección de químicos en el ambiente, que considere a los sistemas de detección como complementarios.

La región de los bulbos olfatorios comprendida entre el BOAa y la porción postero-dorsal del BOp (LO), recibe aferencias de una variedad de órganos sensoriales y de células que expresan todas las familias de receptores quimiosensoriales descubiertos hasta ahora. La activación de la mayoría de estos receptores, independientemente del órgano sensorial en el que se expresen, señala aspectos determinantes para la supervivencia del individuo y evocan conductas específicas. Dada la heterogeneidad estructural descrita entre el BOA y el BOp; es decir, en el LO (Fig. 6; Larriva-Sahd, 2012) y el reporte del que el BOp dorsal es necesario para la emergencia de conductas evocadas por la detección feromonal (Matsuo et al., 2015), es plausible que haya comunicación sináptica entre el BOA y el BOp y en este proyecto nos propusimos contestar esta pregunta.

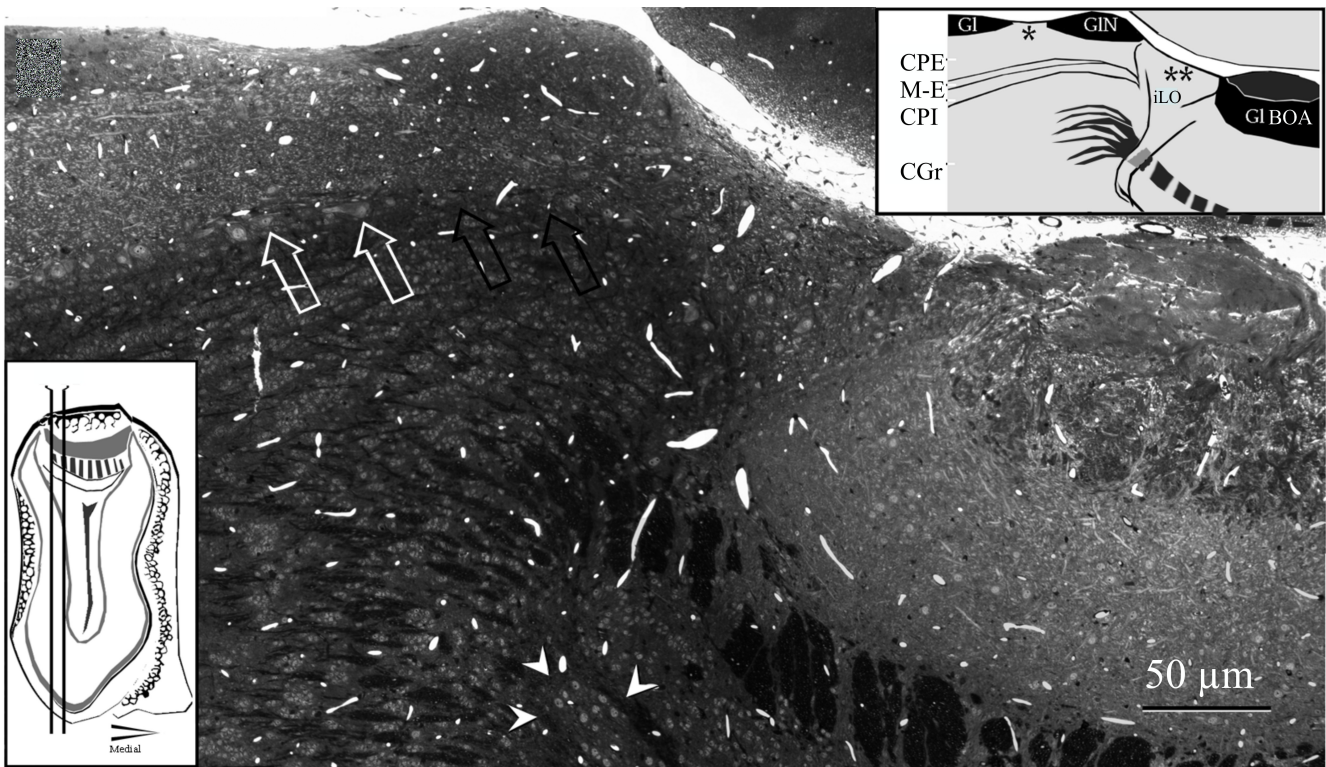


Figura 6. Organización celular del limbo olfatorio. La figura muestra un corte sagital del limbo olfatorio teñido con azul de toluidina; el inserto arriba muestra las zonas del limbo olfatorio; de derecha a izquierda: las capas celular externa y glomerular del bulbo olfatorio accesorio, el intersticio del limbo olfatorio (iLO), zona caracterizada por la pérdida de laminación en la organización celular, la zona de los glomérulos del cuello (GLN) y la región pre-olfatoria, caracterizada por una disminución en la densidad de neuronas mitrales (flechas); el asterisco marca el límite entre el limbo olfatorio y el bulbo olfatorio principal, el doble asterisco señala el límite entre el bulbo olfatorio accesorio y el propio limbo olfatorio. El inserto abajo muestra el nivel del corte.

III. OBJETIVO

- Obtener información acerca de las características electrofisiológicas de las neuronas ubicadas en el LO y de la conectividad de las mismas.
- Conocer si existe conectividad entre el BOAa y el BOp postero-dorsal.
- Conocer si existe conectividad entre el BOAa y el BOAp

3.1 Objetivos particulares:

- Caracterizar las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las NPs del BOA en modalidad de *patch-clamp*.
- Registrar en rebanada *in vitro* de rata adulta la actividad eléctrica de las NPs en respuesta a la estimulación eléctrica extracelular del BOp postero-dorsal y del BOAp.
- Obtener registros complementarios de neuronas ubicadas en el BOAp y determinar las respuestas de éstas últimas ante la estimulación eléctrica extracelular del BOAa.
- A través del llenado con biocitina de las neuronas durante su registro, obtener información neuromorfológica adicional.

IV. Relevancia e impacto del proyecto (JUSTIFICACIÓN)

Los estudios anatómicos realizados (Larriva-Sahd, 2008 & 2012) sugieren a un grupo neuronal específico (NPs del BOAa) como el sustrato de interacción entre el BOP y el BOA. El estudio de las relaciones funcionales entre dichas neuronas y ambos sistemas (BOP y BOA) podrá aportar información acerca del papel que éstas llevan a cabo en el procesamiento de ambas modalidades y del efecto/modulación que pueden ejercer sobre uno u otro sistema. Más aún, los datos que obtuvimos en este diseño experimental aportarán información necesaria para el estudio integral de ambos sistemas.

V. Estrategia experimental y métodos

5.1 Animales

Durante el desarrollo de este estudio, se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar*. Las ratas utilizadas y de las cuáles se obtuvieron los resultados presentados aquí tuvieron todas una edad de ~8 semanas (55 ± 3.4 días de nacidas). La manipulación y el sacrificio de los animales se hizo siempre atendiendo a los lineamientos de cuidado recomendados por el comité de bioética de nuestro Instituto y con la aprobación de dicha instancia. La manipulación y uso de animales experimentales criados en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM está aprobada para nuestro laboratorio (A-01), con el registro del proyecto “Organización citológica del encéfalo de los mamíferos”, registrado con el número de folio 060.

5.2 Obtención de rebanada viables de encéfalo y registro electrofisiológico

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (63 mg/Kg) y sacrificadas por perfusión intravascular de líquido cefaloraquídeo artificial modificado (LCRAM): La solución de LCRAM contiene (en mM): 238 de sacarosa, 3 de KCl, 2.5 de $MgCl_2$, 25 de $NaHCO_3$, y 30 de D-glucosa (pH = 7.4; Alvarado-Martínez et al., 2013). Al finalizar la perfusión, el animal es decapitado y el cerebro extraído y disecado en frío. Los bulbos olfatorios son separados del resto del encéfalo y pegados a un bloque de agar por su porción medial, de manera que los cortes obtenidos sean para-sagitales. Durante todo este proceso, el tejido encefálico es sumergido continuamente en LCRA normal con perfusión continua de gas carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). La composición del LCRA normal es la siguiente (en mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 25 $NaHCO_3$ y 30 D-glucosa (pH 7.4).

Una vez que el bulbo olfatorio se encuentra adherido al bloque de agar, la preparación es colocada en una caja Petri con LCRA y ésta a su vez es acoplada a un vibratomo (Leica VT1000S) para obtener las rebanadas parasagitales de bulbo olfatorio con un grosor de 350-400 μm . Se obtienen 2 rebanadas por cada BO, que son incubadas inmediatamente en LCRA con gaseo de carbógeno durante 1 hora para su recuperación. Finalmente, las rebanadas son transferidas a la cámara de registro ubicada en un microscopio (Eclipse E600FN; Nikon, Melville, NY) equipado con iluminación que genera contraste diferencial por interferencia. En la cámara de registro, la rebanada es ubicada en un pozo que puede contener hasta 3 ml y a través de un sistema de perfusión por bombeo de mangueras, el LCRA ($32 \pm$

0.5 °C) oxigenado circula por la cámara de registro con una tasa de flujo de 17 ml/m. Un total de 30 ml de LCRA recircula continuamente a través de dicha cámara. Los registros fueron hechos con pipetas (G150F-4; Warner Instruments, Handem, CT) “estiradas” en un *puller* P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA). Las resistencias de dichas pipetas fue de 2-5 MΩ; éstas son llenadas con una solución interna que contiene (en mM): 140 de gluconato de potasio, 1 de CaCl₂, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 4 LiGTP, 10 HEPES (pH 7.3-7.4) y biocitina al 1%.

Se utilizó la técnica de *patch-clamp* visual en modalidad de “célula completa” para la obtención de los registros. Las señales biológicas fueron medidas a través de un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City, CA; Peña et al., 2010). Los registros siempre fueron enfocados a neuronas ubicadas en la CCE del BOA, particularmente, se obtuvieron 72 registros de neuronas ubicadas en el BOAa y 20 registros complementarios de neuronas ubicadas en el BOAp. Una vez obtenido el sello y la configuración de célula completa; se obtuvo el patrón de disparo y las características intrínsecas de las neuronas registradas inyectado a éstas pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante. Durante estas inyecciones de corriente, las neuronas siempre permanecían en un valor de potencial de membrana estable (variable entre neuronas) y aquellas neuronas con alta actividad espontánea fueron hiperpolarizadas hasta reducir su tasa de disparo al mínimo, todos los registros fueron hechos en la modalidad de “fijación de corriente”.

Las variables electrofisiológicas medidas fueron: 1) Potencial de membrana en reposo (V_m): el voltaje trans-membranal (mV) medido inmediatamente después de haber obtenido la configuración de “célula completa”; 2) Umbral del PA: medido como el valor del voltaje membranal (mV) más negativo inmediatamente antes de que la célula genere la característica deflexión de “todo o nada” del PA. Para todas las células, se midió el umbral del PA al menos en 5 pulsos de corriente despolarizante; 3) Potencial “sag”: medido como la diferencia entre el valor máximo del voltaje desplazado (mV) y la etapa estable del mismo durante un pulso de corriente hiperpolarizante de 1 segundo, dicho pulso desplaza el potencial de membrana a valores más negativos que -80 mV, en cuyo caso se puede advertir si la célula presenta o no el potencial “sag”; las neuronas que presentaron una diferencia en dicho potencial mayor o igual a 2 mV fueron consideradas como neuronas que poseen dicha característica; todas las mediciones fueron obtenidas al promediar al menos 5 ensayos; 4) Constante de tiempo de membrana (τ_m): medida (mseg) al ajustar una curva exponencial a la fase de decaimiento de un pulso

sub-umbral de corriente despolarizante; 5) Frecuencia de disparo: medido como el número de PAs generados por una neurona durante un pulso supra-umbral de corriente despolarizante de 1 segundo de duración (Hz); para todas las neuronas, se definieron valores mínimos de pulsos de corriente despolarizante capaces de evocar al menos 1 PA y dichos valores de corriente se multiplicaron por 2 para cuantificar la frecuencia de disparo; 6) Adaptación en la frecuencia de disparo: obtenido dividiendo t_2/t_1 , en donde t_2 es el tiempo transcurrido entre los dos últimos PAs de una ráfaga y t_1 el tiempo transcurrido entre los dos primeros PAs de la misma ráfaga; 7) Reobase: definido como la cantidad mínima de corriente despolarizante inyectada capaz de generar al menos un PA en la neurona estudiada; 8) Duración media: medido como la duración (mseg) del primer PA de una ráfaga al 50% de su amplitud máxima; 9) Resistencia: medida utilizando la ley de Ohm, al dividir el voltaje desplazado entre la corriente inyectada, durante al menos 5 pulsos de corriente hiperpolarizante.

Para las neuronas que presentaron ráfagas de potenciales de acción rítmicas de manera espontánea (ver Resultados) se obtuvieron los siguientes parámetros: 1) Intervalo entre las ráfagas (IER), definido aquí como el tiempo que pasa entre el pico (amplitud máxima) del último PA de una ráfaga y el pico del primer PA de la siguiente ráfaga; 2) Duración de las ráfagas (DR), medido como el tiempo que transcurre entre el pico del primer PA de una ráfaga y el pico del último PA de la misma ráfaga; y 3) Frecuencia de disparo de las ráfagas (FR), medido al dividir el número de PAs entre el tiempo (seg) que dure la ráfaga. Para cada parámetro se utilizaron los datos de 60 mediciones. Estos parámetros fueron medidos antes y después de incubar a la rebanada con 20 μm de CNQX y DL-APV (Sigma, St Louis, MO). Buscamos diferencias estadísticamente significativas comparando los promedios de cada variable para cada neurona en su condición control y experimental y también comparando el promedio global de cada parámetro en ambas condiciones utilizando pruebas *t de student* pareadas.

Para determinar principios de conectividad entre el BOP y el BOA y dentro del BOA, aplicamos estímulos eléctricos de campo extracelulares en la región dorsal-posterior del BOP (inmediatamente anterior al LO; Larriva-Sahd, 2012) y/o en el BOAp cuando los registros fueron hechos en el BOAa, mientras que la estimulación eléctrica se aplicó en el BOAa y en la región postero-dorsal del BOP cuando las neuronas registradas se encontraban en el BOAp. Los estímulos eléctricos fueron aplicados con un electrodo concéntrico bipolar, con una separación entre sus puntas de 50 μm (Peña et al., 2002, 2010; Zavala-Tecuapetla et al., 2014). Con este instrumento, se aplicaron breves pulsos cuadrados de

corriente (100 μ seg, 0.05 Hz) y la amplitud del estímulo fue variada en función de la respuesta obtenida.

La mayoría de los registros fueron hechos con una frecuencia de muestreo de 1 KHz, sin embargo, se obtuvieron registros adicionales con una frecuencia de muestreo de 10 KHz con propósitos verificativos. Se utilizó un *headstage* HS-2 (Molecular Devices) con una ganancia de 0.01 MU. Las señales fueron muestreadas con una tarjeta analógico-digital (BNC-2110, National Instruments) para convertir la señal biológica (análoga) en una señal digitalizada. Las señales registradas fueron monitoreadas *en línea* con un software hecho a la medida (Lemus-Aguilar et al., 2006) y con un instrumento de adquisición (National Instruments, Austin, Tx) y fueron almacenadas en una computadora para su posterior análisis.

5.3 Histoquímica

Una vez hecho el registro, se llevó a cabo un procedimiento histológico para revelar la presencia de biocitina dentro de la neurona registrada y por lo tanto, la morfología de la misma. Para este objetivo decidimos utilizar la estrategia histoquímica de los acoplamientos avidina-biotina-peroxidasa de rábano. Los registros duraron mínimo 30 minutos y hasta 2 horas, al terminar el experimento, la pipeta de registro fue removida del cuerpo neuronal de manera gentil para evitar el daño a éste último; la rebanada se deja “reposar” *in situ* para que la biocitina difunda a los procesos distales. El procedimiento de “revelado” fue el siguiente:

- La rebanada se sumerge en fijador Saborsky durante al menos 48 horas: paraformaldehído al 4%, ácido pícrico al 1% en 100 ml de PBS.
- Lavar la rebanada en KPBS 1x 3 veces durante 25 minutos.
- Incubar la rebanada en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% durante una hora para eliminar la actividad de peroxidasas endógenas. El H_2O_2 se diluye en PBS.
- En una cámara multipozos o en un frasco independiente para cada rebanada, incubar el tejido en 1 ml de TBS-Tritón + 10 μ l avidina y 10 μ l de la enzima biotinilada del kit ABC (Vector Laboratories, Buringham, CA) durante toda la noche.
- Lavar las rebanadas con PBS 3 veces por 25 minutos cada lavado.

- Para llevar a cabo la reacción con el cromógeno diaminobencidina (DAB), disolver una tableta de TBS y una de DAB en 15 ml de agua desionizada, incubar las rebanadas, e inmediatamente después adicionar 0.003% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Lavar con KPBS 1x dos veces para detener la reacción.
- Montar las rebanadas en un portaobjetos.
- Observar al microscopio.

VI. RESULTADOS

Propiedades electrofisiológicas de neuronas principales del BOA

Durante este estudio, reportamos registros de *patch-clamp*, en configuración de célula completa, de 92 neuronas del BOA. Los registros fueron dirigidos en su mayoría a neuronas ubicadas en la porción anterior del BOA (BOAa; $n = 72$) y en menor medida a neuronas de la porción posterior del BOA (BOAp; $n = 20$). El objetivo principal de la obtención de dichos registros fue determinar principios de conectividad entre el BOA y el BOp y entre ambas mitades del BOA.

Cuando los registros fueron hechos en el BOAa, se aplicó estimulación eléctrica extracelular en la región postero-dorsal del BOp y en el BOAp, mientras que los registros obtenidos en el BOAp fueron acompañados de estimulación eléctrica extracelular del BOAa y del BOp. En total, 28 neuronas (30%) evocaron respuestas ante los estímulos aplicados. Dichas respuestas fueron clasificadas como antidrómicas y/o ortodrómicas, por la dirección en la que viaja el estímulo en la neurona registrada, es decir, desde el axón hacia el cuerpo de la neurona registrada o desde las dendritas hasta el cuerpo neuronal, respectivamente. La obtención de una u otra respuesta permitió concluir: 1) si existen conexiones entre las regiones estudiadas y 2) en qué dirección se establecen dichas conexiones neuronales. Específicamente, las respuestas antidrómicas son sugerentes de que la célula registrada envía axones (o colaterales) a la región estimulada, mientras que aquellas células que ante la estimulación eléctrica generan respuestas ortodrómicas, reciben aferencias de neuronas activadas por el estímulo eléctrico aplicado.

En todas las neuronas registradas, medimos algunas variables electrofisiológicas. Para cada neurona, aplicamos pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante con duración de 1 segundo; las respuestas de las neuronas ante dichas inyecciones de corriente nos permitieron obtener los siguientes parámetros poblacionales (media \pm error estándar). $V_m = 63.5 \pm 0.51$ mV; $\tau_m = 85.4 \pm 5.2$ ms; reobase = 129.7 ± 15 pA; umbral del PA = 45.45 ± 0.86 mV; adaptación en la frecuencia de disparo = 1.23 ± 0.07 ; duración media = 2.72 ± 0.12 ms; resistencia = 88.43 ± 5 M Ω y frecuencia de disparo = 10.21 ± 0.51 Hz. La figura 7 muestra histogramas de frecuencia de cada una de las variables medidas.

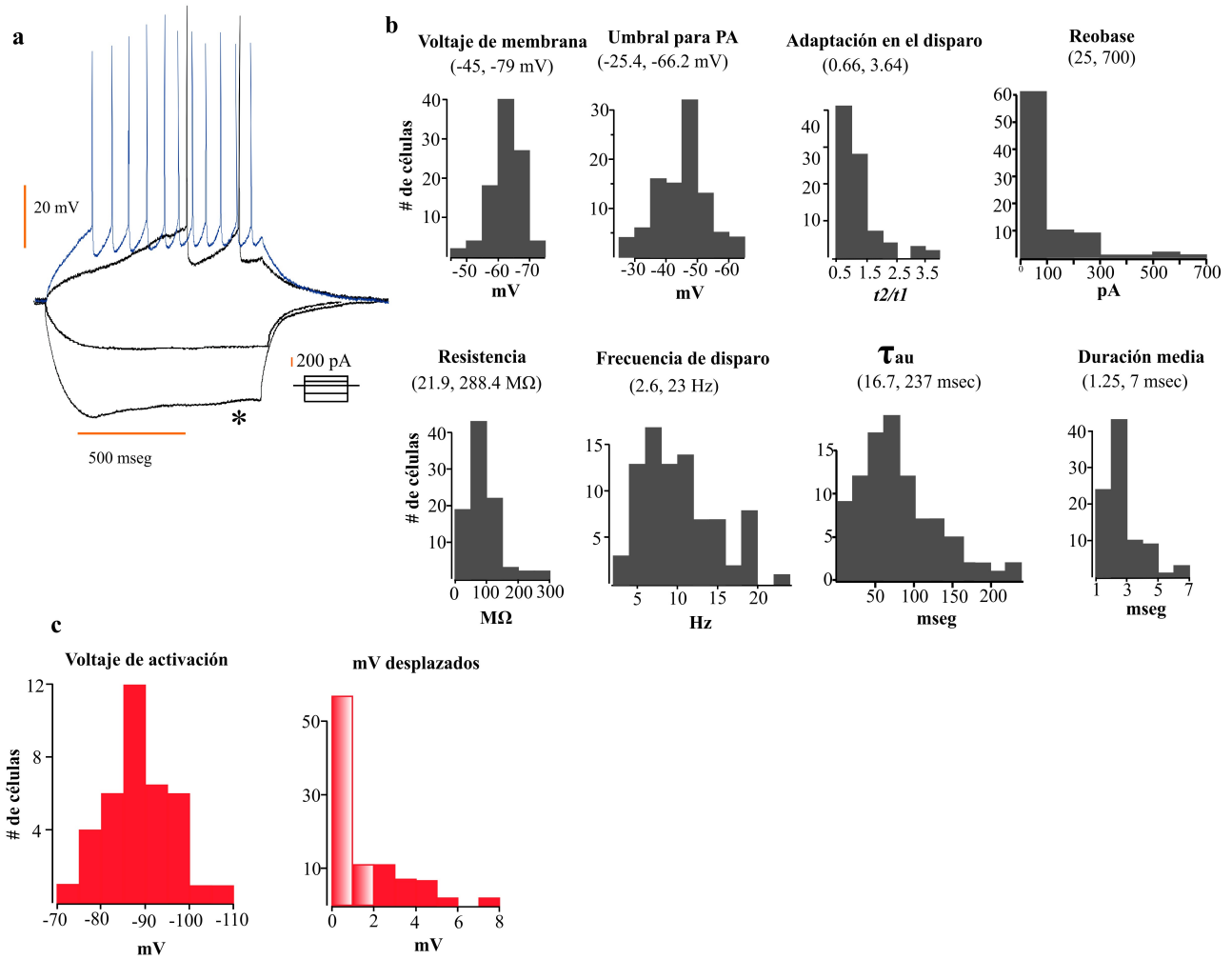


Figura 7. Propiedades electrofisiológicas intrínsecas de neuronas en el bulbo olfatorio accesorio. **a.** Trazos representativos del protocolo de inyección de corriente hiper y despolarizante; el trazo azul representa la corriente inyectada después de haber determinado la reobase (negro; ver métodos), el asterisco muestra el potencial “sag”. **b.** Histogramas que muestran la distribución poblacional de los valores obtenidos para cada una de las variables electrofisiológicas medidas; para cada variable, se muestra entre paréntesis el rango de los valores obtenidos. **c.** Histogramas que muestran el valor (mV) al que las neuronas que presentaron potencial “sag” activan la corriente subyacente (izquierda) y el voltaje desplazado por las neuronas que presentaron el potencial “sag”, las neuronas que desplazaron más de 2 mV fueron categorizadas como células que poseen esta característica (derecha, barras sólidas).

Encontramos que de la población total de neuronas registradas, solo el 40% ($n = 37$) de ellas presentó el potencial “sag”, que es una deflexión en el V_m que se activa a valores de voltaje > -90 mV y es acarreada por una corriente catiónica (Angelo & Margrie, 2011; Angelo et al., 2012; Fig. 7c). 28 neuronas del BOAa presentaron dicha característica, mientras que 9 mostraron lo propio en el BOAp. Las características (p. ej., la amplitud) de esta propiedad biofísica han sido demostradas como una “distinción” de afiliación glomerular en el BOp (Angelo et al., 2012).

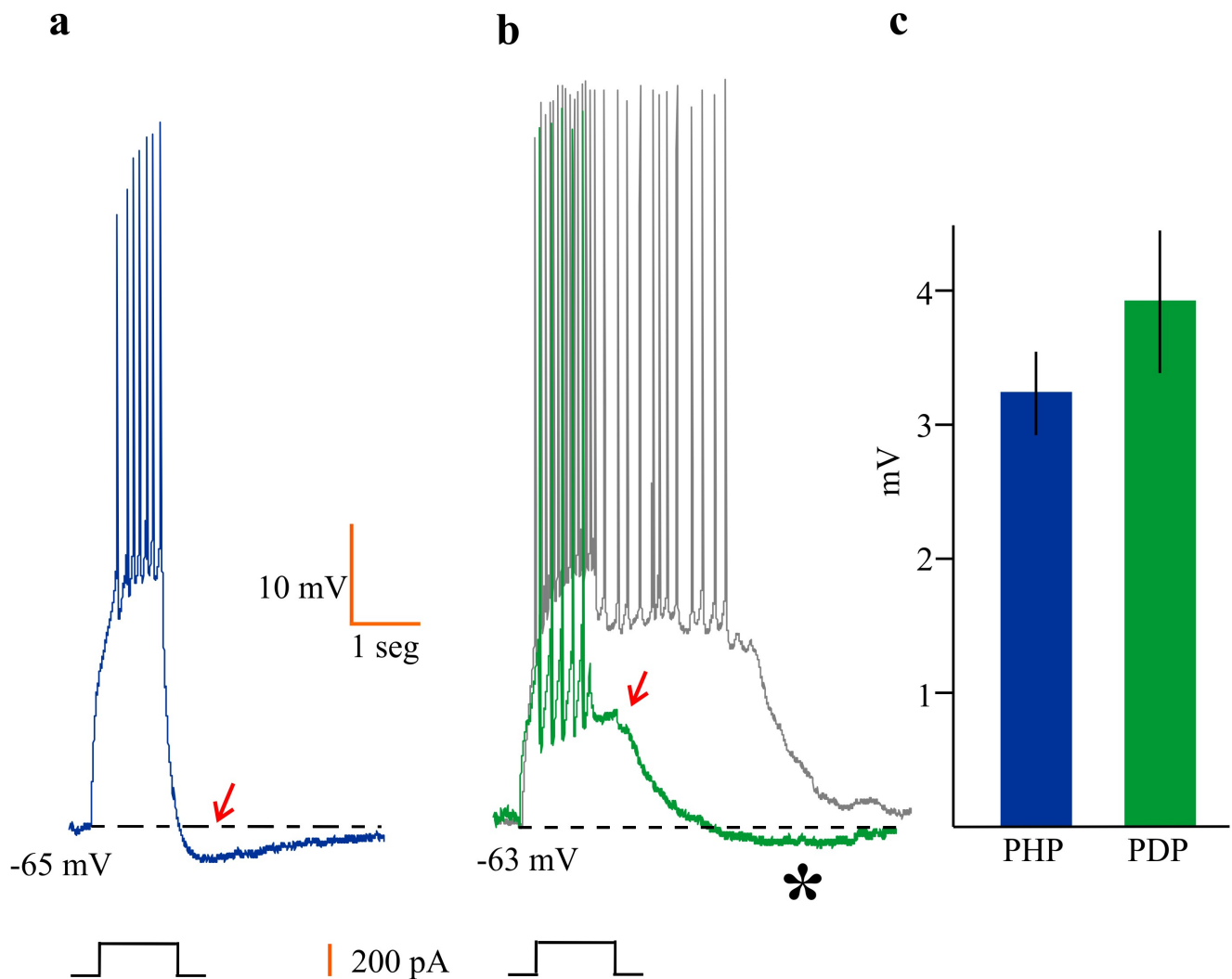


Figura 8. Post-potenciales en neuronas del bulbo olfatorio accesorio. **a.** 42% de las neuronas registradas mostraron post-hiperpolarizaciones (PHP; flecha). **b.** Otras neuronas mostraron post-despolarizaciones (PDP; flecha) o disparo persistente después de haber cesado la inyección de corriente (trazo gris; en total, 17%), mientras que algunas neuronas (6.5%) mostraron PHPs de cinética lenta (asterisco) después de una PDP. **c.** Promedio y error estándar del voltaje desplazado en las PHPs y PDPs.

Adicionalmente, encontramos que el 42% de las neuronas registradas ($n = 45$) mostraron post-hiperpolarizaciones (3.2 ± 0.31 mV) inmediatamente después de un tren de PAs evocado por un pulso de corriente despolarizante (Fig. 8a, c), mientras que el 17% de las neuronas ($n = 17$) presentaron una característica opuesta, es decir, generaron post-despolarizaciones (3.94 ± 0.52 mV) después de una ráfaga de PA (Fig. 8c). En 9 de dichas células, las post-despolarizaciones se sostuvieron a tal grado que generaron en la célula ráfagas de PAs sostenidas durante 1-10 segundos en ausencia de estimulación (inyección de corriente). Seis células exhibieron post-despolarización y post-hiperpolarización, ésta última emergiendo justo después de la post-despolarización (Fig. 8b).

Las neuronas principales del BOA producen ráfagas de potenciales de acción rítmicas, dependientes de voltaje y generadas intrínsecamente

El registro sistemático de NPs del BOA nos condujo a la descripción y confirmación de que, así como en el ratón (Gorin, 2014; Gorin & Spehr, 2014), el BOA de la rata adulta posee una sub-población de NPs capaces de generar ráfagas de PAs rítmicas, generadas endógenamente y cuya frecuencia depende del V_m (Fig. 9). Del total de 92 neuronas incluidas en este estudio, 22 de ellas (24%) presentaron esta característica; 19 fueron registradas en el BOAa y 3 en el BOAp (26% y 15%, respectivamente). Para una fracción de estas neuronas ($n = 5$), medimos algunos de los atributos de su peculiar forma de disparo (Fig. 9c).

Por lo tanto, obtuvimos los valores de el intervalo entre las ráfagas (3.21 ± 0.27 seg.), la duración de las ráfagas (1.41 ± 0.24 seg.) y la frecuencia de disparo de las ráfagas (15.02 ± 1.91 Hz; Fig. 9c) antes y después de la aplicación de los antagonistas de la transmisión sináptica glutamatérgica CNQX y APV ($20 \mu\text{M}$; Zavala-Tecuapetla et al., 2008, 2014). En experimentos posteriores, neuronas rítmicas fueron incubadas tanto con inhibidores de transmisión sináptica excitatoria (CNQX y APV) como inhibitoria (Bicuculina y Estricnina; $30 \mu\text{M}$; $n = 2$; Fig. 10). El disparo rítmico de estas células persistió ante la presencia de los fármacos mencionados, lo que nos permitió concluir que la generación de dichas ráfagas rítmicas es generada por mecanismos endógenos y no por actividad sináptica episódica.

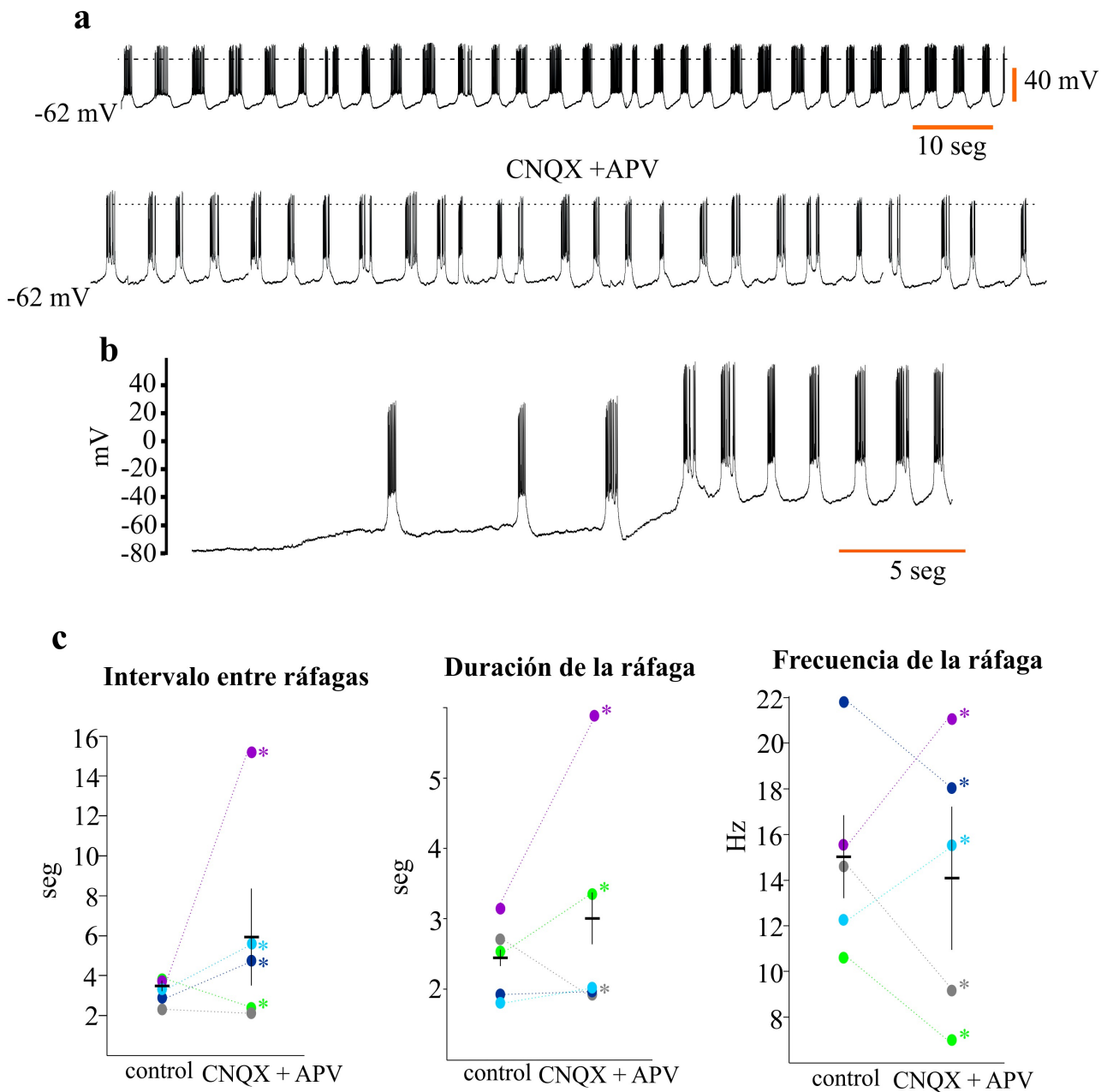


Figura 9. En el bulbo olfatorio accesorio hay una sub-población de neuronas principales con propiedades electrofisiológicas “rítmicas”. **a.** Trazo representativo de la actividad espontánea de las neuronas rítmicas (arriba), la neurona presenta ráfagas de potenciales de acción rítmicas en presencia de inhibidores de la transmisión sináptica glutamatérgica (CNQX y APV; 20 μ M; abajo). **b.** La frecuencia de las ráfagas de potenciales de acción rítmicas es dependiente de voltaje. **c.** En 5 neuronas rítmicas, comparamos los parámetros mostrados en las gráficas antes y después de la incubación con CNQX y APV; poblacionalmente, no encontramos diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, encontramos que los parámetros medidos sí cambiaron significativamente en algunas células comparándolas con sí mismas (asteriscos).

Todas las neuronas rítmicas que fueron visualizadas a través del proceso histoquímico de revelado ($n = 8$; ver métodos) y fueron analizadas morfológicamente, presentaron características somato-dendríticas cualitativamente indistinguibles de aquellas descritas para las NPs del BOA (Fig. XX). Dichas características son: 1) presencia de una o más dendritas glomerulares y 2) el axón cursando a través del

TOL. Más aún, las neuronas rítmicas frecuentemente poseían más de una dendrita glomerular; de manera sobresaliente, una de estas neuronas posee una dendrita glomerular larga, que se extiende a regiones que corresponden al BOp (Fig. 11i). Finalmente, también es importante destacar que la mitad de las neuronas que concluimos generan una proyección axonal hacia el BOp (ver abajo), presentan actividad rítmica (Fig. 12).

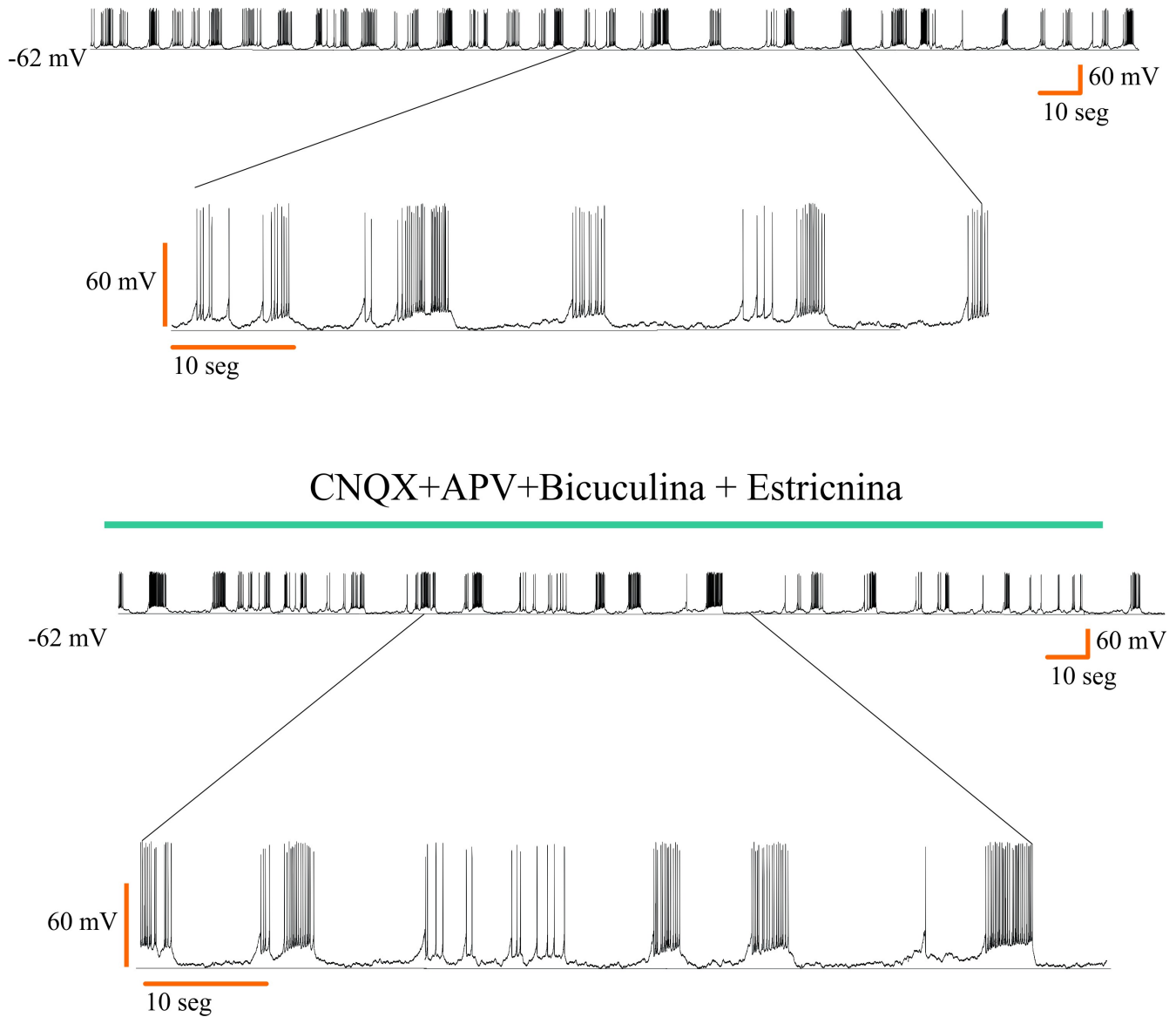


Figura 10. Las ráfagas de potenciales de acción rítmicas en las neuronas principales del bulbo olfatorio accesorio son generadas endógenamente. El cóctel de fármacos inhibidores de la transmisión sináptica (excitatoria: CNQX y APV $-20\mu\text{M}$ -; inhibitoria: Bicuculina y Estricnina $-30\mu\text{M}$ -) permitió demostrar que la actividad rítmica en estas neuronas es intrínseca ($n=2$).

Citología

La morfología de la mayoría de las neuronas visualizadas ($n = 41/44$; Fig. 11) corresponde a aquella descrita para las NPs del BOA (Takami & Graziadei, 1991; Yonekura & Yokoi, 2008; Larriva-Sahd, 2008). En ambas mitades del BOA las neuronas registradas poseen características distintivas que permitieron clasificarlas sin ambigüedad como NPs; éstas características son: el tamaño del cuerpo neuronal, la presencia de dendritas glomerulares y la incorporación del axón hacia el TOL. Para esta población de NPs, obtuvimos tres medidas del cuerpo; el largo ($20.41 \pm 0.87 \mu\text{m}$), el ancho ($12.47 \pm 0.64 \mu\text{m}$) y el área ($204.44 \pm 18.44 \mu\text{m}^2$), además de el número de dendritas glomerulares (3.1 ± 0.23).

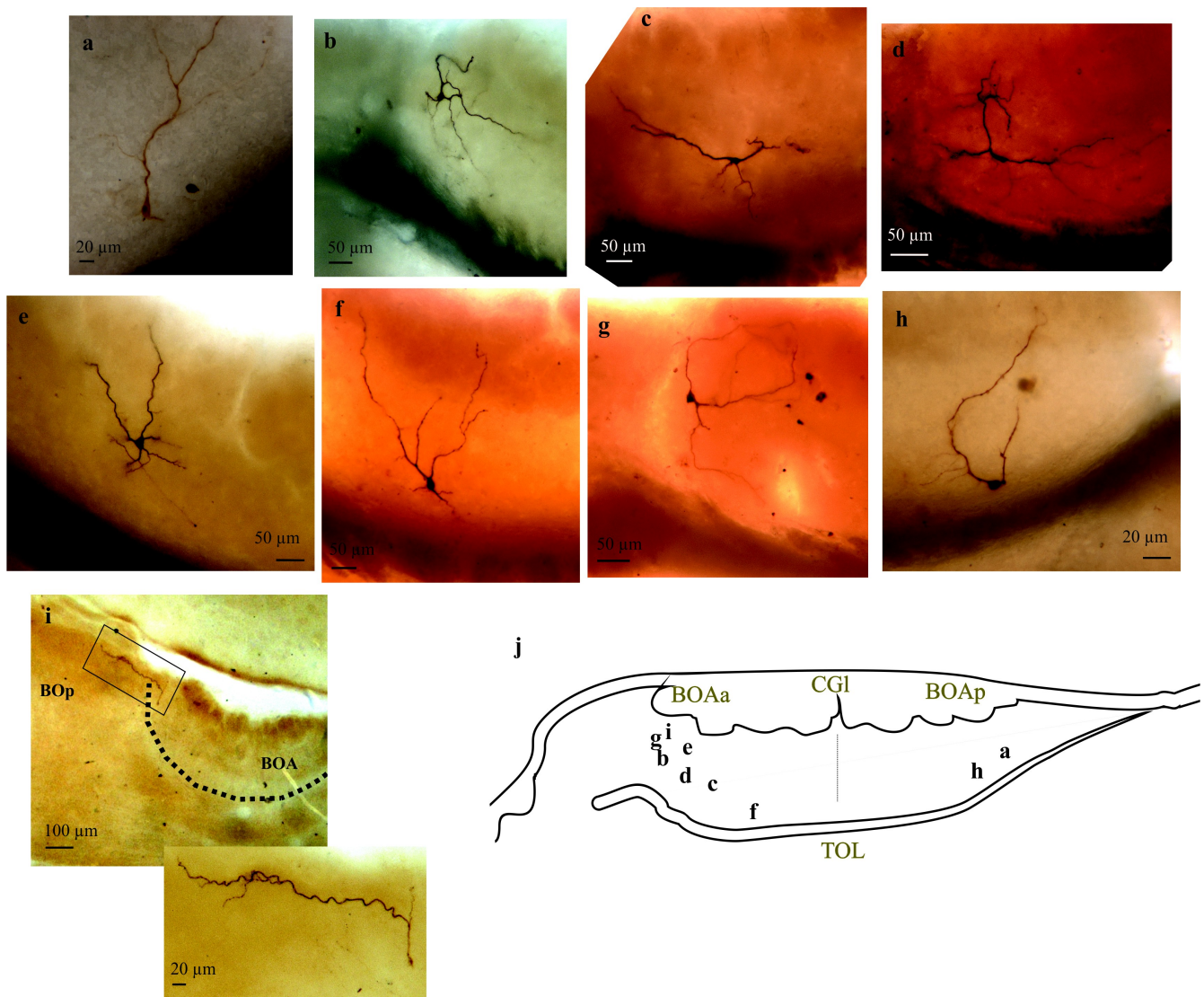


Figura 11. Neuronas principales del bulbo olfatorio accesorio. **a-i.** Fotografías representativas de neuronas principales del bulbo olfatorio accesorio. Note la variabilidad en morfología somática, número de dendritas glomerulares y posición de la neurona en el eje dorso-ventral; las neuronas en **d, e, i** son rítmicas. Cabe destacar que la neurona en **i** envía una de sus 2 dendritas glomerulares afuera del bulbo olfatorio accesorio y parece inervar glomérulos del cuello. **j.** Posiciones aproximadas en la rebanada sagital de bulbo olfatorio de las neuronas mostradas en la fotografías.

De manera consistente con reportes previos (Yonekura & Yokoi, 2008; Larriva-Sahd, 2008), las NPs del BOA, a diferencia de las MIs/EMs del BOp, no se encuentran en una capa celular definida, es decir, su disposición es aleatoria en toda la extensión dorso-ventral de la CCE y como se ha mencionado, la mayoría de ellas emiten más de una dendrita glomerular y en algunas ocasiones hasta 6. Estas características morfológicas son distintas de las encontradas en neuronas MIs/EMs del BOp, en las que hay una especificidad en la inervación de los glomérulos, ya que la mayoría emiten una única dendrita glomerular y por lo tanto, reciben información sensorial de uno o pocos receptores olfativos (Larriva-Sahd, 2008; Zibman et al., 2011)

Las neuronas principales del BOAa emiten colaterales hacia el BOp

Para las neuronas registradas en el BOAa ($n = 72$), encontramos que una proporción de ellas ($n = 6$, 8%) respondió ante la estimulación eléctrica del BOp con PAs antidrómicos (Fig. 12b, izquierda). Las respuestas antidrómicas evocadas en una célula nunca fueron precedidas de eventos sub-umbrales (p.ej., potenciales sinápticos) y tenían siempre una latencia de respuesta muy corta (1.97 ± 0.02 mseg). Estas respuestas persistieron a pesar de encontrarse la preparación en presencia de los inhibidores glutamatérgicos CNQX y APV ($20 \mu\text{m}$) (Fig. 12b, centro), lo que implicaba que la respuesta generada en la célula no era de naturaleza sináptica. Más aun, los PAs antidrómicos fueron siempre sometidos a pruebas de colisión (Fig. 12b, derecha).

La prueba de colisión para respuestas antidrómicas consiste en lo siguiente: generar un PA somático inducido por inyección de corriente a través de la pipeta de registro, seguido -con separación de unos cuantos mseg- de la estimulación eléctrica del BOp. Esta maniobra abole el segundo PA (el evocado por la estimulación eléctrica), lo que permite concluir la dirección en la que se propaga el PA (p.ej., del axón hacia el cuerpo de la neurona). Estos experimentos sugieren que las neuronas registradas emiten axones o colaterales hacia la zona estimulada.

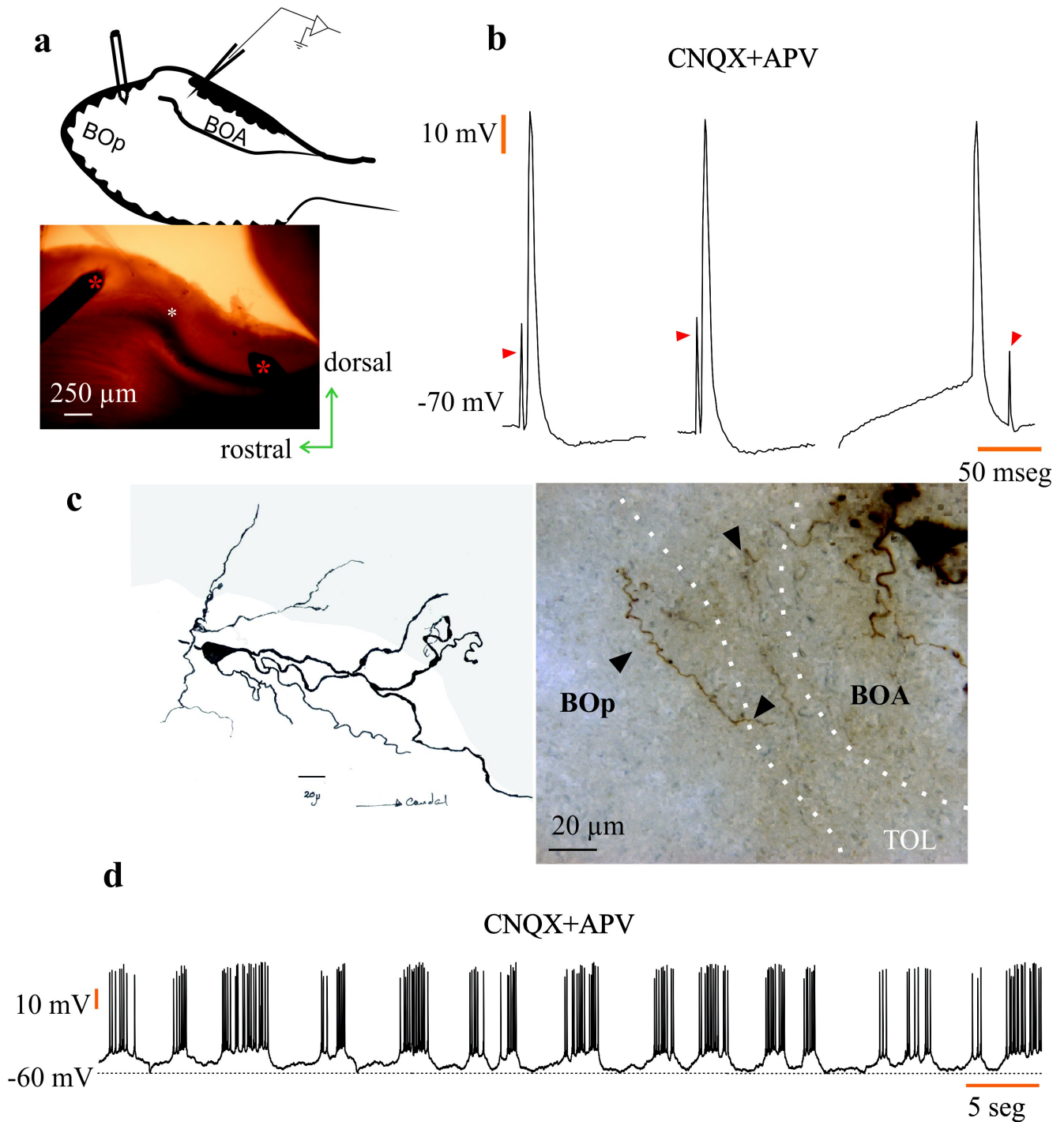


Figura 12. Una sub-población de neuronas principales emite colaterales a la región postero-dorsal del BOp. **a.** Esquema del diseño experimental (arriba) y fotografía del día del registro de la neurona mostrada en esta figura. **b.** Respuestas de la neurona registrada ante la estimulación del BOp postero-dorsal; la neurona responde con potenciales de acción antidrómicos ante la estimulación (izquierda) y éstos persisten ante la presencia de inhibidores glutamatérgicos (centro), las pruebas de colisión sugieren que la respuesta es de hecho antidrómica (derecha). **c.** Dibujo (izquierda) y composición fotográfica (derecha) de la neurona registrada, destacan las colaterales que se dirigen hacia el BOp (p. ej., a la zona de estimulación). **d.** La neurona registrada exhibe ráfagas de potenciales de acción rítmicas generadas endógenamente.

En efecto, la visualización *post-hoc* de las neuronas que respondieron ante la estimulación del BOp con PAs antidrómicos, permitió demostrar que estas células emiten colaterales axonales que se dirigen

hacia el BOp (p.ej., el sitio de estimulación; Fig. 12c). Las características somato-dendríticas de estas neuronas nos permitieron concluir que corresponden a NPs, dado que poseen dendritas glomerulares y su axón se incorpora al TOL. Por lo tanto, concluimos que en el BOAa existe una sub-población de NPs que envían colaterales a la región postero-dorsal del BOp. De manera sobresaliente, 3 de las 6 neuronas que evocaron PAs antidrómicos ante la estimulación del BOp exhibieron ráfagas de PAs rítmicas y dependientes de voltaje, que se mantuvieron en la presencia de inhibidores de la transmisión sináptica glutamatérgica (Fig. 12d).

Ambas mitades del BOA están recíprocamente conectadas

Como se ha mencionado anteriormente, los registros hechos en el BOAa ($n= 72$) fueron siempre acompañados de estimulación eléctrica extra-celular del BOAp; con este diseño experimental 18 células en total (25%) respondieron ante los estímulos eléctricos aplicados a la mitad opuesta del BOA. Estas neuronas respondieron con potenciales excitatorios post-sinápticos (PEPS; $n= 6$, 8%; Fig. 13b) o con PAs antidrómicos ($n= 8$, 11%; Fig. 14a). La duración media de los PEPS fue de 120 ± 18.65 mseg (media \pm error estándar), lo que sugiere que la respuesta sináptica se debe a la activación combinada de receptores tipo AMPA y NMDA (Forsythe & Westbrook, 1988; Trombley & Westbrook, 1990; Maccaferri & Dingledine, 2002). 4 de las 6 neuronas que presentaron PEPS tuvieron latencias de 3.07 ± 0.12 mseg (media \pm desviación estándar), tasa de fallo de $8 \pm 4\%$ y una variabilidad de estímulo a estímulo con un rango de 45 a 130 μ seg. Estos atributos sugieren que los PEPS son mono-sinápticos (Doyle & Andresen, 2001).

Posteriormente, nos preguntamos si las respuestas sinápticas generadas eran de naturaleza glutamatérgica, y para ello, aplicamos los inhibidores de la transmisión sináptica glutamatérgica CNQX y APV (20 μ m). En efecto, tras unos minutos en la preparación los fármacos aplicados tuvieron el efecto de bloquear por completo las respuestas evocadas (Fig. 13b). Estos resultados sugieren de manera contundente que existe comunicación mono-sináptica entre las dos mitades del BOA. 2 de las 6 neuronas que respondieron ante la estimulación del BOAp con PEPS exhibieron características morfológicas semejantes a las de las interneuronas; específicamente, su cuerpo se encontraba en la CCE y carecían de dendritas glomerulares, además, el axón de dichas neuronas generaba arborizaciones complejas en la vecindad del propio cuerpo neuronal y no se observó que se incorporase

al TOL (Fig. 13c); el resto de las neuronas poseían características morfológicas que nos condujeron a concluir que eran NPs (ver arriba).

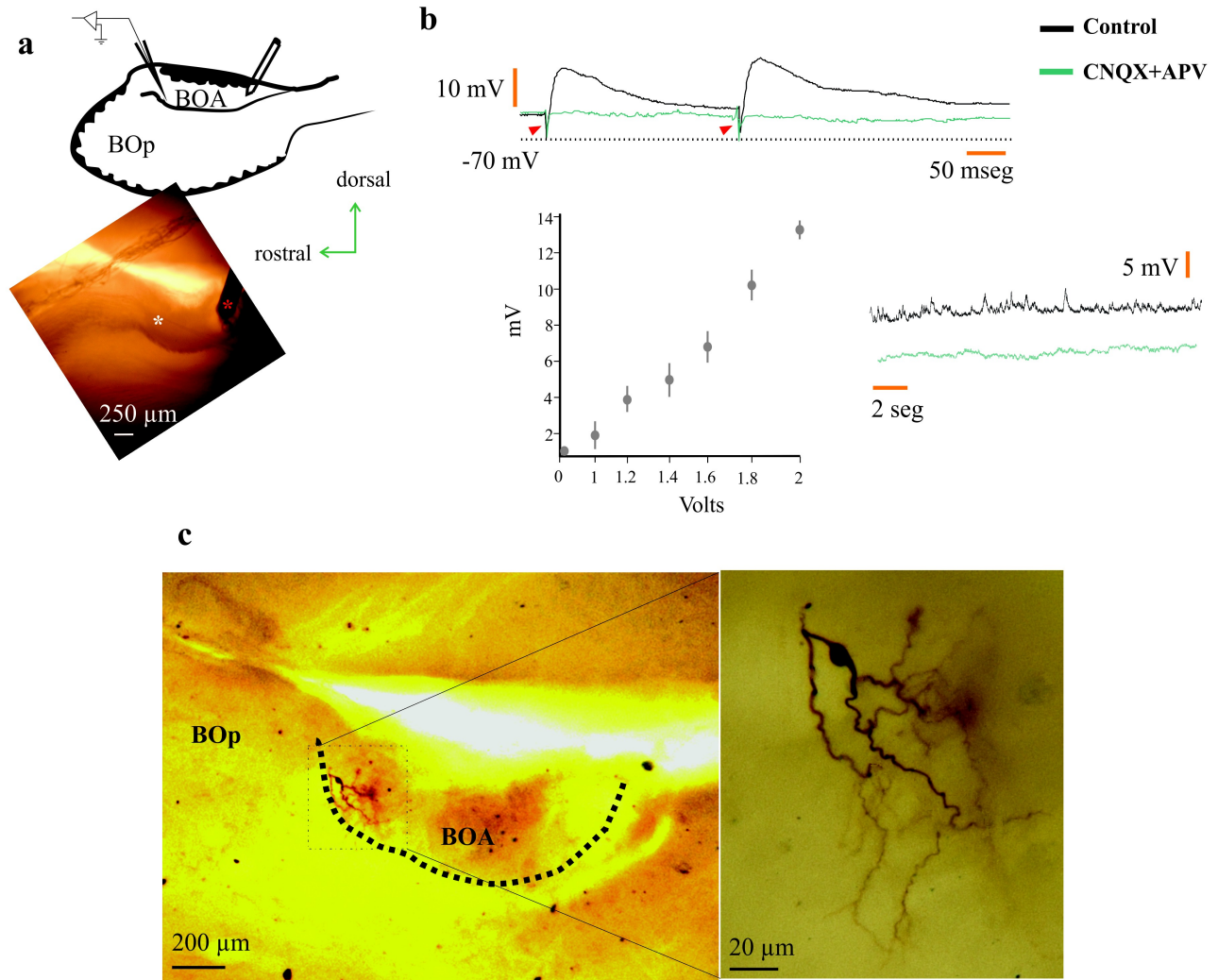


Figura 13. Las mitades anterior y posterior del bulbo olfatorio están recíprocamente conectadas. **a.** Esquema del diseño experimental (arriba) y fotografía del día del registro de la neurona mostrada en esta figura. **b.** Arriba, respuestas sinápticas (sub-umbrales) de la neurona registrada al estimular con pulsos pareados el bulbo olfatorio accesorio posterior, la respuesta se abate al inhibir la transmisión sináptica excitatoria; abajo, curva que representa la amplitud de los sinápticos evocados en función de la intensidad de la estimulación (izquierda) y trazo control de la actividad sináptica espontánea antes y después de incubarla la preparación con CNQX y APV (dercha). **c.** Fotografía que muestra la morfología de la neurona registrada en el bulbo olfatorio accesorio anterior.

Para las neuronas registradas en el BOAa que respondieron con PAs antidrómicos a los estímulos eléctricos aplicados en el BOAp, encontramos que en todas ellas las respuestas evocadas (PAs antidrómicos) se mantuvieron a pesar de estar la rebanada en presencia de inhibidores glutamatérgicos, así como también pudimos aplicar -en todas las neuronas- pruebas de colisión que previnieron la

generación del PA provocado por la activación eléctrica del BOAp (ver arriba; Fig. 14a). De notable importancia es el hecho de que, la inspección histológica de las neuronas registradas con dichas respuestas nos permitió confirmar la conclusión, inicialmente inferida por las respuestas electrofisiológicas, de que los PAs antidrómicos provocados se deben a que las neuronas emiten colaterales que cruzan la *línea alba* (Larriva-Sahd, 2008). En efecto, NPs del BOAa emiten colaterales axónicas que cruzan la *línea alba* y que terminan la porción opuesta a la zona donde se obtuvo el registro, es decir, en el BOAp (Fig. 14b).

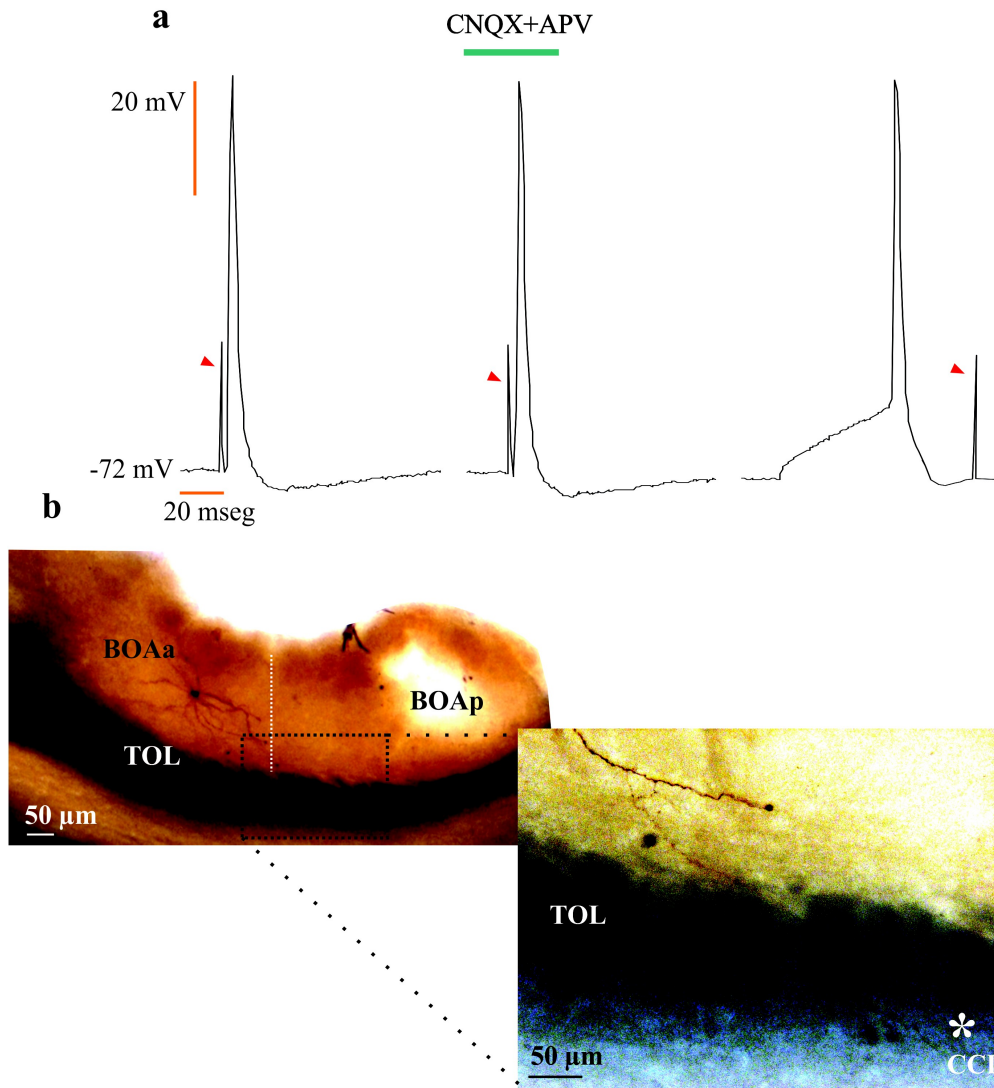


Figura 14. Las mitades anterior y posterior del bulbo olfatorio están recíprocamente conectadas. **a.** Respuesta antidrómica en neuronas del bulbo olfatorio accesorio anterior ante la estimulación del bulbo olfatorio posterior (izquierda), la respuesta persiste en presencia de CNQX y APV (centro) y el potencial de acción colisiona (derecha). **b.** Fotografía de la neurona registrada y acercamiento (abajo) en donde se muestra el detalle de la colateral emitida por la neurona, que cruza la *línea alba* y termina en la capa celular interna (CCI) del bulbo olfatorio accesorio posterior.

Finalmente, una muestra adicional de neuronas en el BOAp fueron registradas. Esto último con el motivo de conocer si la activación sináptica observada en neuronas del BOAa al estimular el BOAp es un evento recíproco, es decir, si también existen neuronas del BOAp que sean activadas sinápticamente al estimular el BOAa y/o si neuronas del BOAp emiten colaterales que cruzan la *línea alba*. Para tal efecto, se registraron 20 neuronas adicionales y tal como lo habíamos esperado, las neuronas registradas en el BOAp respondieron ante la estimulación eléctrica del BOAa con PAs antidrómicos ($n= 7$; 35%) o con PEPS ($n= 2$; 10%). Más aun, las pruebas de colisión y la inspección morfológica de las neuronas que evocaron PAs antidrómicos nos permitieron concluir que, así como las NPs del BOAa emiten colaterales que cruzan la *línea alba* y resuelven en el BOAp, NPs del BOAp hacen lo propio. Por otro lado, en las neuronas que evocaron respuestas sinápticas, éstas fueron abolidas por la incubación de fármacos inhibidores de la transmisión sináptica excitatoria (ver arriba).

En conjunto, los experimentos descritos en las secciones precedentes nos permitieron demostrar que ambas mitades del BOA se encuentran recíprocamente conectadas mediante dos mecanismos. Específicamente, hemos demostrado que una neurona ubicada en el BOAa es capaz de: 1) recibir aferencias sinápticas glutamatérgicas por parte de neuronas ubicadas en el BOAp y/o 2) una neurona principal del BOAa es también capaz de emitir colaterales axonales que cruzan la *línea alba* y muestran sitios de terminación en el BOAp, que potencialmente podrían establecer comunicación sináptica con neuronas del BOAp. Las mismas reglas básicas de conectividad aplican para neuronas ubicadas en el BOAp.

VII. DISCUSIÓN

Durante el presente estudio, se llevaron a cabo experimentos que nos permitieran obtener conocimiento acerca de la organización básica de los circuitos neuronales del BOA y de la relación de éste último con el BOp. Estudios fisiológicos y estructurales previos han demostrado que a diferencia del BOp, el BOA posee una organización celular y de conectividad en la que emergen dos “canales” de procesamiento de información dentro de dicha estructura; por lo tanto, en el BOA hay una clara segregación entre la mitad anterior y posterior. La evidencia estructural obtenida en nuestro laboratorio unos años atrás, sugería que podría haber interacciones entre ambas mitades del BOA a través de dos grupos de procesos neuronales, a saber, dendritas “accesorias” y axones, que “zig-zagean” en el eje antero-posterior del BOA antes de incorporarse al TOL (Larriva-Sahd, 2008).

De manera específica, con la impregnación de Golgi se ha descrito que las NPs del BOA poseen axones complejos que exhiben una morfología sinuosa con ramificaciones en ángulos muy abiertos ($\sim 180^\circ$), es decir, en direcciones opuestas en el eje antero-posterior, emitiendo colaterales definidas a cada lado. Por otro lado, dendritas accesorias (p. ej., no glomerulares) de NPs del BOA atraviesan la *línea alba* para resolver en el neuropilo de la mitad opuesta (Larriva-Sahd). Adicionalmente, estudios morfológicos en el área transicional entre el BOp y el BOA (ver Larriva-Sahd, 2012) sugerían que esta podría ser un área de integración y/o de conectividad entre ambos sistemas (principal y accesorio). Con esta información como un antecedente central, nos propusimos investigar si hay neuronas en el BOA que sean reclutadas ante la estimulación eléctrica de la porción postero-dorsal BOp. Por otro lado, preguntamos también si las neuronas de ambas mitades del BOA reciben contactos sinápticos de la mitad opuesta en la que reside su cuerpo y/o si estas mismas neuronas distribuyen sus axones en la mitad opuesta.

Finalmente y como se ha mencionado en secciones precedentes, el registro cotidiano de NPs en el BOA nos condujo al descubrimiento de una sub-población de neuronas con un perfil electrofisiológico bastante llamativo y previamente no descrito en el BOA. Encontramos pues, que en ambas mitades del BOA residen células principales que descargan ráfagas de PAs de manera rítmica, dependiente de voltaje y generadas endógenamente. Este hallazgo fue hecho simultáneamente por un grupo alemán, cuyos registros electrofisiológicos fueron hechos en ratón (Gorin, 2014; Gorin & Spehr, 2014).

La presencia de neuronas con dichas características en el BOA, sugiere que éstas células podrían desempeñar un papel importante, si bien desconocido, en aspectos de organización temporal en el procesamiento de la información que fluye a través de los circuitos del BOA. El hallazgo adquiere una relevancia mayor, debido a que algunas de estas neuronas resultaron ser parte de la sub-población de NPs que emiten colaterales que se distribuyen en la región postero-dorsal del BOp (región estimulada eléctricamente). Éste último resultado sugiere que podría haber una comunicación sináptica directa entre la mitad anterior del BOA y el BOp.

Santiago Ramón y Cajal propuso que las neuronas Grs son el sitio en donde convergen aferencias modulatorias extrínsecas y éstas células, a falta de su comprobación experimental, podrían ser uno de los blancos sinápticos de la proyección BOAa----BOp aquí descrita (ver Resultados; Larriva-Sahd, 2012). La evidencia neurofisiológica obtenida durante este estudio abre la posibilidad de que las NPs del BOA, típicamente reclutadas por la detección feromonal por parte de neuronas sensoriales del OVN, impongan un efecto sobre las neuronas MIs del BOp, a través de su interacción putativa con neuronas Grs del BOp (Martínez-García et al., 1991; Pressler & Strowbridge, 2006).

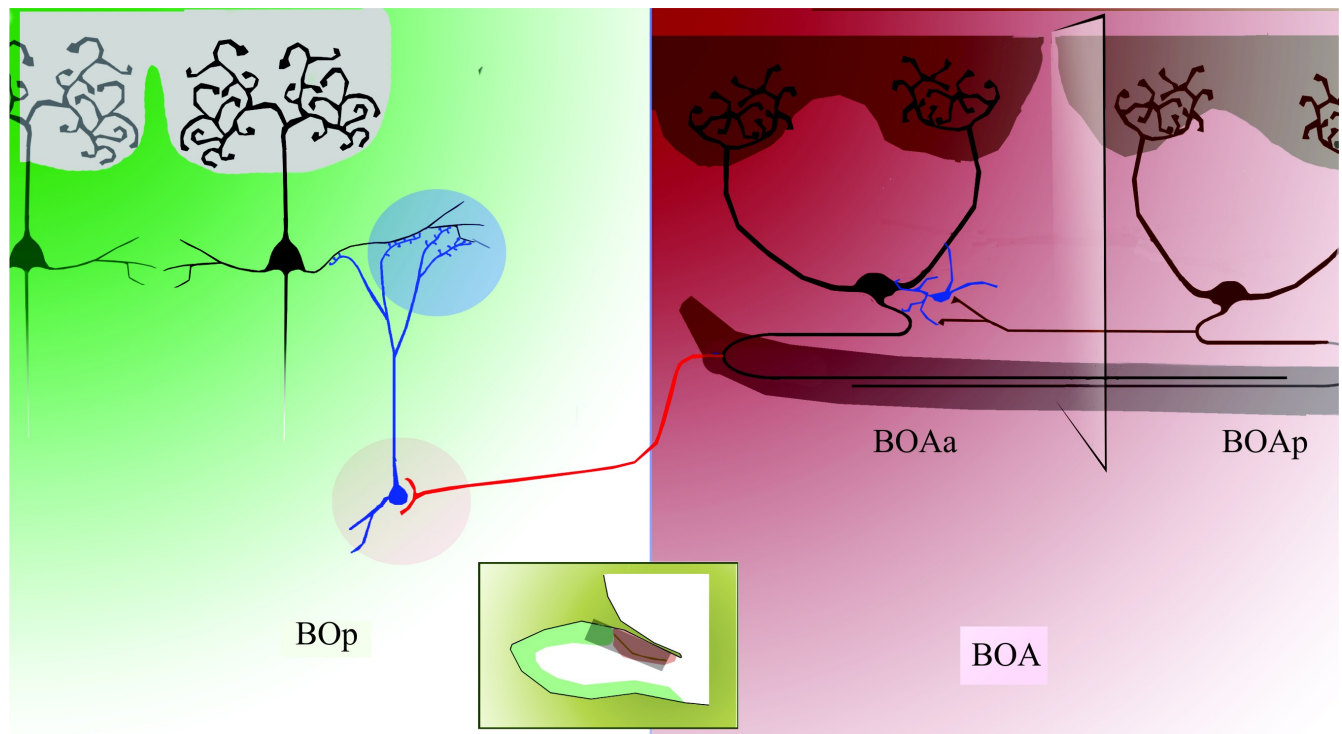


Figura 15. Esquema representativo de los hallazgos hechos en este estudio. Una sub-población de neuronas principales del bulbo olfatorio accesorio anterior envían colaterales al bulbo olfatorio principal. Adicionalmente, ambas mitades del bulbo olfatorio accesorio se encuentran conectadas a través de los axones recurrentes de las neuronas principales.

Presencia de neuronas rítmicas en ambas mitades del BOA

La confirmación (Gorin, 2014; Gorin & Spehr, 2014) de que al menos una sub-población de NPs del BOA posee un perfil electrofisiológico que corresponde a típicas células “marcapaso” es potencialmente relevante en al menos dos aspectos: 1) la descripción y el conocimiento del circuito del BOA y 2) la proyección por parte de estas neuronas hacia el BOp. En nuestras manos, la población de NPs que poseen “ritmicidad” corresponde al 24%, por lo tanto, además de su descripción en el ratón (Gorin, 2014; Gorin & Spehr, 2014), confirmamos la presencia de dicho tipo celular en el BOA de la rata adulta (Fig. 9).

Células con actividad rítmica de tipo “marcapaso” han sido descritas en el BOp. Se ha documentado ampliamente que las neuronas EMs externas constituyen a una sub-población, propia del BOp, que posee características electrofisiológicas similares a las reportadas en este estudio. Dichas neuronas exhiben ráfagas de PAs rítmicas generadas endógenamente (Hayar et al., 2004a & b; Liu & Shipley, 2008). Por otro lado, también se ha demostrado que un tipo de interneurona del BOp, las llamadas neuronas de Golgi, son capaces de generar ráfagas de PAs episódicas de manera estado-dependiente, es decir, en función del valor al que se encuentre el V_m (Pressler et al., 2013).

Las NPs del BOA descritas en este trabajo que presentan dicha actividad rítmica, generan ráfagas de PAs a una frecuencia mayor (15.6 ± 1.91 Hz) con respecto a aquellas descritas en el BOp, en las que la frecuencia de disparo de la ráfaga ha sido reportada dentro del rango de la banda θ (Hayar et al., 2004a; Pressler et al., 2013). Esto último sugiere que las descargas episódicas en neuronas del BOp emulan o “siguen” la pauta temporal de la respiración. Sin embargo, en el SOA, el acceso de los estímulos al OVN es distinto y se logra mediante procesos mecánicos (Meredith & O'Connell, 1979) y conductuales (Mann, 1961). Por lo tanto, las diferencias en la dinámica temporal en la que se detectan los estímulos químicos en sus respectivos órganos sensoriales (ya sean odorantes o feromonas), se observan también en características intrínsecas de neuronas que presentan perfiles electrofisiológicos similares, pero ajustados a operar dentro de sus contextos respectivos.

Otra diferencia conspicua que existe entre las neuronas “rítmicas” de ambos bulbos es su arborización dendrítica. Mientras que la gran mayoría de neuronas EMs externas exhibe una única dendrita glomerular (Hayar et al., 2004a), las NPs del BOA exhiben de manera frecuente al menos dos dendritas

glomerulares, y hasta 6 (3.1 ± 0.23). Destaca también que las dendritas glomerulares de neuronas en el BOA frecuentemente inervan glomérulos distintos, fenómeno que contrasta con la organización vista en el BOp, en donde, invariablemente, las NPs (ya sean MIs o EMs) envían dendritas glomerulares a un sólo glomérulo. Es por demás destacable que una de las neuronas rítmicas que fueron registradas durante este estudio, posee dos dendritas glomerulares, una de ellas comprometida con glomérulos del propio BOA, mientras que la otra dendrita, de manera notable, se extiende a distancias que exceden los límites del BOA para inervar los glomérulos del cuello (Fig. 11i). La morfología de esta neurona abre la posibilidad de que una única célula(s) del BOA sea el blanco sináptico -sitio de convergencia- de neuronas sensoriales expresando receptores de cualquiera de estas familias: ORs, VIRs, GCs, MS4As y TAARs.

La implicación funcional de un perfil electrofisiológico tan peculiar en el BOA es al momento desconocida y deberá ser estudiada a fondo de aquí en adelante. Sin embargo, dado que en el BOA es posible que cada glomérulo reciba aferencias de neuronas sensoriales expresando distintos receptores (Belluscio et al., 1999; Wagner et al., 2006) y que las neuronas de dicha estructura inervan a más de un glomérulo (Larriva-Sahd, 2008; Yonekura & Yokoi, 2008), una conjetura razonable es que éstas células probablemente tengan la cualidad de servir en propósitos de sincronización dentro de la red neuronal del BOA (Hayar et al., 2004b; Peña et al., 2004; Ramírez et al., 2004).

Independientemente del impacto funcional que tenga la descarga episódica de las neuronas rítmicas descritas en este trabajo, es claro que éstas células están comprometidas con la detección de estímulos feromonales (Leinders-Zufall et al., 2000; Boschat et al., 2002; Del Punta et al., 2002a; Luo et al., 2003) y algunas de éstas células envían colaterales al BOp; esta evidencia anatómica es sugerente de que, al menos algunas feromonas puedan tener un efecto modulador/interactivo en el procesamiento de odorantes volátiles por parte del BOp. Finalmente, a pesar de que en las neuronas que fueron incubadas con inhibidores de la transmisión sináptica glutamatérgica no encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los parámetros que medimos, parece ser claro que el glutamato modula la actividad de estas neuronas de manera diferencial (ver Fig. 9c). Para dos neuronas con actividad rítmica, además de incubar la preparación con los inhibidores ya mencionados, hicimos lo propio con inhibidores de la transmisión sináptica inhibitoria (Fig. 10); como era de esperarse, la actividad rítmica persistió, lo que nos permitió descartar de manera contundente que las ráfagas de PAs

rítmicas fueran impuestas por interacciones sinápticas a través de neurotransmisores.

Propiedades electrofisiológicas de las neuronas principales del BOA

Como se ha descrito en secciones previas, la mayoría de las neuronas registradas y cuya morfología fue revelada, poseen características que nos permitieron catalogarlas como NPs. Aunque no fue nuestro objetivo principal, definimos algunas de las propiedades electrofisiológicas que nos parecen relevantes. Por ejemplo, encontramos que células principales en ambas mitades del BOA tienen la cualidad de persistir en sus descargas una vez que el estímulo ha cesado (Fig. 8b). Esta propiedad ha sido reportada para neuronas del BOA tanto en condiciones *in vitro* (Shpak et al., 2012), como *in vivo* (Luo et al., 2003; Zylbertal et al., 2015). Se ha sugerido que esta propiedad intrínseca podría estar asociada a la decodificación de estímulos socialmente relevantes (Shpak et al., 2012) en el BOA y que puede subyacer a procesos cognitivos complejos como la memoria de trabajo (Romo et al., 1999).

En un trabajo reciente se demostró que el mecanismo subyacente a esta actividad persistente se basa en cambios lentos en las concentraciones intracelulares de ciertos iones en compartimientos específicos de la neurona, en específico en el penacho dendrítico (Zylbertal et al., 2015). Por otro lado, como se reportó en la sección de resultados, algunas de las neuronas que no generaban PAs una vez que el estímulo desaparecía (inyección de corriente despolarizante), exhibieron post-despolarizaciones. Notablemente, éste último atributo parece ser generado por mecanismos biofísicos distintos de aquél que propicia el disparo persistente (Shpak et al., 2015) y se ha reportado que ambos fenómenos son susceptibles de ser modulados por aferencias colinérgicas (Smith & Araneda, 2010; Shpak et al., 2015).

Proyecciones axonales del BOA hacia el BOp

La descripción de la proyección axonal que emiten algunas de las NPs del BOA hacia la región postero-dorsal del BOp (Figs. 12 y 15), podría representar un sustrato anatómico para explicar las interacciones funcionales y/o respuestas sobrelapadas ampliamente reportadas en los sistemas olfatorios accesorio y principal (Xu et al., 2005; ver Baum & Larriva, 2014). A favor de esta interpretación se encuentra el hecho de que, recientemente se reportó que la región dorsal del BOp es un área necesaria y fundamental para la emergencia de conductas sociales clásicamente atribuidas a la detección de feromonas, como la atracción a la orina de la hembra por parte del macho, vocalizaciones ultrasónicas durante el cortejo, quimio-investigación, agresión hacia otros machos y conductas

maternas (Matsuo et al., 2015). Ésta última referencia sería consistente con la existencia de una comunicación directa entre ambos bulbos y la proyección documentada en este estudio no sólo serviría como un buen sustrato anatómico para las funciones superpuestas de ambos sistemas, sino que sería un atributo necesario para la emergencia de las mismas.

Como se ha discutido en secciones previas, se hace muy relevante el hecho de que la mitad (3/6) de las neuronas que generaron respuestas antidrómicas ante la estimulación del BOp-dorsal manifestaron actividad de tipo “rítmica” (Figura 12d), por lo que también es probable que la actividad de dichas neuronas genere en las células con las que se comunica en el BOp, una actividad sincronizadora pre-sináptica y/o ventanas temporales de inhibición excitación -a través de neuronas Grs del BOp- para la generación de PAs temporalmente precisos (Schoppa, 2006).

Si existe una proyección recíproca entre ambos bulbos (neuronas del BOp que emitan axones hacia el BOA) es hasta este momento una cuestión no resuelta y abierta a posibles investigaciones futuras. Sin embargo, estudios hechos en nuestro laboratorio han arrojado resultados que sugieren que sí existe dicha interacción recíproca. A saber, la inducción de lesiones electrolíticas en la región dorsal del BOp cursó con degeneración -ortógrada- de botones sinápticos en el neuropilo de la CCE del BOA (Larriva-Sahd, 2008). Existe en la literatura científica un reporte de que hay conexiones recíprocas entre el BOp y el BOA en el reptil *Podarcis hispanica* (Martínez-García et al., 1991), si bien es un vertebrado, este organismo se encuentra alejado en la escala filogenética a los mamíferos y un estudio detallado es necesario para esclarecer si el reporte de dicha interacción es bidireccional o no en mamíferos.

Ambas mitades del BOA están recíprocamente conectadas

Las observaciones morfológicas preliminares hechas con la técnica de impregnación de Golgi, con respecto a la colateralización y distribución de los axones de las NPs del BOA con respecto a la *línea alba*, sugerían a la neurona principal del BOA como un sustrato por medio del cual ambas mitades del BOA podrían comunicarse y establecer nexos funcionales. Esta idea se convirtió en una de la hipótesis puestas a prueba durante este estudio. Los registros electrofisiológicos de *patch-clamp*, en la modalidad de célula completa, nos permitieron demostrar que en efecto, ambas mitades del BOA están conectadas. Así pues, la interpretación de los datos obtenidos durante este estudio nos permite afirmar que 1) una neurona ubicada en cualquiera de las dos mitades del BOA recibe aferencias (PEPS) evocadas por la

estimulación eléctrica extra-celular de la mitad opuesta en la que reside el cuerpo de la célula registrada y 2) una neurona ubicada en cualquiera de las dos mitades del BOA emite colaterales axónicas que atraviesan la *línea alba* y terminan en la mitad opuesta del BOA con respecto al sitio de registro (Fig. 15).

Es posible que las aferencias registradas sean generadas por los axones -de neuronas que fueron activadas por la estimulación- que cruzan la *línea alba* y establecen contactos funcionales con la célula registrada (Fig. 14). Alternativamente, la neurona registrada podría emitir una o varias dendritas accesorias (Larriva-Sahd, 2008; Yonekura & Yokoi, 2008) que cruzan la *línea alba* y podrían recibir los contactos sinápticos en la mitad opuesta a la que residen sus cuerpos (Fig. 13). El primer argumento discutido en este párrafo encuentra una demostración clara en las neuronas que responden a la estimulación eléctrica de la mitad opuesta con PAs antidrómicos y con la posterior inspección morfológica de las células registradas, en las que hemos podido corroborar que dichas respuestas se deben a que la célula envía colaterales a la mitad del BOA que recibió el estímulo eléctrico (Fig. 14b).

Por otro lado, es importante también mencionar que al llevar a cabo el estudio morfológico de las neuronas que respondieron ante la estimulación eléctrica de la mitad opuesta con PEPS (Fig. 13b), un par de ellas poseían características somato-dendríticas semejantes a las de neuronas típicas de axón corto; tales como un plexo axonal densamente ramificado en la vecindad del cuerpo de la neurona registrada, carencia de dendritas glomerulares y de axón ingresando al TOL (Fig. 13c). Por lo tanto, queda abierta la posibilidad de que interneuronas de cualquiera de las dos mitades del BOA sirvan como mediadoras y/o moduladoras de la comunicación establecida en el eje anterior-posterior del BOA. Las evidencias neurofisiológicas obtenidas durante este estudio, además de las descripciones morfológicas hechas previamente en nuestro laboratorio, constituyen un cuerpo de conocimiento importante acerca de las interacciones celulares que ocurren en el BOA y que son necesarias para el eventual entendimiento de cómo el circuito del BOA detecta y procesa la información procedente de estímulos feromonales.

Así como la implicación funcional de la proyección del BOA hacia el BOp requiere más estudios, la conexión recíproca entre ambas mitades del BOA reportada aquí deberá ser estudiada en el contexto del procesamiento de información del BOA. En un estudio reciente, en el que se obtuvieron imágenes

sensibles a la concentración de Ca^{++} de la neurona vomeronasal en sus botones sinápticos, los autores reportaron que las NPs del BOA responden de manera selectiva y por lo tanto, se encuentran “sintonizadas” al sexo, la cepa y la especie de muestras de orina (Meeks et al., 2010; Hammen et al., 2014). Basándose en dichos experimentos, los autores proponen que el BOA posee un arreglo modular en el que, neuronas vomeronasales con propiedades o campos receptivos similares exhiben patrones de inervación definidos a lo largo del eje antero-posterior del BOA, recordando la organización columnar que se ha reportado extensivamente en áreas corticales.

Esta forma de organización podría asemejarse a aquella descrita en *neocortezas*, en donde una determinada columna, o módulo de procesamiento de información, posee conexiones horizontales con módulos adyacentes; estos patrones de conectividad permiten la emergencia de interacciones funcionales que permiten generar contraste y/o ventanas temporales de actividad neuronal entre columnas.

En el BOA, en base a los resultados obtenidos en este estudio, las NPs que pertenecen a un determinado módulo de procesamiento de información feromonal, podrían establecer nexos funcionales como los arriba descritos a través de las interacciones demostradas entre ambas mitades del BOA. Por lo tanto, es posible que los axones que cursan en el eje antero-posterior del BOA, modulen la actividad de otros “canales” de procesamiento potenciado -al excitar otras NPs directamente- o inhibiendo -al excitar interneuronas- la actividad de módulos de procesamiento contiguos. De manera consistente con lo propuesto en este párrafo, un estudio en el que se registró la actividad eléctrica de neuronas en el BOA *in vivo* y durante la presentación de estímulos feromonales, deduce que procesos de inhibición lateral deben de ocurrir en el circuito, dado que neuronas que presentan respuestas excitatorias ante determinados estímulos, son susceptibles de ser inhibidas ante la presencia de otros estímulos (Luo et al., 2003).

Conclusiones

Los resultados obtenidos durante este proyecto nos permiten concluir que: 1) existe una proyección axonal (fibras colaterales) originada en el BOAa por NPs que tiene como blanco la zona dorsal-posterior del BOp; 2) Ambas mitades del BOA se encuentran recíprocamente conectadas, a través de sinapsis funcionales mediadas por el neurotransmisor glutamato; 3) NPs de ambas mitades del BOA envían fibra colaterales que atraviesan la *línea alba* y distribuyen fibras terminales en la mitad opuesta a la que reside el cuerpo de neurona en cuestión y 4) ambas mitades del BOA poseen una sub-población de NPs que poseen actividad rítmica, esto es, generan ráfagas de PAs intermediadas por periodos de “silencio” de manera intrínseca y dependiente de voltaje. Notablemente, algunas de estas neuronas proyectan hacia el BOp.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ackels, T., von der Weid, B., Rodriguez, I., & Spehr, M. (2014). Physiological characterization of formyl peptide receptor expressing cells in the mouse vomeronasal organ. *Front. Neuroanat.* 8: 134.
- Abraham, N.M., Egger, V., Shimshek, D.R., Renden, R., Fukunaga, I., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Klugmann, M., Margrie, T.W., Schaefer, A.T., & Kuner, T. (2010). Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron.* 65(3): 399-411.
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS ONE.* 8: e75745.
- Angelo, K., & Margrie, T.W. (2011). Population diversity and function of hyperpolarization-activated current in olfactory bulb mitral cells. *Sci Rep.* 1: 50.
- Angelo, K., Rancz, E.A., Pimentel, D., Hundahl, C., Hannibal, J., Fleischmann, A., Pichler, B., & Margrie, T.W. (2012). A biophysical signature of network affiliation and sensory processing in mitral cells. *Nature.* 488(7411): 375-8.
- Antal, M., Eyre, M., Finklea, B., & Nusser, Z. (2006). External tufted cells in the main olfactory bulb form two distinct subpopulations. *Eur J Neurosci* 24: 1124-1136.
- Arevian, A.C., Kapoor, V., & Urban, N.N. (2008). Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 11(1): 80-87.
- Arnson, H.A., & Holy, T.E. (2011). Chemosensory burst coding by mouse vomeronasal sensory neurons. *J Neurophysiol.* 106(1): 409-20.
- Arnson, H.A., & Holy, T.E. (2013). Robust encoding of stimulus identity and concentration in the accessory olfactory system. *J Neurosci.* 33(33): 13388-97.
- Aungst, J.L., Heyward, P.M., Puche, A.C., Karnup, S.V., Hayar, A., Szabo, G., & Shipley, M.T. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature.* 426(6967): 623-629.
- Balu, R., Pressler, R.T., & Strowbridge, B.W. (2007). Multiple modes of synaptic excitation of olfactory bulb granule cells. *J Neurosci.* 27(21): 5621-5632.
- Banerjee, A., Marbach, F., Anselmi, F., Koh, M.S., Davis, M.B., Garcia da Silva, P., Delevich, K., Oyibo, H.K., Gupta, P., Li, B., & Albeanu, D.F. (2015). An interglomerular circuit gates glomerular output and implements gain control in the mouse olfactory bulb. *Neuron.* 87(1): 193-207.
- Bathellier, B., Buhl, D.L., Accolla, R., & Carleton, A. (2008). Dynamic ensemble odor coding in the mammalian olfactory bulb: sensory information at different timescales. *Neuron.* 57(4): 586-98.
- Baum, M., & Larriva-Sahd, J. (2014). Interactions between the mammalian main and accessory olfactory systems. *Front. Neuroanat.* 8: 45.
- Belluscio, L., Koentges, G., Axel, R., & Dulac, C. (1999). A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97: 209-220.
- Belluscio, L., Lodovichi, C., Feinstein, P., Mombaerts, P., & Katz, L.C. (2002). Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb. *Nature.* 419(6904): 296-300.

- Ben-Arie, N., Lancet, D., Taylor, C., Khen, M., Walker, N., Ledbetter, D.H., Carrozzo, R., Patel, K., Sheer, D., Lehrach, H., & North, M.A. (1994). Olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: possible duplication of an ancestral receptor repertoire. *Hum Mol Genet.* 3: 229-235.
- Ben-Shaul, Y., Katz, L.C., Mooney, R., & Dulac, C. (2010). In vivo vomeronasal stimulation reveals sensory encoding of conspecific and allospecific cues by the mouse accessory olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5172– 5177.
- Berghard, A. & Buck, L.B. (1996). Sensory transduction in vomeronasal neurons: Evidence for G-alpha-o, G-alpha-i2 and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J. Neurosci.* 16: 909–918.
- Blaustein, A.R. (1981). Sexual selection and mammalian olfaction. *Am. Nat.* 117: 1006–1010.
- Boehm, U., Zou, Z., & Buck, L. (2005). Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell* 23: 683–695.
- Boillat, M., Challet, L., Rossier, D., Kan, C., Carleton, A., & Rodriguez, I. (2015). The vomeronasal system mediates sick conspecific avoidance. *Curr Biol.* 25: 251-255.
- Boschhat, C., Pélofi, C., Randin, O., Roppolo, D., Lüscher, C., Broillet, M.C., & Rodriguez, I. (2002). Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nat. Neurosci.* 5: 1261–1262.
- Boyd, A.M., Sturgill, J.F., Poo, C., & Isaacson, J.S. (2012). Cortical feedback control of olfactory bulb circuits. *Neuron* 76(6): 1161-74.
- Bruce H.M. (1959). An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature.* 184: 105.
- Buck, L.B. & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell.* 65: 175-187.
- Buck, L. (1996). Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev. Neurosci* 19: 517-544.
- Burton, S.D., & Urban, N.N. (2014). Greater excitability and firing irregularity of tufted cells underlies distinct afferent- evoked activity of olfactory bulb mitral and tufted cells. *J Physiol.* 10: 2097-2118.
- Burton, S.D., & Urban, N.N. (2015). Rapid feedforward inhibition and asynchronous excitation regulate granule cell activity in the mammalian main olfactory bulb. *J Neurosci.* 35(42): 14103–14122.
- Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F. & Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450: 899–903.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., & Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell.* 78(5): 823-34.
- Cockerham, R.E., Margolis, F.L., & Munger, S.D. (2009a). Afferent activity of necklace glomeruli is dependent on external stimuli. *BMC Res Notes.* 2: 2-31.
- Cockerham, R.E., Puche, A.C., & Munger, S. (2009b). Heterogeneous sensory innervation and extensive intrabulbar connections of olfactory necklace glomeruli. *Plos One.* 4(2): e4657.
- Crouzet, S.M. & Serre, T. (2011). What are the visual features underlying rapid object recognition? *Front. Psychol.*

2: 326.

- Cury, K.M., & Uchida, N. (2010). Robust odor coding via inhalation-coupled transient activity in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*. 68(3): 570-85.
- Davis, B.J., Macrides, F., Youngs, W.M., Schneider, S.P. & Rosene, D.L. (1978). Efferent and centrifugal afferents to the main and accessory olfactory bulb in hamster. *Brain Res. Bull.* 3: 59-72.
- Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodríguez, I., Jukam, D., Wysocki, C., Ogawa, S., Zufall, F., & Mombaerts, P. (2002a). Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419: 70–74.
- Del Punta, K., Puche, A., Adams, N.C., Rodriguez, I., & Mombaerts, P. (2002b). A Divergent Pattern of Sensory Axonal Projections Is Rendered Convergent by Second-Order Neurons in the Accessory Olfactory Bulb. *Neuron*. 35(6): 1057-66.
- de Olmos, J., Hardy, H. & Heimer, L. (1978). The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol*. 181: 213-244.
- De Saint Jan, D., Hirnet, D., Westbrook, G.L., & Charpak, S. (2009). External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli. *J Neurosci* 29: 2043–2052.
- Dewan, A., Pacifico, R., Zhan, R., Rinberg, D., & Bozza, T. (2013). Non-redundant coding of aversive odours in the main olfactory pathway. *Nature*. 497(7450): 486–489.
- Dicke, M. & Takken, W. (2006). *Chemical Ecology: From gene to ecosystem*. Springer.
- Dietschi, Q., Assens, A., Challet, L., Carleton, A., & Rodriguez, I. (2013). Convergence of FPR-rs3-expressing neurons in the mouse accessory olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*. 56: 140-147.
- Døving, K. & Trotier, D. (1998). Structure and Function of the Vomeronasal Organ. *The Journal of Experimental Biology* 201: 2913–2925.
- Doyle, M. W., & Andresen, M. (2001). Reliability of monosynaptic sensory transmission in brain stem neurons in vitro. *J. Neurophysiol*. 85: 2213–2223.
- Doyle, W.I., Dinsler, J.A., Cansler, H.L., Zhang, X., Dinh, D.D., Browder, N.S., Riddington, I.M., & Meeks, J.P. (2016). Faecal bile acids are natural ligands of the mouse accessory olfactory system. *Nat. Commun.* 7: 11936.
- Dulac, C., & Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83: 195–206.
- Eccles, R. (1982). Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. *Physiol Behav*. 28: 1011-1015.
- Elhilali, M., & Shamma, S.A. (2008). A cocktail party with a cortical twist: how cortical mechanisms contribute to sound segregation. *J. Acoust. Soc. Am.* 124: 3751–3771.
- Eyre, M.D., Antal, M., & Nusser, Z. (2008). Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intrabulbar and extrabulbar GABAergic connections. *J Neurosci*. 28(33): 8217–8229.
- Ferrero, D.M., Lemon, J.K., Fluegge, D., Pashkovski, S.L., Korzan, W.J., Datta, S.R., Spehr, M., Fendt, M., &

- Liberles, S.D. (2011). Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(27): 11235–11240.
- Fleischer, J., Schwarzenbacher, K., & Breer, H. (2007). Expression of trace amine-associated receptors in the Grueneberg ganglion. *Chem Senses*. 32(6): 623-31.
 - Forsythe, I., & Westbrook, G. (1988). Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central neurones. *J. Physiol*. 396: 515–533.
 - Fu, X., Yan, Y., Xu, P.S., Geerlof-Vidavsky I., Chong, W., Gross, M.L., & Holy, T.E. (2015). A molecular code for identity in the vomeronasal organ. *Cell*. 163(2): 313-323.
 - Fukunaga, I., Berning, M., Kollo, M., Schmaltz, A., & Schaefer, A.T. (2012). Two distinct channels of olfactory bulb output. *Neuron*. 75: 320–329.
 - Fukunaga, I., Herb, J.T., Kollo, M., Boyden, E.S., & Schaefer, A.T. (2014). Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 17: 1208–1216.
 - Fulle, H.J., Vassar, R., Foster, D.C., Yang, R.B., Axel, R., & Garbers, D.L. (1995). A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3571–3575.
 - Fuss, S.H., Omura, M., & Mombaerts, P. (2005). The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. 22(10): 2649-54.
 - Galán, R. F., Fourcaud-Trocmé, N., Ermentrout, G.B., & Urban, N.N. (2006). Correlation-induced synchronization of oscillations in olfactory bulb neurons. *J Neurosci* 26: 3646–3655.
 - Garrosa, M. & Coca, S. (1991). Postnatal development of the vomeronasal epithelium in the rat: an ultrastructural study. *J Morphol*. 208: 57–269.
 - Geramita, M.A., Burton, S.D., & Urban, N.N. (2016). Distinct lateral inhibitory circuits drive parallel processing of sensory information in the mammalian olfactory bulb. *Elife*. 5. pii: e16039.
 - Giacobini, P., Benedetto, A., Trindelli, R. & Fasolo, A. (2000). Proliferation and migration of receptor neurons in the vomeronasal organ of the adult mouse. *Developmental Brain Research*. 123(1): 23-40.
 - Gire, D.H., Franks, K.F., Zak, J.D., Tanaka, K.F., Whitesell, J.D., Mulligan, A.A., Hen, R. & Schoppa, N. (2012). Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signalling path. *J. Neurosci*. 32(9): 2964-2975.
 - Gire, D.H., & Schoppa, N.E. (2009). Control of on/off glomerular signaling by a local GABAergic microcircuit in the olfactory bulb. *J Neurosci* 29: 13454–13464.
 - Giridhar, S., Doiron, B., & Urban, N.N. (2011). Time scale-dependent shaping of correlation by olfactory bulb lateral inhibition. *Proc Natl Acad Sci*. 108(14): 5843-5848.
 - Golgi, C. (1875). Sulla fina struttura dei bulbi olfattori. *Riv Sper Feniatr*. 1: 405-425.
 - Gorin, M. (2014). Intrinsic Oscillatory Discharge Patterns in Mitral Cells of the Mouse Accessory Olfactory Bulb. Ph.D. thesis, RWTH Aachen University, Aachen.

- Gorin, M., & Spehr, M. (2014). "Intrinsic oscillatory discharge patterns in mitral cells of the mouse accessory olfactory bulb," en resumen obtenido de AchemS XXXVI Meeting (Resumen no. p13).
- Graziadei, P.P.C., & Metcalf, J.F. (1971). Autoradiographic studies of frog's olfactory mucosa. *Zeitschrift für Zellforschung*, 116: 305-318.
- Graziadei, P.P.C., & Monti-Graziadei, G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol*. 8: 1-18.
- Greer, P.L., Bear, D.M., Lassance, J.M., Bloom, M.L., Tsukahara, T., Pashkovski, S.L., Masuda, F.K., Nowlan, A.C., Kirchner, R., Hoekstra, H.E., & Datta, S.R. (2016). A family of non-GPCR chemosensors defines an alternative logic for mammalian olfaction. *165(7): 1734-48*.
- Gschwend, O., Abraham, N.M., Lagier, S., Begnaud, S., Rodriguez, I., & Carleton, A. (2015). Neuronal pattern separation in the olfactory bulb improves odor discrimination learning. *Nat Neurosci*. 18(10): 1474-82.
- Haberly, L. (2001). Parallel-distributed Processing in Olfactory Cortex: New Insights from Morphological and Physiological Analysis of Neuronal Circuitry. *Chem Senses*. 26: 551-576.
- Haberly, L., & Price, J.L. (1977). The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res*. 129(1): 152-157.
- Halpern, M. & Martínez-Marcos, A. (2003). Structure and Function of the Vomeronasal System: an update. *Progress in Neurobiology* 70: 245–318.
- Halpern, M., Shapiro, L.S. & Jia, C. (1995). Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res*. 677: 157–161.
- Hammen, G. F., Turaga, D., Holy, T. E., & Meeks, J. (2014). Functional organization of glomerular maps in the mouse accessory olfactory bulb. *Nat. Neurosci*. 17: 953–961.
- Hayar, A., Karnup, S., Ennis, M., & Shipley, M. T. (2004b). External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J. Neurosci*. 24: 6676–6685.
- Hayar, A., Karnup, S., Shipley, M. T., & Ennis, M. (2004a). Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *J. Neurosci*. 24: 1190–1199.
- He, J., Ma, L., Kim, S., Nakai, J., & Yu, C.R. (2008). Encoding gender and individual information in the mouse vomeronasal organ. *Science* 320: 535–538.
- Hendrickson, R.C., Krauthamer, S., Essenberg, J.M., & Holy, T.E. (2008). Inhibition shapes sex selectivity in the mouse accessory olfactory bulb. *J Neurosci* 28: 12523–12534.
- Herrada, G., & Dulac, C. (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90: 763–773.
- Hirata, Y. (1964). Some observations on the fine structure of synapses in the olfactory bulb of the mouse, with particular reference to the atypical synaptic configurations. *Arch Histol Jpn*. 24: 303-317.
- Hökfelt, T., Halasz, N., Ljungdahl, A., Johansson, O., Goldstein, M., & Park, D. (1975). Histochemical support for

a dopaminergic mechanism in the dendrites of certain periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 1: 85–90.

- Holy, T.E., Dulac, C., & Meister, M. (2000). Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science*. 289(5484): 1569-72.
- Howard, W.E., Marsh, R.E., & Cole, R.E. (1968). Food detection by deer mice using olfactory rather than visual cues. *Anim. Behav.* 16: 13–17.
- Hsia, A.Y., Vincent, J.D., & Lledo, P.M. (1999). Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 82(2): 1082-5.
- Hu, J., Zhong, C., Ding, C., Chi, Q., Walz, A., Mombaerts, P., Matsunami, H., & Luo, M. (2007). Detection of near-atmospheric concentrations of CO₂ by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* 317: 953–957.
- Igarashi, K.M., Ieki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tanifuji, M., Sakano, H., Chen, W.R., & Mori, K. (2012). Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *J Neurosci.* 32(23): 7970-7985.
- Imamura, K., Mori, K., Fujita, S. C., & Obata, K. (1985). Immunohistochemical identification of subgroups of vomeronasal nerve fibers and their segregated terminations in the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* 328: 362–366.
- Isaacson, J.S., & Strowbridge, B.W. (1998). Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron.* 20(4): 749-761.
- Ishii, T., & Mombaerts, P. (2008). Expression of nonclassical class I major histocompatibility genes defines a tripartite organization in the mouse vomeronasal system. *J Neurosci.* 28(10): 2332-2341.
- Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., & Sakano, H. (2001). Monoallelic expression of odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes Cells.* 6(1): 71-78.
- Johnson, M.A., Tsai, L., Roy, D.S., Valenzuela, D.H., Mosley, C., Magklara, A., Lomvardas, S., Liberles, S.D., & Barnea, G. (2012). Neurons expressing trace-amine associated receptors project to discrete glomeruli and constitute an olfactory subsystem. *Proc Natl Acad Sci.* 109(33): 13410-5.
- Juilfs, D.M., Fulle, H.J., Zhao, A.Z., Houslay, M.D., Garbers, D.L., & Beavo J.A. (1997). A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 94(7): 3388-3395.
- Kahan, A., & Ben-Shaul, Y. (2016). Extracting behaviorally relevant traits from natural stimuli: benefits of combinatorial representations at the accessory olfactory bulb. *PLoS Comput Biol* 12(3): e1004798.
- Kang, N., Baum, M.J., & Cherry, J.A. (2009). A direct main olfactory bulb projection to the ‘vomeronasal’ amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur J Neurosci.* 29(3): 624-34.
- Kang, N., McCarthy, E.A., Cherry, J.A., & Baum, M.J. (2011). A sex comparison of the anatomy and function of the main olfactory bulb-medial amygdala projection in mice. *Neuroscience* 172: 196–204.
- Kapoor, V., & Urban, N.N. (2006). Glomerulus-specific, long-latency activity in the olfactory bulb granule cell network. *J Neurosci.* 26(45): 11709-19.

- Karlson, P. & Lüscher, M. (1959). 'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature*. 183 (4653): 55-6.
- Kaur, A. W., Ackels, T., Kuo, T.H., Cichy, A., Dey, S., Hays, C., Kateri, M., Logan, D.W., Marton, T.F., Spehr, M., & Stowers, L. (2014). Murine pheromone proteins constitute a context-dependent combinatorial code governing multiple social behaviors. *Cell*. 157(3): 676–688.
- Kikuta, S., Fletcher, L.M., Homma, R., Yamasoba, T., & Nagayama, S. (2013). Odorant response properties of individual neurons in an olfactory glomerular module. *Neuron*. 20;77(6): 1122-35.
- Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., & Touhara, K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437: 898–901.
- Kiyokage, E., Pan, Y.Z., Shao, Z., Kobayashi, K., Szabo, G., Yanagawa, Y., Obata, K., Okano, H., Toida, K., Puche, A., & Shipley, M.T. (2010). Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci*. 30: 1185–1196.
- Kosaka, K., & Kosaka, T. (2007). Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res*. 1167: 42–55.
- Kosaka, T., & Kosaka, K. (2009). Two types of tyrosine hydroxylase positive GABAergic juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb are different in their time of origin. *Neurosci Res*. 64: 436–441.
- Kosaka, T., & Kosaka, K. (2015). Neuronal organization of the main olfactory bulb revisited. *Anat Sci Int*. 91(2): 115-127.
- Kosaka, K., Toida, K., Margolis, F.L., & Kosaka, T., (1997). Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76: 775–786.
- 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 . *J Comp Neurol*. 510: 309-350.
- Larriva-Sahd, (2012). Cytological Organization of the Alpha Component of the Anterior Olfactory Nucleus and Olfactory Limbus. *Frontiers in Neuroanatomy*. 6(23): 1-22.
- Laska, M., Seibt, A. & Weber, A. (2000). 'Microsmatic' Primates Revisited: Olfactory Sensitivity in the Squirrel Monkey . *Chem. Senses* 25: 47–5.
- Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., Prashanth-Chandramani, S., Maul-Pavicic, A., Jäger, M., Li, X.H., Breer, H., Zufall, F., & Boehm, T. (2004). MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306: 1033–1037.
- Leinders-Zufall, T., Cockerham, R.E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D.L., Reed, R.R., Zufall, F., & Munger, S. (2007). Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14507–14512.
- Leinders-Zufall, T., Lane, A. P., Puche, A. C., Ma, W., Novotny, N. W., Shipley, T. M., & Zufall, F. (2000). Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405: 792–796.
- Lemus-Aguilar, I., Bargas, J., Tecuapetla, F., Galárraga, E., & Carrillo-Reid, L. (2006). Diseño modular de

instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas. *Rev. Mex. Ing. Biomed.* 27: 82–92.

- Levai, O., Feistel, T., Breer, H., & Strotmann, J. (2006). Cells in the vomeronasal organ express odorant receptors but project to the accessory olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 498: 476–490.
- Levine, C. & Marcillo, A. (2008). Regarding Several Points of Doubt of the Structure of the Olfactory Bulb: As Described by T. Blanes. *The Anatomical Record.* 291: 751–762.
- Lewcock, J.W., & Reed, R.R. (2004). A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(4): 1069-1074.
- Leybold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., & Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(9): 6376-81.
- Liberles, S.D., & Buck, L.B. (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature.* 442(7103): 645-50.
- Liberles, S.D., Horowitz, L.F., Kuang, D., Contos, J.J., Wilson, K.L., Siltberg-Liberles, J., Liberles, D.A., & Buck, L. (2009). Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(24): 9842-7.
- Liman, E. R., & Corey, D.P. (1996). Electrophysiological characterization of chemosensory neurons from the mouse vomeronasal organ. *J. Neurosci.* 16: 4625–4637.
- Lin, D.Y., Shea, S.D., & Katz, L. (2006). Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron.* 50: 937-949.
- Lin, W., Arellano, J., Slotnick, B., y Restrepo, D. (2004). Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 stimulate the main olfactory system. *J. Neurosci.* 24: 3703–3710.
- Lin, W., Margolskee, R., Donnert, G., Hell, S.W., & Restrepo, D. (2007). Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 7: 2471–2476.
- Liu, S., Plachez, C., Shao, Z., Puche, A., & Shipley, M.T. (2013). Olfactory bulb short axon cell release of GABA and dopamine produces a temporally biphasic inhibition-excitation response in external tufted cells. *J Neurosci.* 33(7): 2916–2926.
- Liu, S., & Shipley, T.M. (2008). Multiple conductances cooperatively regulate spontaneous bursting in mouse olfactory bulb external tufted cells. *J. Neurosci.* 28: 1625–1639.
- Liu, W.L., y Shipley, M.T. (1994). Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystinin- containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol.* 346: 541–558.
- Lledo, P.M., Gheusi, G., & Vincent, J.D. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev.* 85(1): 281-317.
- Lodovichi, C., Belluscio, L., & Katz, L.C. (2003). Functional topography of connections linking mirror-symmetric maps in the mouse olfactory bulb. *Neuron.* 38(2): 265–76.

- Luo, M., Fee, M. S., & Katz, L. (2003). Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* 299: 1196–1201.
- Maccaferri, G., & Dingledine, R. (2002). Control of feedforward dendritic inhibition by NMDA receptor-dependent spike timing in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 22(13): 5462-5472.
- Macrides, F., & Schneider, S.P. (1982). Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol.* 208: 419-430.
- Maher, B.J., & Westbrook, G.L. (2008). Co-transmission of dopamine and GABA in periglomerular cells. *J Neurophysiol.* 99: 1559–1564.
- Mann, G. (1961). Bulbus olfactorius accessorius in chiroptera. *J Comp Neurol.* 116: 135-141.
- Martínez-García, F., Olucha, F. E., Teruel, V., Llorente, M. J., & Schwerdtfeger, W. K. (1991). Afferent and efferent connections of the olfactory bulbs in the lizard *Podarcis hispanica*. *J. Comp. Neurol.* 305: 337–346.
- Matsunami, H., & Buck, L. (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90: 775–784.
- Matsuo, T., Hattori, T., Asaba, A., Inoue, N., Kanomata, N., Kikusui, T., Kobayakawa, R. & Kobayakawa, K. (2015). Genetic dissection of pheromone processing reveals main olfactory system-mediated social behaviors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: E311–E320.
- McDermott, J.H. (2009). The cocktail party problem. *Curr Biol.* 19: R1024-R1027.
- McQuiston, A.R., & Katz, L.C. (2001). Electrophysiology of interneurons in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 86: 1899–1907.
- Meeks, J.P., Arnson, H.A., & Holy, T.E. (2010). Representation and transformation of sensory information in the mouse accessory olfactory system. *Nat Neurosci.* 13(6): 723-30.
- Meredith, M. & O'Connell, R. (1979). Efferent Control of Stimulus Access to the Hamster Vomeronasal Organ. *J. Physiol.* 286: 301-316.
- Meredith, M., Marques, D., O'Connell, R. & Lee-Stern, F. (1980). Vomeronasal Pump: Significance for Male Sexual Hamster Behavior. *Science.* 207: 1224-1226.
- Meredith, M. (1994). Chronic Recording of Vomeronasal Pump Activation in Awake Behaving Hamsters. *Physiol Behav.* 56(2): 345-354.
- Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., Úbeda-Bañón, I., Crespo, C., Insausti, R., & Martinez-Marcos, A. (2007). Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 25: 2065–2080.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., & Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell.* 87(4): 675-86.
- Mori, K., Inamura, K., Fujita, S.C. & Obata, K. (1987). Projections of two subclasses of vomeronasal nerve fibers to the accessory olfactory bulb in the rabbit. *Neurosci.* 20: 259–278.

- Moulton, D.G., Celebi, G., & Fink, R.P. (1970). Olfaction in mammals: proliferation of cells in the olfactory epithelium and sensitivity to odours. En Taste and smell in vertebrates. CIBA Foundation symposium. (Editado por Wolstenholme, G.E.W. y Knight, J.).
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., McDougall, L.M., Cockerham, R.E., Schmid, A., Wandernoth, P., Wennemuth, G., Biel, M., Zufall, K., & Kelliher, K.R. (2010). An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates food-related social learning. *Curr Biol.* 20(16): 1438-44.
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits.* 8: 98.
- Najac, M., Sanz Diez, A., Kumar, A., Benito, N., Charpak, S., & De Saint Jan, D. (2015). Intraglomerular lateral inhibition promotes spike timing variability in principal neurons of the olfactory bulb. *J Neurosci.* 35(10): 4319–4331.
- Nakahara, T.S., Cardozo, L.M., Ibarra-Soria, X., Bard, A.D., Carvalho, V.M., Trintinalia, G.Z., Logan, D.W., & Papes, F. (2016). Detection of pup odors by non-canonical adult vomeronasal neurons expressing an odorant receptor gene is influenced by sex and parenting status. *BMC Biol.* 14: 12.
- Nodari, F., Hsu, F. F., Fu, X., Holekamp, T. F., Kao, L. F., Turk, J., & Holy T.E. (2008). Sulfated steroids as natural ligands of mouse pheromone-sensing neurons. *J. Neurosci.* 28: 6407–6418.
- Nunes, D., & Kuner, T. (2015). Dishinhibition of olfactory bulb granule cells accelerates odor discrimination in mice. *Nat Commun.* 6: 8950.
- Nunez-Parra, A., Maurer, R.K., Krahe, K., Smith, R.S., & Araneda, R.C. (2013). Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(36): 14777-82.
- Ojima, H., Mori, K. & Kishi, K. (1984). The trajectory of mitral cell axons in the rabbit olfactory cortex revealed by intracellular HRP injection. *J Comp Neurol.* 230: 77-87.
- Pacifico, R., Dewan, A., Cawley, D., Guo, C., & Bozza, T. (2012). An olfactory subsystem that mediates high sensitivity detection of volatile amines. *Cell Rep.* 2(1): 76-88.
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M. T., Erdelyi, F., Szabo, G., & Puche, A. C. (2007). Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 501: 825–836.
- Peña, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Márquez-Ramos, A., & Carmona-Aparicio, L. (2010). Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of FYN-kinase. *Hippocampus* 20: 78–96.
- Peña, F., Bargas, J., & Tapia, R. (2002). Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine *in vivo*. *Neuropharmacology* 42: 807–812.
- Peña, F., Parkis, M. A., Tryba, A. K., & Ramírez, J. M. (2004). Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43: 105–117.
- Pignatelli, A., Kobayashi, K., Okano, H., & Belluzzi, O. (2005). Functional properties of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *J Physiol* 564: 501–514.
- Pinching, A.J., & Powell, T.P. (1971). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 9:

305-345.

- Pressler, R.T., Rozman, P.A., & Strowbridge, W. (2013). Voltage-dependent intrinsic bursting in olfactory bulb Golgi cells. *Learn. Mem.* 20: 459–466.
- Pressler, R.T., & Strowbridge, B.W. (2006). Blanes cells mediate persistent feedforward inhibition onto granule cells in the olfactory bulb. *Neuron*. 49(6): 889-904.
- Raisman, G. (1971). An experimental study of the projection of the amygdala to the accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system. *Exp Brain Res.* 14: 395-408.
- Ramírez, J. M., Tryba, A. K., & Peña, F. (2004). Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14: 665–674.
- Ramón y Cajal, S. (1890). Origen y terminación de las fibras nerviosas olfatorias. Barcelona: Gaceta Sanitaria Barcelona. p. 183-189, 174-181, 206-312.
- Reece, W. (2009). *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. John Wiley & Sons.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., & Buck, L.B. (1993). A zonal organization of odorant gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*. 73(3): 597-609.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., & Buck, L.B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79: 1245–55.
- Riviere, S., Challet, L., Fluegge, D., Spehr, M., & Rodríguez, I. (2009). Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature*. 459(7246): 574-7.
- Rubin, B.D., & Katz, L. (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*. 23: 499-511.
- Rokni, D., Hemmelder, V., Kapoor, V., & Murthy, V.N. (2014). An olfactory cocktail party: figure-ground segregation of odorants in rodents. *Nat Neurosci.* 17(9): 1225-1232.
- Romo, R., Brody, C.D., Hernandez, A., & Lemus, L. (1999). Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature*. 399: 470 – 473.
- Ryba, N., & Tirindelli, R. (1997). A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19: 371–379.
- Salazar, I., Sánchez-Quintero, P., Aleman, N. & Prieto, D. (2008). Anatomical, immunohistochemical and physiological characteristics of the vomeronasal vessels in cows and their possible role in vomeronasal reception. *J. Anat.* 212: 686–696.
- Scalia, F. & Winans, S.S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and the accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* 161: 31-56.
- Schoenfeld, T.A, Marchand, J.E., & Macrides F. (1985). Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. *J Comp Neurol.* 235: 503-518.
- Schoppa, N.E. (2006). Synchronization of olfactory bulb mitral cells by precisely timed inhibitory inputs. *Neuron*. 49(2): 271- 83.

- Schwarting, G.A. & Crandall, J.E. (1991). Subsets of olfactory and vomeronasal sensory epithelial cells and axons revealed by monoclonal antibodies to carbohydrate antigens. *Brain Res.* 547: 239–248.
- Schwarting, G.A., Drinkwater, D. & Crandall, J.E. (1994). A unique neuronal glycolipid defines rostrocaudal compartmentalization in the accessory olfactory system of rats. *Devl. Brain Res.* 78: 191–200.
- Schwob, J.E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec.* 269(1): 33-49.
- Scott, J.W. (1981). Electrophysiological identification of mitral and tufted cells and distribution of their axons in the olfactory system of the rat. *J Neurophysiol.* 46(5): 918-931.
- Shao, Z., Puche, A.C., Kiyokage, E., Szabo, G., & Shipley, M.T. (2009). Two GABAergic intraglomerular circuits differentially regulate tonic and phasic presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol* 101: 1988–2001.
- Shepherd, G. (1972). Synaptic Organization of the Mammalian Olfactory Bulb. *Physiological reviews.* 52 (4): 864-917.
- Shepherd, G. M., Chen, W. R., & Greer, C. A. (2004). “Olfactory bulb,” en *The Synaptic Organization of the Brain*, 5^a Ed, ed. G. M. Shepherd (New York, NY: Oxford University Press).
- Shimazaki, R., Boccaccio, A., Mazzatenta, A., Pinato, G., Migliore, M., & Menini, A. (2006). Electrophysiological properties and modeling of murine vomeronasal sensory neurons in acute slice preparations. *Chem. Senses* 31: 425–435.
- Shinoda, K., Shiotani, Y., & Osawa, Y. (1989). Necklace olfactory glomeruli form unique components of the rat primary olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 284: 362-373.
- Shirley, C.H., Coddington, E.J., & Heyward, P.H. (2010). All-or-none population bursts temporally constrain surround inhibition between mouse olfactory glomeruli. *Brain Res.* 81(4-5): 406-15.
- Shpak, G., Zylbertal, A., & Wagner, S. (2015). Transient and sustained afterdepolarizations in accessory olfactory bulb mitral cells are mediated by distinct mechanisms that are differentially regulated by neuromodulators. *Front. Cell. Neurosci.* 8: 432.
- Shpak, G., Zylbertal, A., Yarom, Y., & Wagner, S. (2012). Calcium-activated sustained firing responses distinguish accessory from main olfactory bulb mitral cells. *J. Neurosci.* 32: 6251–6262.
- Smith, R., & Araneda, R. (2010). Cholinergic modulation of neuronal excitability in the accessory olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 104: 2963–2974.
- Sosulski, D.L., Bloom, M.L., Cutforth, T., Axel, R., & Datta, S.R. (2011). Distinct representations of olfactory information in different cortical centers. *Nature.* 472(7342): 213-6.
- Spehr, M., Kelliher, K., Li, X. H., Boehm, T., Leinders-Zufall, T., & Zufall, F. (2006). Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *J. Neurosci.* 26: 1961–1970.
- Spors, H., & Grinvald, A. (2002). Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron.* 34: 301-315.

- Storan, M.J., & Key, B. (2006). Septal organ of Grüneberg is part of the olfactory system. *J Comp Neurol.* 494(5): 834-44.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., & Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* 295(5559): 1493-500.
- Strotmann, J., Wanner, I., Krieger, J., Raming, K., & Breer, H. (1992). Expression of odorant receptors in spatially restricted subsets of chemosensory neurones. *Neuroreport.* 3(12): 1053-1056.
- Takami, S., & Graziadei, P. (1991). Light microscopic Golgi study of mitral/tufted cells in the accessory olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 311: 65–83.
- Tatti, R., Bhaukaurally, K., Gschwend, O., Seal, R. P., Edwards, R. H., Rodriguez, I., & Carleton, A. (2014). A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat Commun,* 5: 3791.
- Teicher, M.H., Stewart, W.B., Kauer, J.S., & Shepherd, G.M. (1980). Suckling pheromone stimulation of a modified glomerular region in the developing rat olfactory bulb revealed by the 2-deoxyglucose method. *Brain Res.* 194(2): 530-5.
- Thompson, J.A., Salcedo, E., Restrepo, D., & Finger, T.A., (2012). Second-order input to the medial amygdala from olfactory sensory neurons expressing the transduction channel TRPM5. *J Comp Neurol.* 520(8): 1819-30.
- Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S. & Menini, A. (2009). From Pheromones to Behavior. *Physiol Rev* 89: 921–956.
- Trinh, K & Storm, D. (2003). Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat Neurosci.* 6 (5): 519-525.
- Trombley, P. Q., & Westbrook, G. (1990). Excitatory synaptic transmission in cultures of rat olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 64: 598–606.
- Tolokh, I.I., Fu, X., & Holy, T.E. (2013). Reliable sex and strain discrimination in the mouse vomeronasal organ and accessory olfactory bulb. *J Neurosci.* 33(34): 13903–13913.
- Uchida, N., Takahashi, Y.K., Tanifuji, M., & Mori, K. (2000). Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci.* 3(10): 1035-1043.
- Valverde F. (1965). *Studies on the Piriform Lobe.* Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, p. 1-50.
- Vandenbergh, J.G., Whitsett, J.M., & Lombardi, J.R. (1975). Partial isolation of a pheromone accelerating puberty in female mice. *J Reprod Fertil.* 43(3): 515-23.
- Vassar, R., Ngai, J., & Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell.* 74(2): 309-318.
- Vassar, R., Chao, S.K., Sitcheran, R., Nuñez, J.M., Vosshall, L.B., & Axel, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell.* 79(6): 981-991.
- Von Campenhausen, H., & Mori, K. (2000). Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur J Neurosci.* 12(1): 33-46.

- Von Campenhausen, H., Yoshihara, Y. & Mori, K. (1997). OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *NeuroReport* 8: 2607–2612.
- Wachowiak, M., & Cohen, M.B. (2001). Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron*. 32: 723-735.
- Wagner, S., Gresser, A. L., Torello, A. T., & Dulac, C. (2006). A multireceptor genetic approach uncovers an ordered integration of VNO sensory inputs in the accessory olfactory bulb. *Neuron* 50: 697–709.
- Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., & Axel, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*. 93(1): 47-60.
- Whitesell, J.D., Sorensen, K.A., Jarvie, B.C., Hentges, S.T., & Schoppa, N.E. (2013). Interglomerular lateral inhibition targeted on external tufted cells in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 33(4): 1552–1563.
- Wienisch, M., & Murthy, V.N. (2016). Population imaging at subcellular resolution supports specific and local inhibition by granule cells in the olfactory bulb. *Sci Rep*. 6: 29308.
- Willhite, D.C., Nguyen, K.T., Masurkar, A.V., Greer, C.A., Shepherd, G.M., & Chen, W.R. (2006). Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(33): 12592–12597.
- Wu, Z., Autry, A.E., Bergan, J.F., Watabe-Uchida, M., & Dulac, C.G. (2014). Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature*. 509(7500): 325-30.
- Wolfson, S.S., & Landy, M.S. (1998). Examining edge- and region-based texture analysis mechanisms. *Vision Res*. 38: 439–446.
- Xu, F., Schafer, M., Kida, I., Schafer, J., Liu, N., Rothman, D.L., Hyder, F., Restrepo, D. & Shepherd G.M. (2005). Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors and pheromones. *J Comp Neurol* 489: 491–500.
- Yan, Z., Tan, J., Qin, C., Lu, Y., Ding, C., & Luo, M. (2008). Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron* 58: 613–624.
- Yokoi, M., Mori, K., & Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 3371-3375.
- Yonekura, J., & Yokoi, M. (2008). Conditional genetic labeling of mitral cells of the mouse accessory olfactory bulb to visualize the organization of their apical dendritic tufts. *Mol Cell Neurosci*. 37(4): 708-18.
- Yoon, H., Enquist, L.W., & Dulac, C. (2005). Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell*. 123(4): 669-682.
- Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H. & Mori, K. (1997). OCAM: a new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J. Neurosci*. 17(15): 5830-5842.
- Yoshihara, Y., Mizuno, T., Nakahira, M., Kawasaki, M., Watanabe, Y., Kagamiyama, H., Jishage, K., Ueda, O., Suzuki, H., Tabuchi, M., Sawamoto, K., Okano, H., Noda, T. & Mori, K. (1999). A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. *Neuron*, 22: 33-41.

- Zavala-Tecuapetla, C., Aguilera, M. A., López-Guerrero, J. J., González-Marín, M.C., & Peña, F. (2008). Calcium-activated potassium currents differentially modulate respiratory rhythm generation. *Eur. J. Neurosci.* 27: 2871–2884.
- Zavala-Tecuapetla, C., Tapia, D., Rivera-Angulo, A. J., Galarraga, E., & Peña-Ortega, F. (2014). Morphological characterization of respiratory neurons in the pre-Bötzinger complex. *Prog. Brain Res.* 209: 39–56.
- Zhang, J.J., Huang, G.Z., & Halpern, M. (2007). Firing properties of accessory olfactory bulb mitral/tufted cells in response to urine delivered to the vomeronasal organ of gray shorttailed opossums. *Chem Senses* 32: 355–360.
- Zibman, S., Shpak, G., & Wagner, S. (2011). Distinct intrinsic membrane properties determine differential information processing between main and accessory olfactory bulb mitral cells. *Neuroscience.* 189: 51–67.
- Zylbertal, A., Kahan, A., Ben-Shaul, Y., Yarom, Y., & Wagner, S. (2015). Prolonged intracellular Na⁺ dynamics govern electrical activity in accessory olfactory bulb mitral cells. *PLoS Biol* 13(12): e1002319.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.....Esquema representativo del BOp (p. 8).
- Figura 2.....Dibujo del cráneo de un venado (*Cervus sp.*) y de su órgano vomeronasal (p. 15).
- Figura 3.....Órgano vomeronasal (p. 17).
- Figura 4.....Esquema representativo del BOA (p. 23).
- Figura 5.....Aferencias sensoriales del limbo olfatorio (p. 28).
- Figura 6.....Organización celular del limbo olfatorio (p. 31).
- Figura 7.....Propiedades electrofisiológicas intrínsecas de neuronas en el bulbo olfatorio accesorio (p. 39).
- Figura 8.....Post-potenciales en neuronas del bulbo olfatorio accesorio (p. 40).
- Figura 9.....En el bulbo olfatorio accesorio hay una sub-población de neuronas principales con propiedades electrofisiológicas “rítmicas” (p. 42).
- Figura 10.....Las ráfagas de potenciales de acción rítmicas en las neuronas principales del bulbo olfatorio accesorio son generadas endógenamente (p. 43).
- Figura 11.....Neuronas principales del bulbo olfatorio accesorio (p. 44).
- Figura 12.....Una sub-población de neuronas principales emite colaterales a la región postero-dorsal del BOp (p. 46).
- Figura 13.....Las mitades anterior y posterior del bulbo olfatorio están recíprocamente conectadas (p. 48).
- Figura 14.....Las mitades anterior y posterior del bulbo olfatorio están recíprocamente conectadas (p. 49).
- Figura 15.....Esquema representativo de los hallazgos hechos en este estudio (p. 52).