

Tesis de Posgrado

El órgano Vomeronasal del armadillo *Chaetophractus villosus* (*Xenarthra*): Estudios sobre su morfología y papel fisiológico : Exploración de una posible nueva función

Carmanchahi, Pablo Daniel

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carmanchahi, Pablo Daniel. (2000). El órgano Vomeronasal del armadillo *Chaetophractus villosus* (*Xenarthra*): Estudios sobre su morfología y papel fisiológico : Exploración de una posible nueva función. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3238_Carmanchahi.pdf

Cita tipo Chicago:

Carmanchahi, Pablo Daniel. "El órgano Vomeronasal del armadillo *Chaetophractus villosus* (*Xenarthra*): Estudios sobre su morfología y papel fisiológico : Exploración de una posible nueva función". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3238_Carmanchahi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES



***TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLOGICAS***

“El Organo Vomeronasal del armadillo *Chaetophractus villosus* (Xenarthra): Estudios sobre su morfología y papel fisiológico. Exploración de una posible nueva función”.

Autor: **PABLO DANIEL CARMANCAHI**

Director: **PROF. DR. JORGE MARIO AFFANNI**

***INSTITUTO DE NEUROCIENCIA
CONICET-UBA***

-2000-

Nº 3 2 3 3

RESUMEN

“El Órgano Vomeronasal del armadillo *Chaetophractus villosus* (Xenarthra): Estudios sobre su morfología y papel fisiológico. Exploración de una posible nueva función.”

Autor: Pablo Daniel Carmanchahi

Dirección: Instituto de Neurociencia (CONICET-UBA). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pab. II, 4to Piso. Laboratorio 54. Ciudad Universitaria (1428) Buenos Aires. Argentina. E-mail : pdc@bg.fcen.uba.ar. TEL/FAX : 4576-3327

Palabras claves: Armadillo, órgano vomeronasal, ultraestructura, lectinohistoquímica, diclobenil, proteína G, proliferación, apoptosis, actividad bioeléctrica cerebral.

El órgano vomeronasal (OVN) es una estructura quimiorreceptora presente en la mayoría de los mamíferos. No hay estudios sobre este órgano en el Orden Xenarthra. En la presente Tesis Doctoral, se realiza un estudio de las características ultraestructurales y lectinohistoquímicas de este órgano. Se propone el uso del diclobenil como instrumento útil para el estudio de la dinámica celular del mismo. También se propone a la Proteína G como marcadora de neuronas en diferente estado de desarrollo. Además, se caracteriza cualitativa y cuantitativamente la actividad bioeléctrica de los bulbos olfatorios y la neocorteza frontal de animales con desaferentación vomeronasal. Los hallazgos morfológicos y fisiológicos presentados, constituyen la base indispensable para ulteriores estudios sobre los factores que regulan la dinámica celular y la neoformación neuronal. Por último, se suministran evidencias de una nueva función del OVN relacionada con la neurofisiología del Sueño. Esto abre nuevas e inesperadas perspectivas para la investigación del papel fisiológico de este órgano.

ABSTRACT

“The Vomeronasal Organ of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Xenarthra): Studies on their morphology and physiology. Exploration of a novel possible function”.

Autor: Pablo Daniel Carmanchahi

Adresses: Instituto de Neurociencia (CONICET-UBA). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pab. II, 4to Piso. Laboratorio 54. Ciudad Universitaria (1428) Buenos Aires. Argentina. E-mail : pdc@bg.fcen.uba.ar. TEL/FAX : 4576-3327

Keywords: Armadillo, órgano vomeronasal, ultraestructura, lectinohistoquímica, diclobenil, proteína G, proliferación, apoptosis, actividad bioeléctrica cerebral.

The vomeronasal organ is a chemorreceptive structure present in most of the mammalian species. There are no studies of this organ in the order Xenartha. In this Doctoral Thesis we studied the ultrastructural features and the lectinhistochemistry of the organ. We propose the use of the herbicide diclobenil as a valuable tool for the study of the VNO cellular dynamics. We also propose to adopt protein G as a marker of the vomeronasal neurons in different developmental stages. Additionally, we studied the effect of vomeronasal deafferentation on the bioelectrical patterns of the olfactory bulb and frontal neocortex during wakefulness and sleep. We provide evidence suggesting the existence of a new function of the VNO related to the display of brain electrical activity during Sleep.

Our morphological and physiological findings provide a sound basis for the study of factors governing the cellular dynamics and neuronal regeneration of this organ.

INDICE

Fundamentos y Objetivos de la Tesis.

Parte 1. *Chaetophractus villosus* como modelo experimental.

Capítulo 1: Sistemática, taxonomía y distribución del orden Xenarthra. 1-1

- 1.1 Historia de la clasificación y nomenclatura del Orden Xenarthra. 1-1
- 1.2 Caracterización de los xenarthros actuales. 1-6
- 1.3 Taxonomía de los xenarthros actuales. 1-7
- 1.4 Caracterización y distribución de la familia dasypodidae. 1-9

Capítulo 2: Utilización de *Chaetophractus villosus* en la investigación. 2-1

- 2.1 Los armadillos en la investigación. 2-1
- 2.2 Características neuroanatómicas de *Chaetophractus villosus*. 2-3
- 2.3 Características anatómicas de la cavidad nasal de *Chaetophractus villosus*. 2-5
- 2.3 Características anatómicas de la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus*. 2-5
- 2.4 Características histoquímicas y lectinohistoquímicas de la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus*. 2-7

Parte 2. Consideraciones sobre el Sistema Olfatorio Accesorio o Vomeronasal.

Capítulo 3: Filogenia del Organo Vomeronasal en los vertebrados. 3-1

- 3.1 Evidencias anatómicas de la presencia del OVN en vertebrados. 3-1
- 3.2 El Organo Vomeronasal en el Hombre. 3-3

Capítulo 4: Descripción de los componentes del Sistema Vomeronasal. 4-4

- 4.1 Organo Vomeronasal. 4-1
- 4.2 Nervio Vomeronasal. 4-4
- 4.3 Bulbo Olfatorio Accesorio. 4-4
- 4.4 Conexiones Nerviosas del Sistema Vomeronasal. 4-5
- 4.5 Dimorfismo Sexual en el Sistema Vomeronasal. 4-6

Capítulo 5: Función del Organo Vomeronasal. 5-1

Capítulo 6: Modelos de funcionamiento del Organo Vomeronasal 6-1

Capítulo 7. Aspectos moleculares de la comunicación feromonal vía OVN en mamíferos. 7-1

- 7.1 Respuestas dependientes del OVN producidas por feromonas. 7-1
- 7.2 Respuestas sexuales producidas por proteínas feromonales. 7-2

7.3 Subclases de neuronas receptoras vomeronasales.	7-2
7.4 Receptores de feromonas.	7-3
7.5 Propiedades fisiológicas de las neuronas receptoras.	7-4

Capítulo 8: Metodología general 8-1

8.1 Obtención y mantenimiento en cautiverio de los armadillos.	8-1
8.2 Procesamiento histológico de las muestras	8-3

Parte 3: Aportes originales de la presente Tesis.

Capítulo 9: Estructura y ultraestructura del Organo Vomeronasal de Chaetophractus villosus. 9-1

9.1 Introducción	9-1
9.2 Posición y morfología del OVN.	9-1
9.3 Descripción microscópica.	9-2
9.4 Discusión.	9-8

Capítulo 10. Estudio de los residuos de azúcares por medio de la detección con Lectinas. 10-1

10.1 Introducción	10-1
10.2 Metodología	10-2
10.3 Resultados	10-4
10.4 Discusión	10-9

Capítulo 11. Efectos del herbicida 2,6-diclorobenzonitrilo (diclobenil) sobre el órgano vomeronasal. 11-1

11.1 Introducción.	11-1
11.2 Metodología experimental .	11-3
11.3 Resultados.	11-4
11.4 Discisión.	11-6
11.5 Conclusiones.	11-7

Capítulo 12: Dinámica celular en el Organo Vomeronasal de Chaetophractus villosus. 12-1

12.1 Introducción.	12-1
12.2 Metodología.	12-3
12.3 Resultados.	12-7
12.3 Discisión.	12-9

Capítulo 13: Estudio de las subpoblaciones de neuronas receptoras vomeronasales en el armadillo Chaetophractus villosus. 13-1

13.1 Introducción	13-1
13.2 Metodología	13-4

13.3 Resultados	13-5
13.4 Discusión	13-7

Capítulo 14: Influencia de la aferencia vomeronasal sobre la actividad bioeléctrica de los Bulbos Olfatorios y del Neocortex frontal de Chaetophractus villosus. Exploración de una posible nueva función del órgano vomeronasal. 14-1

14.1 Introducción.	14-1
14.2 Metodología.	14-6
14.3 Resultados	14-18
14.4 Discusión	14-32

Referencias Bibliográficas

FUNDAMENTOS DE LA TESIS

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos sobre el estudio del Organo Vomeronasal del armadillo *Chaetophractus villosus*.

Justificación de esta Investigación y de la elección de *Chaetophractus villosus* como Modelo Experimental

Por qué estudiar el Organo Vomeronasal?

Una serie de notables características morfológicas, neurobiológicas y fisiológicas convierten al Sistema Vomeronasal en una estructura de creciente interés para la comunidad científica. Algunas de estas propiedades son:

- 1- Las neuronas receptoras vomeronasales (NRV) junto con las neuronas receptoras olfatorias son las únicas de los mamíferos que está en contacto directo con el medio ambiente. Esto entraña un indudable peligro potencial, pues a través de las mismas podrían ingresar sustancias extrañas al Sistema Nervioso Central (SNC). Además, este contacto con el medio ambiente, las convierte, junto con las neuronas olfatorias, en las únicas que sufren las oscilaciones de la temperatura ambiente dentro de un organismo homeotermo.
- 2- En trabajos previos (Getchell y Kulkarni, 1995) se detectó la presencia de elementos polimorfonucleares, pertenecientes al sistema inmune, infiltrados en el epitelio no sensorial de este órgano. Esto sugiere una función de barrera protectora del sistema nervioso. Este hecho es de gran interés ya que esta barrera se sumaría a las ya conocidas hematoencefálica y nasoencefálica.
- 3- Las aferencias vomeronasales llegan a una corteza filogenéticamente antigua (Bulbo Olfatorio Accesorio), al Núcleo Amigdalino e Hipotálamo, sin hacer primero sinapsis con el tálamo como los otros sistemas sensoriales.
- 4- Las NRV se regeneran continuamente, aún durante la vida adulta (Moulton et al, 1970). Esto las convierte en un modelo excepcional para estudiar los procesos de apoptosis, regeneración y diferenciación neuronal.
- 5- La existencia de subpoblaciones neuronales vomeronasales determinadas por la presencia de dos tipos de Proteínas G (G_i y G_o) cuyas eferencias llegan a dos regiones bien delimitadas del Bulbo Olfatorio Accesorio en ratones y una especie de comadreja, podrían sugerir una transmisión diferencial de la información recibida (Jia y Halpern, 1996).

- 6- Dada la similitud con las neuronas olfatorias resulta de sumo interés investigar si las neuronas receptoras vomeronasales tienen la misma capacidad de transportar sustancias al Sistema Nervioso Central por flujo axoplásmico anterógrado y retrógrado.
- 7- La quimiorrecepción especializada de hormonas sexuales y/o sus productos derivados, feromonas y vomeroferinas por parte del OVN (Estes, 1972; Bertmar, 1981; Berliner et al, 1996) suscita el gran interés de grupos de investigación que estudian el comportamiento animal durante la reproducción.
- 8- Esta quimiorrecepción tan especializada es de sumo interés para la industria de los perfumes cuya búsqueda de sustancias atractantes para la especie humana es incesante.
- 9- El OVN participa en la iniciación de comportamientos que despiertan el interés de los etólogos como: la agresividad de las madres en la defensa de sus crías (Wysocki, 1987) y el comportamiento copulatorio en roedores machos y hembras (Halpern, 1987; Mederith, 1986; Saito, 1986; Wysocki, 1987; Wysocki, 1979).
- 10- La extirpación del OVN influye negativamente sobre: la activación de la reproducción de las hembras (Wysocki, 1987); la gestación (Halpern, 1987), el ciclo estral (Ingersoll, 1981) y la pubertad (Halpern, 1987) ya que son mecanismos mediados por feromonas.

¿Por qué utilizar a *Chaetophractus villosus* como Modelo Experimental para el estudio del OVN?

Las características anteriormente mencionadas indican que el órgano vomeronasal es una estructura en la cual ocurren fenómenos fisiológicos y neurobiológicos muy particulares que merecen una exhaustiva investigación. Por otra parte, su estimulación o su ablación experimental pueden producir o modificar el funcionamiento orgánico y el comportamiento. A esto debe sumarse que el modelo experimental elegido, *Chaetophractus villosus*, es particularmente interesante debido a su posición taxonómica que lo ubica como el grupo más primitivo de los vertebrados euterios (Mc Kena, 1975). Además, otras propiedades peculiares lo convierten en un animal muy apto para el estudio de este órgano. Entre esas propiedades se pueden mencionar las siguientes:

- 1- Presenta un órgano vomeronasal muy desarrollado, el cual llega aproximadamente a los 2 cm de longitud (Carmanchahi, 1996).
- 2- Se prestan excelentemente al estudio de las funciones de este órgano, pues resisten muy bien la ablación del mismo (intervención bastante traumática), distintas manipulaciones experimentales y una variada gama de otras intervenciones quirúrgicas como el implante crónico de electrodos. Estos experimentos serían, por ejemplo, prácticamente imposibles de realizar en *Dasyus hybridus* (mulita) pues los ejemplares de esta especie son sumamente lábiles a este tipo de intervenciones y a la manipulación frecuente.
- 3- Los hábitos cavadores de este animal exponen su cavidad nasal a una inmensa variedad de sustancias provenientes de la tierra. De verificarse en las neuronas

receptoras vomeronasales la misma propiedad ya demostrada en las neuronas olfatorias (capacidad de transportar sustancias al interior del cerebro), el órgano vomeronasal pasaría a ser otro punto vulnerable del cerebro. Al igual que para el caso del olfato, debiera postularse la existencia de una barrera de protección “vomeronasal-encefálica”, tema éste de gran interés neurobiológico.

- 4- Otra característica muy llamativa es la presencia de las llamadas “glándulas pelvianas” en la región media dorsal posterior del caparazón que producirían sustancias feromonales (Estecondo, 1995). La óptima localización de estas glándulas permite una excelente observación del comportamiento y el fácil acceso para la extracción de la secreción. Este producto podría servir de agente estimulante del OVN.
- 5- Este animal carece de glándula pineal. La secreción de melatonina es producida por una glándula periocular llamada Glándula de Harder. El conducto excretor de la misma desemboca cerca de la extremidad anterior del OVN (Aldana Marcos et al, 1995). Este hecho sugiere que la secreción de esta glándula periocular (porfirinas, lípidos y melatonina) podría ejercer algún efecto sobre el OVN e inclusive dicho órgano podría ser el medio por donde la melatonina ingresa al Sistema Nervioso Central, de confirmarse la propiedad transportadora de sus neuronas.

Si bien las características estructurales son bastante conocidas, la revisión bibliográfica parece indicar la necesidad de profundizar los estudios sobre las funciones desempeñadas por este órgano. Nosotros consideramos que una estructura tan conservada evolutivamente y dotada de conexiones con estructuras nerviosas centrales de fundamental importancia (núcleo amigdalino, núcleo del lecho de la estría terminal, hipotálamo) podría sugerir que además de la función relacionada con la reproducción, este órgano tendría otras que aún quedan por descubrir.

Frente a la amplia gama de investigaciones posibles relacionadas con el órgano vomeronasal, como las que fueron enumeradas anteriormente, esta Tesis intenta formar la base para un futuro desarrollo de estas líneas de investigación.

Los objetivos generales de esta tesis fueron:

- 1- Conocer detalladamente las características macroscópicas, microscópicas (fotónicas y electrónicas) y lectinohistoquímicas de la mucosa vomeronasal de este armadillo.
- 2- Conocer la dinámica celular del epitelio sensorial del Órgano Vomeronasal como modelo de apoptosis, regeneración y diferenciación de neuroepitelios.
- 3- Determinar posibles nuevas funciones del OVN a través de estudios experimentales de la actividad bioeléctrica cerebral.

***Parte 1. Chaetophractus villosus como modelo
experimental.***

Parte 1. Chaetophractus villosus como modelo experimental.

Capítulo 1: Sistemática, taxonomía y distribución del orden Xenarthra.

1.1 Historia de la clasificación y nomenclatura del Orden Xenarthra.

Un conjunto heterogéneo de mamíferos euterios exclusivamente americanos conforma a los xenarthros, que sin duda, constituyen uno de los grupos más característicos de la fauna neotropical. Actualmente reúne a los perezosos, osos hormigueros (vermilinguas) y a los armadillos. En el grupo, además se incluye a los gliptodontes y megaterios (perezosos terrestres), ya extinguidos (Wetzel, 1985a). Sus caracteres altamente arcaicos y sus especializaciones tan peculiares convierten a este grupo en un taxón de gran variedad e interés.

En su historia evolutiva aún quedan numerosas incógnitas y hay enfoques controvertidos con respecto a su origen y las relaciones entre taxa fósiles y vivientes. Se postularon diversas hipótesis sobre sus afinidades filogenéticas, muy difíciles de establecer, y, en general, fueron separados sensiblemente de los otros grupos mamíferos. Aunque descartada, es interesante recordar la opinión de Florentino Ameghino (1913), quién sostuvo que los "edentados" (junto con los monotremas y cetáceos) forman un grupo especial que denominó "Homalodonta", el cual se originaría directamente a partir de una cepa reptiliana independiente, a través de un grupo hipotético, los "Archaeopelta".

Se ha postulado a Xenarthra como el grupo de euterios de surgimiento más temprano (Mc Kena, 1975). Esto fue apoyado por medio de estudios inmunológicos de las albúminas séricas (Sarich, 1985), los cuales indican que la radiación de este grupo comenzó hace por lo menos 75 u 80 millones de años, es decir en la base del cretácico.

Los estudios realizados indican que el origen más probable para todos los xenarthros sería el de un "armadillo" hipotético, semejante a los actuales dasypódidos, posiblemente, no armado. Los primeros fósiles indudablemente xenarthros se remontan al Paleoceno sudamericano. Consisten fundamentalmente, en restos de escudos que demuestran la existencia de la armadura

característica ya en esa remota época y corresponderían, por consiguiente, a la rama de los actuales dasypodidos (Simpson, 1978).

Se considera que el origen de los xenarthros como grupo es muy anterior, probablemente en el Cretácico medio sudamericano. A partir del Eoceno presentaron una radiación adaptativa notable la cual se tradujo en un número importante de subfamilias. De esta forma, el grupo alcanzó un gran incremento en número y diversificación en el Plioceno-Pleistoceno (probablemente debido al avance del ambiente pampeano). A partir del Oligoceno y especialmente en el Pleistoceno los xenarthros alcanzan un notable tamaño corporal, lo que representaría la especialización culminante de las radiaciones adaptativas, que se iniciaron en la base del terciario (Scillato-Yané y Pascual, 1982).

A fines del Pleistoceno, casi todas las subfamilias se habían extinguido, probablemente por causas diversas; entre ellas, se postula que las más importantes habrían sido: predación por los carnívoros provenientes del Norte (luego del establecimiento del Istmo de Panamá), modificaciones climáticas y fundamentalmente, la aparición del hombre (Patterson y Pascual, 1968).

Cabe acotar que, clásicamente, se empleó el nombre ordinal de Edentata bajo el cual se incluían, además de los actuales xenarthros, a los pangolines y al cerdo hormiguero africano (*Orycteropus*). La sistemática actual ubica a los hormigueros de Asia y África del género *Manis* (pangolines) en el orden Pholidota y a *Orycteropus* en Tubullidentata, separándolos de los xenarthros (Simpson, 1945).

Linnaeus no reconoció a los Edentata (*Xenarthra*) como grupo natural. En efecto, reunió en Bruta a los perezosos y hormigueros, con pangolines y elefantes, en tanto que a los armadillos (con su único género *Dasypus*) los ubicó en Bestias junto con los insectívoros (Casanave, 1989).

Históricamente, el reconocimiento del grupo como tal se remonta a 1780, cuando Storr reunió por primera vez a los perezosos, hormigueros y pangolines con los armadillos, bajo el nombre Mutici, el cual antecede a Edentata (Simpson, 1945).

Pholidota y Tubullidentata fueron separados de Edentata, respectivamente en 1904 por Weber y en 1872 por Huxley (Glass, 1985). Estos grupos tienen en común algunos aspectos: se alimentan de hormigas y termitas, poseen hocico y lengua alargados, glándulas salivales muy desarrolladas y reducción dental. No obstante, pareciera evidente que los tres grupos de hormigueros (Pholidota, Tubullidentata y *Myrmecophagidae*) evolucionaron en forma separada. Se considera que las similitudes entre pangolines y xenarthros se debían principalmente a la semejanza de sus dietas. Las escamas de los pangolines y armadillos son totalmente diferentes. En los primeros, están constituidas por pelos cementados y se superponen entre sí. En los segundos

son placas óseas individuales. Pese a todo, Matthew (1918) consideró que las afinidades entre Pholidota y Xenarthra, son reales y, que ambos pertenecen a un mismo Superorden Edentata, en tanto que el Orycteropus no formaría parte de dicho grupo natural.

Durante algún tiempo los Taeniodonta (fósiles) se consideraron edentados primitivos, pero Matthew (1937) les asignó categoría ordinal independiente, si bien mantuvo la posibilidad de alguna relación a un nivel taxonómico superior. Posteriormente, otros autores confirmaron las diferencias entre ambos grupos, y Simpson (1978), consideró improbable cualquier relación más próxima que a través de un insectívoro generalizado.

Matthew en 1918, incorporó los Palaeonodontes, grupo fósil de América de Norte, a los Edentata. Si bien estos animales eran estructuralmente similares a los armadillos y, probablemente, de hábitos alimenticios similares, no presentaban en la columna vertebral las articulaciones xenartrales características de aquellos. Dicho autor postuló a Palaeonodon como ancestro directo de Pholidota, mientras que Xenarthra sería una rama derivada de un género inmediatamente anterior al nombrado (y en la cual se adquirirían las apófisis accesorias de las vértebras). Las ideas de Matthew las retomó Simpson (1931) quién estableció que los Palaeonodontes norteamericanos y los Xenarthros sudamericanos son dos subórdenes de un orden Edentata común y que los segundos derivarían de los primeros, según la línea protoinsectívoro-palaeonodontes-xenarthros. Esta línea de pensamiento logró el consenso general de los investigadores durante mucho tiempo. Hoffstetter (1958) afirma que, si bien no puede establecerse una línea directa de descendencia de los xenarthros a partir de los palaeonodontes, se puede suponer que, provienen ambos de ancestros comunes (protopalaeonodontes-protóxenarthros).

Simpson (1945), siguiendo a Scott (1937), divide a este orden (Edentata) en dos subórdenes: el Palaenodonta, formado por un solo grupo, y el Xenarthra, que comprende al resto incluyendo formas extintas y recientes.

Dentro de Xenarthra, Simpson designó dos infraórdenes: el Pilosa, en el cual entraban aquellos individuos que tenían el cuerpo cubierto por un espeso pelaje, y el Cingulata, en el que se incluían las formas con el cuerpo cubierto por una coraza y pocos pelos.

Gill (1872) usó la palabra "xenarthral" como un adjetivo cuando se refería a estos animales, pero fue Cope (1889) quien aparentemente utilizó por primera vez el término de Xenarthra para referirse formalmente a un taxón.

La clasificación de Simpson (1945) fue modificada por Romer en 1966, quién dividió a Xenarthra en cuatro Superfamilias: la MYLODONTOIDEA conteniendo solo a la Familia Mylodontidae; la MEGALONYCHOIDEA que comprendía a la familias Megalonychidae, Magatheriidae, y Bradypodidae; la LORICATA (equivalente a la Cingulata) que incluía a las

familias Glyptodontidae y Dasypodidae; y por último a la Superfamilia VERMILINGUA en la que sólo entraba la familia Myrmecophagidae.

Los cambios más recientes en la clasificación fueron producidos en 1970 debidos a que Emry (1970) describió un pangolín del Oligoceno encontrado en los depósitos del río White en Natrona County, Wyoming, y haciendo una revisión extensa de sus relaciones, concluyó que los palaeanodontes fueron ancestros de los pangolines y no de los xenarthras. Usando este esquema, las familias Metacheiromyidae, Epoicotheriidae y Manidae pasan a formar parte del orden Pholidota.

Emry considera que no habría ninguna conexión filogenética especial o ancestro común entre Palaeanodonta y Xenarthra (es decir, que el ancestro común más próximo no sería un Edentata), y que ambos grupos derivarían de insectívoros desconocidos. En cambio postula la secuencia: Palaeanodonta-Metacheiromis- Patriomanis-Manis .

El tema de las afinidades entre xenarthros, pholidotos y palaeanodontes es particularmente complejo. Existen en la actualidad divergencias teóricas importantes, en cuanto a relacionar a los Palaeanodonta directamente con los Pholidotos (Emry, 1970; Reig, 1981; Engelmann, 1985) o con los Xenarthra (Mathew, 1918; Simpson, 1931; 1945; Hoffstetter, 1958; Patterson y Pascual, 1968). Una posición alternativa podría ser considerar a estos tres grupos como tres radiaciones separadas a partir de un ancestro desconocido. De todos modos, el origen de los xenarthros, a partir de un stock relacionado con los palaeanodontes en Norteamérica, es hoy una posibilidad remota (ver Casanave, 1989).

Para concluir este análisis sobre la filogenia de los xenarthros y sus eventuales afinidades con pholidotos y palaeanodontes, podemos mencionar que la singularidad del grupo que nos ocupa fue claramente puesta de manifiesto por Engelmann (1985), al afirmar que, en su opinión, no existe en la actualidad evidencia suficiente como para considerar a los xenarthros especialmente relacionados con ningún otro grupo de mamíferos.

Otro criterio taxonómico propuesto por Scillato-Yané y Pascual (1985) se basa primariamente en hallazgos paleontológicos (un diente peculiar). Ellos definen una cohorte Paratheria que abarcaría a los Edentata y Pholidota como taxones con rango de Magnorden. Según este análisis, los Paratheria se separarían del tronco primitivo Eutheria probablemente en el mesozoico remoto, en algún lugar desconocido del continente de Gondwana. De este modo evolucionarían independientemente, una vez producida la ruptura del mismo (hace alrededor de 85 millones de años), los Edentata en Sudamérica y los Pholidota en el Viejo Mundo. Los Xenarthra representarían una diferenciación regional de un grupo de mayor extensión en el Hemisferio austral (Casanave, 1989).

La clasificación de los Paratheria propuesta en dicho trabajo es la siguiente:

Supercohorte EUTHERIA Gill, 1872.

Cohorte PARATHERIA Thomas, 1887.

Magnorden PHOLIDOTA Weber, 1904.

Magnorden EDENTATA Vicq d'Azyr, 1792.

Superórden PALAEANODONTA Matthew, 1918 (fósiles).

Superórden XENARTHRA Cope, 1889.

Grandorden EFFRODENTIA Gray, 1869.

Orden CINGULATA Illiger, 1811.

Orden VERMILINGUA Illiger, 1811.

Grandorden PHYTOPHAGA Huxley, 1871.

Orden PLEIODONTA Ameghino, 1889 (Fósiles)

Orden TARDIGRADA Latham & Davies, 1795.

Magnorden INCERTAE.

Ernanodon Ding Su-Yin.

Chungchienia Chow Min-Chen.

Desde Vick d'Azyr que creó en 1792 el nombre Edentata (Glass, 1985), pasando por Darwin, sobre quien contribuyó notablemente a iniciar su pensamiento sobre la evolución, los xenarthros siguen desafiando a la capacidad de los científicos que intentan develar sus misterios. En la filogenia de estos mamíferos, que han desempeñado un papel preponderante en la fauna de América del Sur, quedan aún numerosos puntos oscuros (ver Casanave, 1989).

Lo único prácticamente indudable es que el grupo se originaría en Sud América. El registro fósil y la dispersión actual permiten incluso, en un terreno obviamente especulativo, pensar que al menos para los xenarthros, Florentino Ameghino tenía razón y pudieron ciertamente originarse en el actual territorio argentino. De todos modos, sus ancestros no se conocen y su origen continúa siendo incierto (ver Casanave, 1989).

1.2 Caracterización de los xenarthros actuales.

Los xenarthros son mamíferos plantígrados, con pilosidad espesa en algunos y dispersa en otros, de tamaño variable, según la especie. Las extremidades son robustas y provistas de uñas muy desarrolladas, están adaptados a los hábitos cavícolas o arborícolas (Frechkop, 1950;

Matthews, 1971). Cola corta o larga, generalmente cubierta de pelos o placas, o prehensil como en los géneros *Tamandua* y *Cyclopes*.

Presentan como rasgo distintivo, típicas apófisis (cigapófisis) accesorias (xenarthrales) en las vértebras lumbares, a veces también en las dorsales (Casanave, 1989; Gaudin, 1992). Esto determina la presencia de una a tres pares de facetas articulares suplementarias en las caras anterior y posterior de las respectivas vértebras. En los perezosos, las cigapófisis suplementarias no son funcionales (*Bradypus*) pudiendo, incluso, ser vestigiales (*Choloepus*) (Casanave, 1989). En los gliptodontes las vértebras dorsales, lumbares y sacras estaban fusionadas constituyendo un hueso tubular. Las articulaciones isquiáticas (y también del ilium) con la columna vertebral otorgan al extremo posterior de la misma, una rigidez inusual (Frechkop, 1950). Estas características, a las que debe agregarse la presencia de los poderosos miembros posteriores, permiten al grupo adoptar la posición erecta, sobre un "trípode" constituido por los miembros posteriores y la cola (Wetzel, 1982). Otra característica excepcional es el número de vértebras cervicales, que en los perezosos varía de 6 a 10 (6 en *Choloepus* y de 8 a 10 en *Bradypus*), encontrándose en ocasiones fusión de dos o más. Comúnmente poseen 11 vértebras dorsales y 5 lumbares (Beddard, 1909).

El pie es casi siempre pentadáctilo; la mano posee dos o tres dedos más desarrollados, el tercero siempre predominante; uñas muy desarrolladas, que emplean para cavar, trepar o colgarse de los árboles. La escápula, acromion y coracoides muy desarrollados, generalmente fusionados, determinando un orificio coracoescapular (Grasse, 1955). Canal infraorbitario totalmente lateral al cuerpo del maxilar (Engelmann, 1985). Presencia del pequeño hueso narial, característica típicamente reptiliana, que en los mamíferos sólo se encuentra en este grupo (Grasse, 1955).

Tendencia marcada al monofiodentismo, excepto en *Dasypus*, que son difiodontes (Flower, 1868) y a la homodoncia. Incisivos y caninos verdaderos ausentes, aunque los perezosos poseen dientes del tipo caniniforme. Premolares y molares tubulares (Grasse, 1955). No poseen esmalte, no obstante su existencia en algunos embriones y fósiles, indica que su ausencia es un carácter regresivo (Simpson, 1932). En los mirmecofágidos, los dientes faltan totalmente. De esto se desprende que la denominación clásica del grupo taxonómico (Edentata) sólo sería apropiada para la familia Mirmecophagidae (hormigueros) (Casanave, 1989).

Otra característica distintiva de los Xenarthros es la presencia de osículos dérmicos en la piel. Este rasgo típico de los Dasypódidos, se demostró en algunos perezosos fósiles (Engelmann, 1985), constituyéndose en una prueba importante de la unidad filogenética del grupo.

El encéfalo presenta cuerpo calloso (Elliot-Smith, 1898) y ausencia de pineal (Ralph, 1979). Presentan un gran desarrollo relativo de las áreas basales y rinencefálicas de los hemisferios cerebrales -telencéfalo macrosmático- (Gervais, 1869).

Se encontró gran similitud cariotípica entre perezosos y armadillos, si bien los primeros presentan cromosomas supernumerarios, poco común en mamíferos (Wilhams, 1985).

Los testículos son intraabdominales y se ubican en un pliegue del peritoneo (Wislocki, 1933).

Las glándulas salivales son voluminosas (Shackelford, 1963).

La alimentación puede ser insectívora, herbívora u omnívora, según las especies (Newman, 1942; Montgomery, 1985).

Tienen baja tasa metabólica (Irving, 1942) y homeotermia incompleta (Britton, 1938).

1.3 Taxonomía de los xenarthros actuales.

Los xenarthros vivientes se agrupan en cuatro familias que comprenden a los osos hormigueros (fam. Mirmecophagidae), perezosos de tres pezuñas (fam. Bradypodidae), perezosos de dos pezuñas (fam. Megalonychidae) y armadillos (fam. Dasypodidae), según el siguiente detalle:

Orden XENARTHRA. Cope, 1889.

Familia MYRMECOPHAGIDAE. Bonaparte, 1838.

Cyclopes didactylus (hormiguero pigmeo) Linné, 1758.

Myrmecophaga tridactyla (hormiguero gigante) Linné, 1758.

Tamandua mexicana (tamandúa del Norte) Saussure, 1860.

Tamandua tetradactyla (oso melero) Linné, 1758.

Familia BRADYPODIDAE (perezosos de tres pezuñas).

Subgénero *Scaeopus*. Peters, 1859.

Bradypus torquatus (perezoso con crin) Desmarest, 1816.

Subgénero *Bradypus*

Bradypus variegatus (perezoso cuello marrón) Schinz, 1825.

Bradypus tridactylus (perezoso cuello pálido) Linné, 1758

Familia MEGALONYCHIDAE (perezosos de dos pezuñas) Ameghino, 1889

Choloepus hoffmanni (inaú) Peters, 1859.

Choloepus didactylus (perezoso dos pezuñas) Linné, 1758.

Familia DASYPODIDAE (armadillos) Bonaparte, 1838.

Subfam. DASYPODINAE

Tribu EUPHRACTINI Simpson.

Gro. *Euphractus*. Wagler, 1830.

Euphractus sexcinctus (armadillo de 6 bandas) Linné, 1758

Gro. *Chaetophractus*. Fitzinger, 1871.

Chaetophractus nationi (peludo andino) Thomas, 1894.

Chaetophractus villosus (peludo) Desmarest, 1804.

Chaetophractus vellerosus (piche llorón) Gray, 1865.

Chaetophractus vellerosus vellerosus Gray, 1865.

Chaetophractus vellerosus pannosus Thomas, 1894.

Gro. *Zaedyus*. Ameghino, 1889.

Zaedyus pichiy (pichi) Desmarest, 1804

Tribu PRIODONTINI

Gro. *Priodontes*. Owen, 1845.

Priodontes maximus (tatú carreta) Kerr, 1792.

Gro. *Cabassous*. Mc.Murtrie, 1831.

Cabassous tatouay. (Tatú-ai mayor) Desmarest, 1804.

Cabassous centralis. Miller, 1899.

Cabassous chacoensis. Wetzel, 1980.

Cabassous unicinctus (tatú-aimenor) Linné, 1758.

Cabassous unicinctus unicinctus. Linné, 1758.

Cabassous unicinctus squamicaudis Lund, 1845.

Tribu TOLYPEUTINI Weber.

Gro. *Tolypeutes*

Tolypeutes matacus (mataco bola) Desmarest, 1804.

Tolypeutes tricinctus (tatú bola) Linné, 1758.

Tribu DASYPODINI Simpson.

Gro. *Dasypus*

Dasypus (Dasypus) novemcinctus (Cachicamo) Linné, 1758

Dasypus (Dasypus) septemcinctus (mulita orejuda) Linné, 1758.

Dasypus (Dasypus) sabanicola (tatú de sabana) Mondolfi, 1968

Dasypus (Dasypus) hybridus (tatú mulita) Desmarest, 1864.

Dasypus (Cryptophractus) pilosus (tatú peludo) Fitzinger, 1856.

Dasypus (Hyperoambon) kappleri (tatú peba) Kraus, 1862.

Subfamilia CHLAMYPHORINAE Wetzel

Gro. *Chlamyphorus* Harlan, 1825.

Chlamyphorus truncatus (pichiciego menor) Harlan, 1825

Chlamyphorus retusus (pichiciego mayor) Burmeister, 1863

En esta Tesis siguió la Sistemática publicada por Wetzel en 1985 (Wetzel 1985 a,b).

1.4 Caracterización y distribución de la familia Dasypodidae.

Los dasypódidos conforman un grupo natural relativamente homogéneo, a pesar de su aparente variedad. Autóctonos de América, comprenden varias ramas filogenéticas, a partir de un grupo axial, cuya radiación adaptativa comenzó, por lo menos, en la base del terciario.

Es de remarcar el alto grado de conservación del grupo, si se considera que los primeros ejemplares fósiles (*Utaetus*, *Prostegotherium*) no difieren, básicamente, de los actuales, remontándose el registro fósil al Paleoceno de Argentina y Brasil (Ameghino, 1913; Simpson, 1978; Scillato-Yané y Pascual, 1982).

Son animales de tamaño mediano a moderadamente grande, oscilan entre los 15 cm y 150 cm de longitud (Wetzel, 1985b) y de 125 g a 60 kg de peso.

De hábitos terrestres y cavadores, poseen extremidades anteriores cortas y robustas, armadas con fuertes uñas. Se caracterizan por la presencia de un caparazón, de origen conjuntivo, formado por un mosaico de pequeñas placas dérmicas yuxtapuestas, córneas y óseas. Existe un

escudete cefálico y la cola generalmente está recubierta por placas anilladas; pequeñas placas además protegen a las partes expuestas de los miembros. Bandas móviles en un número variable (entre 3 y 30) cubren parcialmente el dorso del cuerpo y se ubican entre dos conjuntos de placas o bandas fijas entre sí. Estas últimas, conforman los escudos escapular y pelviano. Dichas bandas y la convexidad adecuada de los escudos, permiten al animal mover y doblar el cuerpo, evitando la rigidez del caparazón a nivel medio dorsal.

Dorsalmente en el caparazón pélvico se halla un número variable de aberturas (2, 3 ó 4) por medio de las cuales sale la secreción de las Glándulas Pélvicas. La función de dicha secreción aún no es del todo conocida, pero se supone que actuaría como feromona o como defensa.

La piel es resistente, con pelaje relativamente largo, duro y generalmente ralo, revistiendo las partes blandas. En el caparazón los pelos son cerdosos y comúnmente escasos. Dos a cuatro vértebras cervicales soldadas. Tibia y peroné fusionados distal y proximalmente.

Duermen arrollados sobre sí mismos adoptando una postura de U invertida, con la nariz entre los miembros posteriores, o en decúbito dorsal.

Las hembras poseen, en general, mamas pectorales. En los machos el pene es largo y retráctil. Al nacer, están cubiertos por una suave piel coriácea que, posteriormente, conformará el caparazón.

Su alimentación varía con las especies; generalmente son omnívoros o insectívoros. Comen huevos, pequeños vertebrados, frutos y restos vegetales, insectos y sus larvas, otros invertebrados y carroña.

El olfato está muy desarrollado, aunque no así el sentido del gusto (Wetzel, 1985b).

Con respecto a la distribución actual del grupo, Mc Nab considera que existiría cierta relación entre el tamaño corporal y las características climáticas, dado que las especies de mayor tamaño corporal (*Priodontes* sp., *Cabassous* sp., *Euphractus* sp.) son estrictamente tropicales (Wetzel, 1985b).

El género *Chaetophractus* presenta un arco zgomático corto, aplanado transversalmente. Casco cefálico extendido proporcionalmente; una banda móvil completa sobre el margen anterior del caparazón escapular. Dentro de este género, *Chaetophractus villosus* presenta un dorso oscuro, con pelos largos esparcidos, negros y marrones. Presentan dos o tres poros mediodorsales en el caparazón pelviano. Muy activos, cavadores poderosos, de hábitos principalmente nocturnos o crepusculares, durante el día permanecen en sus madrigueras, aunque, ocasionalmente, se los puede ver deambulando en el exterior. Son omnívoros y consumen carroña, huevos, restos vegetales (frutos, raíces, semillas), insectos y pequeños vertebrados. Se los considera plaga de la agricultura, por los daños que ocasionan en los campos de cultivo, con sus cuevas y hozaduras, o

en granjas y gallineros en busca de alimentos. No obstante, se desconoce su incidencia en la cadena trófica, aunque se sabe que consumen pequeños roedores, larvas de insectos perjudiciales para la agricultura, y también carroña. Por otra parte, por su actividad cavadora, contribuye a la remoción y modificación del suelo. Su carne se emplea en la alimentación humana, particularmente en el medio rural. No obstante la persecución de que son objeto, aparentemente la especie se encontraría en expansión.

Localización típica: Buenos Aires, Argentina.

Distribución: En el Chaco Paraguayo, en Argentina en las provincias de Mendoza, Córdoba, Santa Fe, Sur de Chubut y Santa Cruz. También Este de Chile.

Capítulo 2: Utilización de *Chaetophractus villosus* en la investigación.

2.1 Los armadillos en la investigación.

La importancia zoonótica de los armadillos, con sus características anatómicas y fisiológicas sobresalientes, determinaron que su amplio uso como modelos experimentales en investigaciones biológicas y médicas.

A continuación se detallan características anatómicas y fisiológicas de los armadillos que destacan su utilidad como modelo experimental:

1. Gran desarrollo de estructuras olfatorias del cerebro (Benitez et al, 1994), sirviendo como excelente modelo para el estudio del sistema olfatorio;
2. Neocorteza formando un casquete superior sobre el cerebro, que permite la fácil decorticación quirúrgica (Benitez et al, 1994);
3. Organo Vomeronasal (OVN) bien desarrollado (Carmanchahi, 1999) y Mucosa Olfatoria (MO) particular (Ferrari et al. 1998b), lo que permite encarar importantes estudios sobre la anatomía y fisiología de estos órganos.
4. Susceptibilidad a la inoculación de microorganismos productores de diversas patologías en humanos: fiebre ondulante y esquistosomiasis (Storrs, 1971), tifus murino y tifus exatemático (Magalhaes y Rocha, 1944);
5. Modelo experimental para el estudio de la lepra (Storrs et al., 1974; Kirchheimer, 1976; Storrs, 1971). Presencia de lepra indígena y mycobacteriosis natural similar a la lepra humana (Meyers et al., 1978; Resoagli et al., 1982);
6. Reservorio natural del *Trypanosoma cruzi*, agente productor del mal de Chagas (Mazza y Romaña, 1935) y reservorio de *Salmonella* (Quevedo et al., 1978);
7. Susceptible a la infección experimental con *Bacillus anthracis*, que le provoca la muerte, pero resistente a la infección con *Clostridium chauvoci* (Campion, 1959);
8. Susceptible a la infección experimental con los virus productores de la fiebre aftosa (Campion, 1950);
9. Presencia de nefritis intersticial provocada por leptospiras (Cuba-Caparo y Myers, 1978);

10. Implantación diferida en *Dasypus* sp. El huevo se divide para formar un blastocito que no se une inmediatamente al fundus uterino, permaneciendo en estado latente durante 2-4 meses (Enders, 1960; Daniel y Krishman, 1969);
11. Presencia en el gro. *Dasypus* del fenómeno de poliembrionía monocigótica, único entre los vertebrados. El blastocito se divide dando origen a 4-12 embriones genéticamente idénticos que se nutren mediante una placenta común, sincorial. Cada uno posee su propio amnios, pero todos los amnios se conectan entre sí mediante extensiones tubulares que desembocan en una cavidad amniótica común (Chapman, 1901; Fernandez, 1939; Galbreath, 1985). La producción exclusiva de gemelos en *Dasypus* sp. los convierte en modelo óptimo para estudios sobre histocompatibilidad y biología de los trasplantes (Anderson y Bernirschke, 1962; Billingham y Neaves, 1980), inmunología, biología del desarrollo y la reproducción (Anderson y Bernirschke, 1966), herencia (Chedd, 1968), interacción genético-ambiental en el aprendizaje y comportamiento, etc.;
12. Los embriones de hembras preñadas son susceptibles de teratogénesis por acción de la talidomida (Marin-Padilla y Bernirschke, 1963, 1965);
13. Poseen temperatura corporal relativamente baja (Enders, 1936; Mc Nab, 1980; Roig, 1971), lo que permite encarar estudios metabólicos y de termorregulación, imposibles de realizar en otros mamíferos;
14. Presencia de médula ósea en las placas dermales de las bandas dorsales, cuyo ciclo hematopoyético se afecta por los cambios estacionales (Weiss y Wislocki, 1956);
15. Baja tasa metabólica (Wislocki y Enders, 1935; Scholander et al., 1942);
16. Se ha observado recuperación espontánea de la fibrilación ventricular provocada por estímulos eléctricos. El corazón siempre se recuperó espontáneamente después de cada episodio, sin necesidad de respiración artificial o masaje cardíaco (Szabuniewicz et al, 1970). Este hecho puede significar un excelente modelo para el estudio de la fisiología y patología cardíaca;

2.2 Características neuroanatómicas de *Chaetophractus villosus*.

El encéfalo de *Chaetophractus villosus*.

El encéfalo de *Chaetophractus villosus* posee características anatómicas que lo colocan en una posición de gran interés biológico para el estudio de la estructura y funcionamiento del

Sistema Nervioso Central, con especial énfasis en el funcionamiento del sistema olfatorio. En nuestro Instituto se realizó un estudio detallado de la estructura anatómica e histológica del encéfalo de *Chaetophractus villosus* (Benitez et al, 1994). Basándose en dicho trabajo se hace la siguiente descripción neuroanatómica.

Macroscópicamente se puede apreciar el relativo gran tamaño de los Bulbos Olfatorios y Tubérculos Olfatorios. La fisura *rhinalis* anterior y posterior ocupan una posición elevada sobre la superficie lateral del los Hemisferios cerebrales. En vista lateral y ventral se observa un gran desarrollo del V par craneal (el nervio trigémino).

En corte sagital, el encéfalo presenta, en dirección rostro-caudal, el bulbo olfatorio principal, el pedúnculo olfatorio, el tubérculo olfatorio, la neocorteza, la corteza del hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo óptico, los tubérculos cuadrigéminos, el cerebelo, la protuberancia y el bulbo raquídeo. También se pueden identificar la comisura anterior, la comisura hipocampal y el cuerpo calloso. En las terminaciones de las fibras interbulbares de la comisura anterior, que puede observarse en la región basal del encéfalo, se pudo comprobar la presencia de sinapsis axo-dendríticas y axo-somáticas (Affanni et al, 1969).

En una sección vertical a la altura del Bulbo Olfatorio Principal (BOP) se puede observar un gran ventrículo olfatorio, con sus capas concéntricas bien delimitadas: glomerular, plexiforme externa, de células mitrales y de células granulares. El bulbo olfatorio accesorio (BOA) en los armadillos adultos es una estructura rectangular de eje mayor ántero-posterior en cortes sagitales y ligeramente triangular en cortes transversales. Presenta un largo máximo aproximado de 1,9 mm en sentido ántero-posterior, de 1 mm en sentido transversal, y 1,3 mm en dirección dorso-ventral. Se ubica en la región dorsomedial interna de los bulbos olfatorios (Carmanchahi, 1996).

El BOA presenta cinco capas:

I- Capa fibrosa

II- Capa glomerular.

III- Capa plexiforme externa

IV- Capa plexiforme interna

V- Capa granular.

Los axones amielínicos del Nervio Vomeronasal (NVN), penetran al BOA desde el aspecto medial del BOP en el espacio entre la corteza frontal y la capa fibrosa del BOP (Carmanchahi, 1996). Al penetrar al BOA forman la capa más externa o capa fibrosa. El recorrido del NVN aparentemente finalizaría en la capa glomerular. Esta capa presenta mayor densidad de glomérulos que en el BOP. Los límites de los glomérulos individuales son generalmente difíciles de definir

debido a que las células periglomerulares no se hallan distribuidas regularmente alrededor del glomérulo como ocurre en el BOP. Debajo de la capa glomerular, se halla una capa ancha denominada capa plexiforme externa. Formada por un denso neuropilo con células dispersas y escasos axones mielínicos. Esta capa contiene a las llamadas células mitrales, que en nuestro modelo no forman una capa distintiva (Carmanchahi, 1996). La siguiente capa, la capa plexiforme interna, se distingue de la anterior por el escaso número de células mitrales y por la mayor cantidad de fibras mielínicas. En la base del BOA existe una población de pequeñas células granulares, que incluye al tracto olfatorio lateral y forma una capa distintiva, la capa granular (Carmanchahi, 1996).

Una profunda fisura *rhinalis* anterior actúa como un límite entre la Neocorteza -corteza frontal- y el paleocórtex. Una capa del Bulbo Olfatorio contribuye al paleocórtex en su región medio-ventral, mientras que la Corteza Piriforme, rodeada por el Tracto Olfatorio Lateral, forma el área dorso-lateral del Hemisferio cerebral.

En cortes verticales más caudales, la neocorteza domina la región dorsal y la fisura rhinal posterior la separa de la corteza piriforme, que domina la región lateral externa. El tracto olfatorio lateral sigue externamente bordeando a dicha corteza. En una región más caudal, el gran tamaño del tubérculo olfatorio comienza a predominar en la región ventral del cerebro.

En la región central de cada hemisferio cerebral comienzan a destacarse los núcleos del cuerpo estriado y el cuerpo calloso uniendo ambos lados. Sobre el cuerpo calloso predomina el induseum griseum, estructura muy conspicua en este mamífero, que se encuentra a ambos lados de la línea media.

El núcleo amigdalino en la región ventral presenta un gran tamaño. Este animal muestra un estado intermedio entre lisencefalia y girencefalia.

2.3 Características anatómicas de la cavidad nasal de *Chaetophractus villosus*.

La cavidad nasal ocupa el macizo facial con una dirección longitudinal. Se extiende desde el extremo anterior del hocico hasta el etmoides -que la separa del cerebro- y la coana -que comunica con la nasofaringe (Ferrari, 1997). Se divide en dos fosas nasales por medio de un tabique incompleto denominado septo nasal que la divide en izquierda y derecha solamente en su tercio rostral. Caudalmente, ambas están comunicadas a través del extremo ventral del septo nasal (Ferrari, 1997).

Debido a su forma rectangular, la cavidad nasal presenta dos extremos -anterior y posterior- y cuatro lados -dorsal, medial o interno, lateral o externo y ventral-. El extremo anterior se comunica con el exterior a través de las narinas, cuyas aberturas se hallan limitadas por una porción cartilaginosa en forma de anillo incompleto. El extremo posterior se halla subdividido en dos cavidades: la cavidad dorsal está ocupada por el laberinto etmoidal, formado por los turbinales del etmoides y separada de la cavidad craneana por la lámina cribosa del etmoides; la cavidad ventral forma el conducto naso-faríngeo, que se abre a la coana (Ferrari, 1997).

Las narinas desembocan dentro de la cavidad nasal en una región denominada vestíbulo. La cara latero-interna presenta una estructura muy llamativa, que a modo de evaginación, oblitera parcialmente el lumen vestibular. Esta estructura se halla tapizada por numerosas espinas queratinizadas que se proyectan hacia las narinas (Ferrari, 1997).

A partir del vestíbulo la pared lateral de las fosas nasales es irregular y anfractuosa debido a la saliencia de los turbinales -cornetes- que delimitan depresiones longitudinales llamadas meatos. Sobre estos turbinales descansa el epitelio respiratorio y la mucosa olfatoria. Este complejo sistema de cornetes nasales provee una enorme superficie cubierta por las diferentes mucosas (Ferrari, 1997).

2.3 Características anatómicas de la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus* (Ferrari et al, 1998).

En esta parte de la Tesis se hace una descripción detallada de la mucosa olfatoria ya que en los capítulos siguientes, se comparan sus características con las del órgano vomeronasal.

La mucosa olfatoria consiste en dos capas: un epitelio olfatorio, y una lámina propia profunda. La primera presenta un epitelio pseudoestratificado que contiene tres capas celulares morfológicamente diferentes: células de sostén o sustentaculares (CS), neuronas receptoras olfatorias (NRO), y células basales (CB). Además, los ductos de las glándulas de Bowman también pueden ser observados dentro del epitelio. Las células ductales muestran un núcleo aplanado con un escaso citoplasma.

Las células de sostén forman una capa conspicua en la región más externa del epitelio olfatorio, ellas son columnares y se extienden desde la membrana basal hasta la superficie epitelial. En la región apical de las células, se encuentra un único núcleo con forma oval. La

zona basal de estas células forma procesos denominados expansiones basilares. Se pueden distinguir dos tipos de células sustentaculares: Las células tipo 1 con un citoplasma claro y las tipo 2 con un citoplasma oscuro. Ambos tipos presentan protrusiones del tipo apócrino en la superficie luminal. Estas protrusiones pueden ser pedunculadas o no pedunculadas.

Las NRO muestran una típica forma de botella, con un proceso dendrítico periférico que se extiende desde el soma celular hacia la superficie epitelial, mientras que un axón atraviesa la lámina basal. La dendrita protruye sobre la superficie epitelial formando una protuberancia o *knob* olfatorio. La región nuclear está situada debajo del nivel nuclear de las CS y presenta un citoplasma claro. El núcleo de la NRO muestra un carioplasma con una coloración clara, con enormes masas de heterocromatina en su periferia.

Las CB están confinadas a la región del epitelio olfatorio adyacente a la membrana basal. Se pueden diferenciar dos tipos de células basales: Células basales globosas (CBG) y células basales alargadas (CBA). Las CBG muestran núcleo y citoplasma pálido, las CBA tienen un núcleo con eje longitudinal usualmente paralelo a la membrana basal, tanto su citoplasma como su núcleo presentan una coloración más fuerte.

La lámina propia contiene nervios olfatorios amielínicos, glándulas de Bowman (GB), un tejido conectivo laxo con fibroblastos, escasas fibras colágenas, vasos sanguíneos y nervios mielínicos. También se pueden observar las células de Schwann rodeando a grandes paquetes de fibras olfatorias amielínicas.

Las glándulas de Bowman presentan adenómeros túbulo-acinares ramificados separados por una capa fina de tejido conectivo. Las glándulas son mixtas formadas de células secretoras serosas y mucosas. Ambos tipos celulares pueden ser observados en el mismo acino, pero las células mucosas son siempre más numerosas. Ambos tipos tienen una forma piramidal con un núcleo redondo u ovalado ubicado en la región basal de la célula. Las células mucosas contienen una alta densidad de gránulos secretorios grandes, claros y con bordes poco definidos. Las células serosas contienen gránulos oscuros homogéneos y pequeños.

2.4 Características histoquímicas y lectinohistoquímicas de la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus* (Ferrari et al, 1999).

Histoquímica convencional

En el epitelio olfatorio, la región subapical de las células sustentaculares, el área basal del epitelio y los ductos de las glándulas de Bowman, contienen glicoconjugados neutros demostrados por la reacción de PAS. Este mismo contenido de glicoconjugados ha sido revelado en la membrana basal subyacente al epitelio. Los ductos de las glándulas de Bowman que atraviesan el epitelio, además mostraron una reacción positiva frente al Alcian Blue (pH 1 y 2,5) revelando la presencia de glicoconjugados ácidos sulfatados y carboxilados.

La capa de mucus que tapiza el epitelio presenta dos regiones: una externa coloreada con ambos pH de Alcian Blue y una interna coloreada con PAS. Estos resultados indican que los glicoconjugados ácidos y neutros encontrados no se mezclan y se mantienen en capas bien delimitadas.

La técnica combinada de Alcian Blue/PAS mostró en las glándulas de Bowman la presencia de células con glicoconjugados ácidos (células azules), células con glicoconjugados neutros y débilmente ácidos (células rosadas) y células con glicoconjugados neutros y ácidos (células púrpura). Estos resultados indican que los armadillos poseen diferentes poblaciones acinares en las glándulas de Bowman.

Lectinohistoquímica

La capa mucosa que yace sobre el epitelio olfatorio posee glicoconjugados con residuos con N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y galactosa. La capa mucosa, las glándulas de Bowman y sus ductos, reaccionan positivamente frente a la lectina WGA, lo que revela la presencia de glicoconjugados que contienen N-acetilglucosamina. Estos resultados podrían estar relacionados con la presencia de proteínas que pegan moléculas odorantes en estas estructuras. La mayoría de los glicoconjugados detectados en la capa mucosa también fueron demostrados en las glándulas de Bowman. Esto podría indicar que glicoconjugados complejos son sintetizados por estas glándulas.

Con la técnica de lectinohistoquímica pudimos observar una coloración heterogénea en células de las glándulas de Bowman, demostrando la presencia de subpoblaciones. La coloración diferencial de subpoblaciones acinares podría representar diferentes estados del ciclo secretor y/o diferentes tipos de células glandulares. Estos resultados confirman los resultados de un estudio de microscopía electrónica, en el cual encontramos dos tipos de células glandulares en este armadillo (Ferrari et al, 1998 b).

Los ductos de las glándulas de Bowman se marcaron con las mismas lectinas que las glándulas correspondientes. Sin embargo, se hallaron glicoconjugados que fueron exclusivamente revelados en los ductos. Esto sugiere la activa participación de las células

ductales en la producción de mucus y está de acuerdo con la observación ultraestructural en la que se demostró la presencia de gránulos secretorios en estas células (Ferrari et al, 1998 b).

El citoplasma supranuclear de la neurona receptora olfatoria (NRO) contiene D-Galactosa, N-Acetilgalactosamina, D-manosa y N-Acetilglucosamina. Los residuos con D-galactosa, N-Acetilgalactosamina y D-Manosa están presumiblemente relacionados con el reconocimiento célula-célula, la adhesión, la fasciculación y la interacción durante la regulación de la diferenciación celular. Cabe destacar que esta diferenciación ocurre en el sistema olfatorio, no sólo durante el proceso de desarrollo sino también durante la vida adulta (Gheri et al. 1992; Francheschini et al. 1994). La coloración citoplasmática con las lectinas Con-A y PNA han sido atribuidas a terminales de azúcares en el Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER) y en el Aparato de Golgi (Fuhrmann y Bereiter-Hahn, 1984; Ihida et al. 1991). En coincidencia con estos resultados, los estudios ultraestructurales mostraron al Aparato de Golgi y al RER principalmente localizados en el área supranuclear (Ferrari et al. 1998b). Las glicoproteínas que se unen a Con A están involucradas en la protección frente a infecciones bacterianas (Lemaire et al. 1996). El knob olfatorio contiene residuos de N-Acetilglucosamina, D-galactosa, N-Acetilgalactosamina y D-manosa. Los glicoconjugados en esta zona probablemente estén relacionados con proteínas transmembrana receptoras, involucradas en la percepción del olor (Chen et al. 1986; Menco 1992; Francheschini et al. 1994).

***Parte 2. Consideraciones sobre el Sistema Olfatorio
Accesorio o Vomeronasal.***

Capítulo 3: Filogenia del Órgano Vomeronasal en los vertebrados.

Sólo en los tetrápodos el OVN aparece como una estructura desarrollada (Negus, 1958). Sin embargo, en algunos peces muy primitivos como el pez pulmonado africano *Protopterus* (Rudebeck, 1944) y el "pez paleta" (Paddle fish) *Polyodon* (Story, 1964) se describió un bulbo olfatorio accesorio (BOA) y nervios que podrían inervar a un tipo de OVN rudimentario, sin embargo, en peces teleósteos no se observan estructuras semejantes al OVN.

En las aves, reptiles acuáticos (cocodrilos), mamíferos acuáticos y grandes primates (incluido el hombre) el OVN está ausente o es vestigial (Parsons, 1967; Parsons, 1970). Según Crosby (1938), en el hombre el OVN sólo se observa en estados embrionarios, sin embargo, recientemente han sido publicados datos que indican que el OVN existe en la mayoría de los humanos adultos (Morán, 1985; Morán, 1991; Johnson, 1985; Stensaas, 1991; García Velasco, 1991). Los ofidios y lacertilios terrestres conforman el grupo de vertebrados que presenta un mayor desarrollo del órgano vomeronasal. (Bertmar, 1981a).

3.1 Evidencias anatómicas de la presencia del OVN en vertebrados.

En la mayoría de los peces las estructuras olfatorias principales están representadas por el Saco Nasal (SN), la Roseta Olfatoria (RO) y los tubos nasales (Rudebeck, 1944). El PO, como su nombre lo indica es una estructura en forma de saco, que se comunica con el medio externo por medio de un tubo nasal anterior, por donde ingresa el agua, y un tubo nasal posterior, por donde sale el agua. El fondo del saco presenta una serie de invaginaciones o "lamelas primarias" y una serie de evaginaciones o "pliegues olfatorios". El conjunto de lamelas y pliegues se denomina RO. La RO presenta un eje ántero-posterior, del que parten lamelas primarias parcialmente cubiertas por epitelio sensorial. En los salmónidos las lamelas primarias presentan pliegues secundarios ("lamelas secundarias"). Algunos peces a su vez presentan pliegues olfatorios especializados: en los pulmonados el pliegue olfatorio posterolateral se expande y forma el *diverticulum*, y en algunos teleosteos forma el "saco nasal accesorio". El *diverticulum* de los pulmonados presenta una acumulación de receptores olfatorios cuyos axones se dirigen hacia el Bulbo Olfatorio. A juzgar por su posición, morfología, ontogenia y contenido de receptores quimiosensoriales, que a su vez se comunican con el Bulbo Olfatorio, el *diverticulum* posterolateral podría representar un OVN primitivo o el primordio evolutivo del OVN. Aparentemente estas estructuras han evolucionado como una adaptación a la vida terrestre durante los periodos de sequías (Bertmar, 1981a).

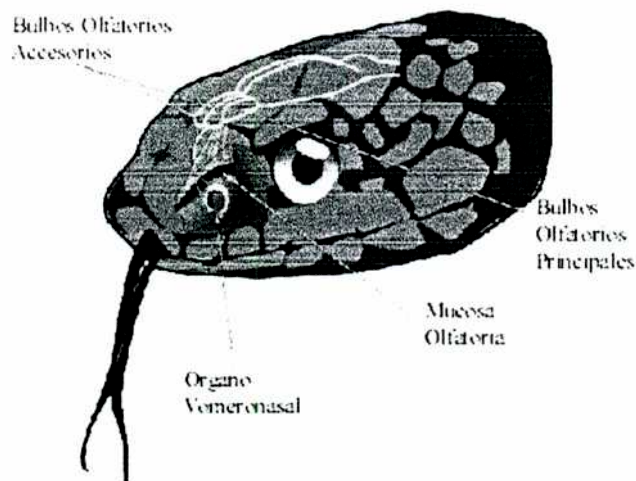
El OVN en Urodela y Gymnophiona (Apoda) podría haber evolucionado de un divertículo posterolateral de un crossopterigio porolepiforme (Bertmar, 1969). Los urodelos evolucionaron formando un "bolsillo" vomeronasal que se abre a la boca a través del paladar formando una hendidura continua con las coanas. Los gymnophionas tienen un OVN más definido, aunque mantiene su posición posterolateral.

En los anuros y amniotas, la ontogenia, morfología y posición del OVN implica que este podría haber evolucionado de un divertículo ánteromedial de los crosopterigios osteolepiformes (Bertmar, 1969).

La anatomía de la cavidad nasal de los cotilosaurios (orden más primitivo de reptiles, Colbert, 1969) es poco conocida, sin embargo, basándose en registros fósiles y analizando la ontogenia del OVN de los reptiles recientes, se sugiere un modelo hipotético de OVN en los cotilosaurios. De este modelo se asume que podrían haber evolucionado las distintas líneas de OVN de amniotas. (Bertmar, 1981).

En reptiles que retornaron a la vida acuática o se volvieron arborícolas, el OVN se hizo vestigial (lagartijas arborícolas), o se perdió (cocodrilos), (Negus, 1958). También se halla ausente en pájaros y en tortugas de agua dulce (Negus, 1958). En tortugas marinas existen dos divertículos que según Parsons (1959) podrían representar al OVN. En otros quelonios el OVN está confinado a la mitad ventral del saco nasal principal.

Las serpientes y lagartijas terrestres presentan el OVN más desarrollado de los reptiles actuales (Bertmar, 1981). En los embriones, el OVN se conecta con la cavidad bucal y la nasal, pero en los adultos, sólo se mantiene la primera comunicación -ducto palatino- (Negus, 1958). Estos conductos situados por delante de las narinas internas se abren a la cavidad oral. La lengua bífida de las serpientes y algunas lagartijas introduce moléculas odoríferas desde el ambiente externo hacia los conductos, las cuales toman contacto con los receptores del OVN (Bertmar, 1981).



Los mamíferos monotremas y marsupiales presentan un tipo primitivo de OVN, el que sólo se conecta con la cavidad nasal y con el exterior, a través del ducto nasal (Bertmar, 1981).

En los euterios el ducto nasal ha evolucionado ventralmente y penetra al paladar como ducto nasopalatino (insectívoros, carnívoros, algunos roedores y ungulados). (Negus, 1958). Por lo tanto, secundariamente el OVN tiene acceso a químicos volátiles a través de la cavidad bucal. (Bertmar, 1981). De este modelo de OVN se podrían haber desarrollado dos subtipos:

1- OVN abierto dentro de la cavidad nasal pero separado del ducto nasopalatino (lagomorfos, algunos roedores y algunos ungulados). (Negus, 1958).

2- Ducto nasopalatino vestigial y OVN desarrollado en embriones, pero ausente en adultos. (mamíferos acuáticos y grandes primates) (Negus, 1958).

En resumen, el órgano vomeronasal de los vertebrados podría haber evolucionado de los pliegues olfatorios del saco nasal de los peces, que poseen una acumulación de receptores olfatorios especializados (Bertmar, 1981).

La evolución del órgano vomeronasal, iniciada con las tendencias terrestres, avanzó en los tetrápodos que vivían sobre la tierra, como una adaptación para la orientación y detección de moléculas de alimentos, agua y/o sustancias biológicas como las feromonas (Bertmar, 1981a). En tetrápodos que retornaron a la vida acuática, el órgano vomeronasal se hizo vestigial o involucionó completamente (Bertmar, 1981a).

3.2 El Organó Vomeronasal en el Hombre.

Durante mucho tiempo, la comunidad científica en general asumió que el OVN en los humanos no era común y si estaba presente no era funcional. Sin embargo, hace algunos años han sido publicados estudios en donde indican que el OVN existe en la mayoría de los humanos (Morán et al, 1985, 1991; Stensaas et al, 1991) como una única estructura que puede ser visualizada bajo microscopio óptico como electrónico (Morán et al, 1985, 1991; Stensaas et al, 1991), contiene células inmunorreactivas a marcadores neuronales (buscar Takami et al, 1993) y muestra distintas respuestas quimiorreceptivas a estimulantes químicos específicos (Monti-Bloch y Grosser, 1991).

Los datos anatómicos demuestran que en los humanos adultos existe un OVN par en la cavidad nasal, uno a cada lado del septo nasal. El OVN humano se abre a la cavidad nasal mediante un poro en la región anterior del septo nasal, el cual es claramente detectable mediante una examinación endoscópica.

Microscópicamente, el epitelio vomeronasal humano contiene tres tipos de células: basales, oscuras y claras (Morán et al, 1995). Las células claras presentan características ultraestructurales similares a las de las neuronas y se colorean positivamente con marcadores inmunohistoquímicos de neuronas (enolasa específica de neuronas y PGP 9,5) (Takami et al, 1993).

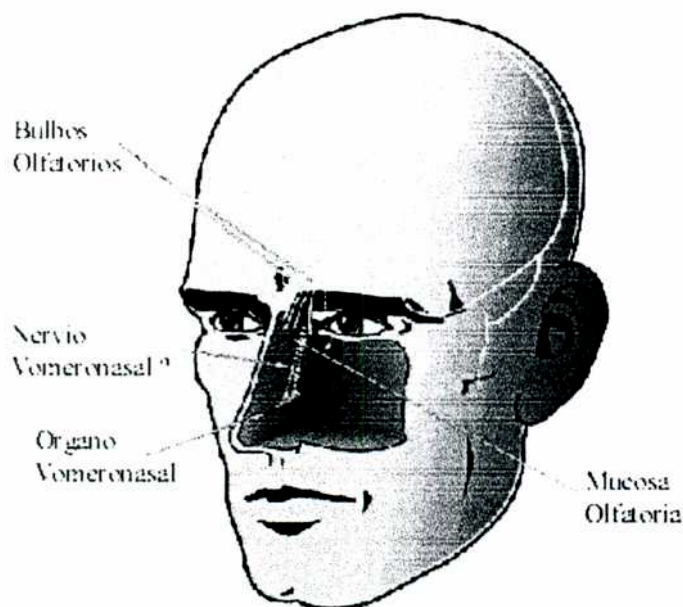
El OVN humano produce respuestas electrofisiológicas a la quimioestimulación con sustancias específicas como feromonas o vomeroferinas (este término se refiere a aquellas sustancias cuyo efecto es mediado por el OVN. Monti-Bloch et al, 1994). Estas vomeroferinas exitan al OVN pero no al epitelio olfatorio y además la respuesta del OVN a las vomeroferinas varía con el sexo. Esto demuestra que el OVN no es una estructura sensorial sin función.

Los cambios fisiológicos específicos observados durante la estimulación del OVN por vomeroferinas (aumento de la temperatura corporal, erizamiento de la velloidad de la piel, etc...) sugieren la posibilidad de que el OVN esté conectado funcionalmente al cerebro. La velocidad de esos efectos autonómicos indican que la transmisión de la información desde el OVN al cerebro es similar a la neuronal y no causado por agentes humorales provenientes de la sangre (Morán et al, 1995). Ha sido demostrado que el bulbo olfatorio accesorio en el cerebro humano desaparece en el segundo trimestre de gestación y no está presente en el adulto (Humphrey, 1940), sin embargo, estudios recientes demostraron que el BOA humano

podría desaparecer como una estructura anatómica discreta pero sus células sufren un desplazamiento físico y no una degeneración neuronal y por lo tanto persisten durante la vida adulta. Este desplazamiento se debe a un rápido crecimiento de los lóbulos frontales del cerebro humano durante el desarrollo fetal y causa un gran estiramiento de la región del cerebro que contiene al BOA. Por lo tanto, es posible que los componentes neuronales del BOA humano persistan durante el desarrollo pero no como una estructura similar a un bulbo como se puede observar en otros animales. También se ha demostrado la presencia de un complejo nervioso denominado Complejo de Nervios Terminal y OVN (VTNC, Brown, 1987), que persiste por lo menos hasta el octavo mes del desarrollo fetal y que puede ser observado en las proximidades del OVN.

En resumen se puede decir que el OVN humano existe, que tiene una ultraestructura única, que contiene células que responden electrofisiológicamente a la quimioestimulación de manera específica, que la estimulación del OVN por vomeroferinas es seguida por cambios autonómicos medibles y que existen varias vías neurales por medio de las cuales el OVN podría estar conectado con el cerebro.

A partir de todas estas investigaciones, el OVN toma gran importancia ya que podría representar el "sexto sentido".

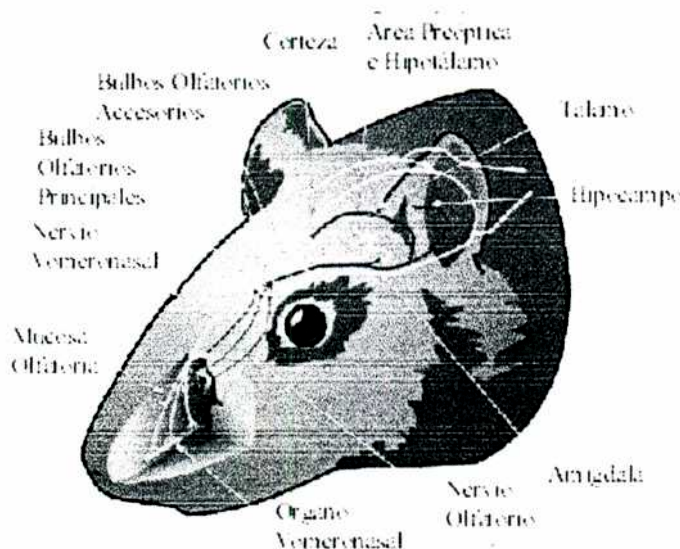


Capítulo 4: Descripción de los componentes del Sistema Vomeronasal.

4.1 Organo Vomeronasal

Posición anatómica, forma y dimensiones:

El OVN "típico" de los vertebrados está representado por una estructura par situada en el piso de la cavidad nasal a ambos lados de la base del septo nasal.



En la mayoría de los mamíferos, el OVN presenta la forma de un cilindro hueco que, con la dirección del septo nasal, acompaña a éste en parte de su recorrido longitudinal antero-posterior a lo largo de la base de la cavidad nasal. En sección transversal, este cilindro hueco presenta una forma arrionada con dos caras principales, una superior externa, convexa al lumen, de menor espesor y una inferior interna, cóncava al lumen, de mayor espesor. El lumen del órgano es relativamente estrecho.

En la mayoría de los vertebrados, el OVN se comunica por medio del ducto nasopalatino o incisivo con la cavidad bucal, pero también puede existir un conducto que se abre a la cavidad nasal. La presencia de estos canales es variable y depende de los distintos grupos animales (Estes, 1972).

En lo que respecta a las dimensiones del OVN, éste presenta una alta variabilidad entre los distintos grupos animales, así por ejemplo en el perro, el órgano podría alcanzar los 40 mm de

longitud por 2 mm de ancho (Barone, 1966) y en el búfalo africano (*Syncerus caffer*) alcanza una longitud aproximada de 165 mm (Barone, 1966).

Descripción microscópica:

El OVN esta conformado por tres componentes principales: una mucosa, una submucosa y un cartilago (Vacarezza, 1981; Taniguchi et al, 1992; Oikawa et al, 1993; Morán et al, 1995).

MUCOSA: considerada desde el punto de vista de su estructura, la mucosa esta compuesta por dos capas: una superficial, de naturaleza epitelial y la otra profunda o corion de naturaleza conectiva.

A. *Capa epitelial:* tapiza la superficie luminal del OVN. Presenta dos tipos de epitelios distintos, tanto en su posición, como en estructura y función. La cara convexa al lumen está revestida por un epitelio pseudoestratificado, cilíndrico, ciliado, con características similares al epitelio respiratorio de la cavidad nasal. La cara cóncava al lumen está revestida por un epitelio pseudoestratificado neurosensorial que contiene los receptores vomeronasales. En este epitelio se pueden distinguir tres tipos celulares (Taniguchi et al, 1992):

I- Células basales: en íntimo contacto con la membrana basal, con escaso citoplasma y núcleo aplanado o redondeado. La disposición de los núcleos de las células basales dentro del epitelio forma una capa o zona basal.

II- Células neuronales bipolares (receptores vomeronasales). Dispuestas con un polo basal que atraviesa la membrana basal y forma el nervio vomeronasal y un polo apical en contacto con el lumen del órgano. La porción somática que incluye al núcleo, se ubica en la región medial del epitelio y forma la denominada capa o zona medial.

III- Células de sostén: se caracterizan por presentar la mayor parte del citoplasma en la región apical. Estas células cilíndricas rodean a la prolongación sensitiva de los receptores vomeronasales. El borde apical presenta numerosos gránulos secretorios. El conjunto de núcleos de las células de sostén se ubica en la región superficial del epitelio y forman la denominada capa o zona apical.

B. *Corion:* Un delgado corion rodea a ambos tipos de epitelios por debajo de la membrana basal. Formado por un tejido conectivo laxo, rico en fibras colágenas y reticulares, capilares sanguíneos, fibroblastos, macrófagos, mastocitos e infiltrados del tipo mononuclear y

polimorfonuclear. Paquetes delgados de fibras amielínicas atraviesan el corion hacia la submucosa. No existe un límite neto entre el corion y la submucosa.

SUBMUCOSA: delimitada internamente por el corion y externamente por el cartilago vomeronasal. Formada por un tejido conectivo laxo con variada cantidad de fibras colágenas, fibras elásticas y reticulares. La mayor parte de los paquetes nerviosos que la recorren son amielínicos, sin embargo, pueden observarse algunos nervios mielínicos. La característica más sobresaliente es la abundante presencia de vasos sanguíneos en su mayoría venas de distintos calibres. Por la forma y distribución de estos vasos puede incluirse a la submucosa del OVN dentro de los tejidos del tipo eréctil. El tejido conectivo presenta elementos móviles como: polimorfonucleares y mononucleares; elementos fijos como: plasmocitos, histiocitos, fibroblastos y fibrocitos.

Inmersa en la submucosa se encuentra una abundante masa de glándulas, del tipo túbuloalveolar, en las cuales se pueden observar adenómeros del tipo seroso, mucoso y muciseroso.

Estudios histoquímicos de las glándulas vomeronasales realizados en algunos mamíferos (Taniguchi et al, 1992; Oikawa et al, 1993) revelan que las células de los adenómeros son PAS positivas y azul alcian negativas. Lo que indica la presencia de glicoconjugados neutros.

CARTILAGO: como una semivaina envuelve a la submucosa que rodea al cilindro epitelial del OVN. Es un cartilago del tipo hialino.

Irrigación e inervación del OVN:

El OVN está rodeado por un tejido cavernoso y por lo tanto, está bien vascularizado. La arteria esfenopalatina entra a la cavidad nasal en los mamíferos y una de sus ramificaciones, la arteria septal, es la vía principal de la provisión de sangre del OVN.

La inervación autonómica del OVN es extensiva y compleja. Las terminales nerviosas colinérgicas parasimpáticas del ganglio esfenopalatino inervan los vasos sanguíneos y las glándulas. Las terminales nerviosas adrenérgicas del ganglio cervical superior inervan predominantemente los vasos sanguíneos (Änggård et al, 1983). El nervio Vidian (Nervio *canalis pterygoidei*) contiene nervios simpáticos postganglionares y componentes parasimpáticos preganglionares relevando en el ganglio esfenopalatino. La estimulación del nervio Vidian o del

ganglio esfenopalatino causa un incremento en la secreción del fluido del órgano. La secreción del OVN comienza aproximadamente 45 segundos después de la estimulación del nervio Vidianio y continúa por 1 ó 2 minutos después que la estimulación haya cesado. La atropina bloquea la secreción inducida por la estimulación del nervio Vidianio (Eccles, 1982).

4.2 Nervio Vomeronasal

El conjunto de axones provenientes de las células receptoras vomeronasales al abandonar el epitelio vomeronasal forman un nervio amielínico, llamado nervio vomeronasal. Sus fibras, con dirección posterior se dirigen paralelas al septo nasal hacia una región del Bulbo Olfatorio Principal denominada Bulbo Olfatorio Accesorio (Crosby, 1938).

4.3 Bulbo Olfatorio Accesorio

La presencia del Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA) ha sido verificada en casi todos los órdenes de mamíferos (Wysocki, 1989), fue demostrada en los fetos humanos (Humphrey, 1940) y aparentemente está ausente en los cetáceos (Oelschläger, 1989). Entre los vertebrados no mamíferos su presencia fue demostrada en varias especies de anfibios y reptiles (Herrick, 1921).

Los axones del nervio vomeronasal parten del epitelio sensorial del OVN, forman varias ramas nerviosas amielínicas que discurren por el corion de la mucosa del OVN, continuando su recorrido en la submucosa del septum nasal hasta llegar a la placa cribiforme del etmoides. Luego de atravesar el etmoides discurren por la cara medial del Bulbo Olfatorio Principal y penetran al BOA (Bojsen-Möller, 1975).

El BOA se ubica generalmente, en la porción medial dorsocaudal del Bulbo Olfatorio Principal. Su citoarquitectura muestra algunas similitudes con el Bulbo Olfatorio Principal, consiste en una serie de capas concéntricas. Las diferentes capas del BOA varían en grosor según la especie estudiada, incluso a veces es difícil reconocer todas sus capas estructurales (Vacarezza et al, 1981). En algunos animales como el cobayo, las neuronas que forman los axones eferentes del BOA forman otra capa denominada "capa de células mitrales", sin embargo, en la mayoría de los animales estas células se hallan ubicadas dentro de la capa plexiforme externa (Farbman, 1992a).

Las fibras del NVN penetran al BOA por su cara interna y forman la capa fibrilar. Luego penetran a la capa glomerular, forman los glomérulos y establecen contactos sinápticos con las dendritas terminales "arborizaciones glomerulares" de las neuronas cuyos somas se localizan en la capa glomerular y en la capa plexiforme externa. La mayoría de las neuronas cuyos axones forman el conjunto de eferencias del BOA, también llamadas neuronas de segundo orden del sistema vomeronasal, se localizan en la capa plexiforme externa y algunas pocas de la capa glomerular. Las neuronas de segundo orden cuyo soma se localiza en la capa plexiforme externa han sido llamadas células en penacho (Cajal, 1890), células mitrales, células estrelladas o células mitral/penacho (Takami y Graziadei, 1991).

4.4 Conexiones Nerviosas del Sistema Vomeronasal

Un estudio de las conexiones de este sistema ha sido realizado en roedores por Segovia y Guillamón en 1993. Los finos axones que parten de las células receptoras vomeronasales forman el nervio vomeronasal que atraviesa la Placa Cribiforme y termina en BOA. El BOA comunmente aparece como una pequeña protrusión sobre la superficie mediocaudal del Bulbo Olfatorio. La estructura interna del BOA es similar al Bulbo Olfatorio y pueden ser reconocidas las mismas 7 capas. Sin embargo, también existen algunas diferencias notables entre estas dos estructuras: Los glomérulos del BOA son más pequeños que los del Bulbo Olfatorio Principal, las células periglomerulares son menos numerosas, las células mitrales están dispersas por toda la capa plexiforme externa y las células en penacho están ausentes (Voogd et al, 1998).

El BOA se proyecta por la vía del Tracto Olfatorio Accesorio (TOA) hacia el complejo amigdalino y hacia el del Lecho núcleo de la estria terminal. El TOA inicialmente forma parte del tracto olfatorio lateral, pero a niveles más caudales se separa.

La amígdala vomeronasal comprende el núcleo del TOA y los núcleos amigdalinos cortical posteromedial y medial. La zona superficial de la amígdala corticomedial puede ser subdividida en cuatro cuadrantes. Los dos cuadrantes laterales representan partes de los núcleos corticales y son designados como núcleos corticales anterior (C1) y posterolateral (C2); el cuadrante anteromedial comprende el núcleo amigdalino medial (M), mientras que el cuadrante posteromedial contiene una tercer parte del núcleo cortical, designado como núcleo cortical posteromedial (C3). Scaglia y Winans (1975) estudiaron las proyecciones eferentes del Bulbo Olfatorio y el BOA en comadreja, rata y conejo. Ellos demostraron que lesiones en esas dos formaciones bulbares causan degeneración terminal en dos zonas diferentes y no solapadas del complejo amigdalino; el Bulbo

Olfatorio principal proyecta hacia C1 y C2, mientras que las eferencias del BOA terminan exclusivamente en el núcleo del TOA, en M y en C3. Debido a estas diferencias en las conexiones, C1 y C2 juntas son designadas como la amígdala olfatoria, mientras que el núcleo del TOA, M y C3 están referidas a la amígdala vomeronasal. Además de la distribución en la región amigdalino corticomedial, el TOA entra en la estría terminal para terminar en una subdivisión medial con células pequeñas del núcleo del Lecho de la estría terminal (Voogd et al, 1998).

Estudios en los que se utilizaron aminoácidos tritiados como marcadores (Kevetter y Winans, 1981) demostraron que C3 presenta proyecciones ipsilaterales hacia M, el núcleo del TOA y el BOA, y que fibras adicionales de C3 terminan bilateralmente en la subdivisión medial del núcleo del Lecho de la estría terminal y contralateral en C3. De M salen proyecciones ipsilaterales a los núcleos del TOA y C3 y bilaterales a la subdivisión medial del núcleo del Lecho de la estría terminal. Proyecciones eferentes de M terminan en un área que incluye partes del área preóptica medial, el núcleo hipotalámico anterior y los núcleos hipotalámicos premilares ventral y ventromedial (Voogd et al, 1998).

Estos núcleos activan mecanismos en el cerebro y la médula espinal que desatan el comportamiento reproductivo (Segovia y Guillamón, 1993).

4.5 Dimorfismo Sexual en el Sistema Vomeronasal

El OVN es una estructura quimiosensorial sexualmente dimórfica cuyo desarrollo está influido por hormonas gonadales presentes durante un corto tiempo después del nacimiento (Segovia, 1986; Segovia y Guillamón, 1993). Debido a esto, se hipotetizó que el sistema vomeronasal podría ser una red sexualmente dimórfica y que el estímulo quimiosensorial transportado por un OVN sexualmente dimórfico es más relevante en el comportamiento reproductivo. Se han encontrado dimorfismos sexuales morfológicos en estructuras que reciben las aferencias vomeronasal tales como el Bulbo Olfatorio Accesorio (Segovia, 1982; Segovia, 1986; Caminero, 1989; Caminero, 1991), el Núcleo de la Estría Terminal, (Del Abril, 1988), el Núcleo del Tracto Olfatorio Accesorio (Collado, 1990), el Núcleo Amigdalino Medial (Staudt, 1976), el Área Preóptica Medial (Raisman, 1971), el Núcleo Hipotalámico Ventromedial (Dörner, 1969) y la Región Ventral del Núcleo Premamilar (Dörner, 1976).

Los esteroides gonadales inducen dimorfismo sexual en volumen y/o número de neuronas en todas las estructuras del sistema vomeronasal durante el período perinatal (Segovia y

Guillamón, 1993). Este descubrimiento lleva a proponer que el sistema vomeronasal de los mamíferos podría ser un modelo que relaciona el dimorfismo sexual en el cerebro, con el dimorfismo observado en el comportamiento y fisiología reproductiva (Segovia y Guillamón, 1993). A través de este modelo se quiere proponer que una red neural dimórfica sexualmente, mantiene y controla el comportamiento sexualmente dimórfico relacionado con la reproducción (Segovia y Guillamón, 1993).

Dimorfismo sexual en el Organo Vomeronasal.

En los estudios de identificación de dimorfismos sexuales se evaluaron varios parámetros morfométricos. Estos parámetros fueron mayores en machos que en hembras en tres aspectos (Segovia y Guillamón, 1993):

- I .- Volumen estructural.
- II .- Volumen del neuroepitelio.
- III.- Número de receptores olfatorios.

La ablación de testículos (orquidectomía) en machos y la androgenización de hembras abolían e invertían el dimorfismo sexual. Así los machos orquidectomizados no presentaban diferencias con las hembras controles pero sí diferían significativamente con los machos controles, por otro lado, las hembras androgenizadas presentaban diferencias significativas con las hembras controles, pero no con los machos controles (Segovia y Guillamón, 1993).

Un estudio simultáneo mostró que los núcleos de neuronas bipolares también eran sexualmente dimórficos. Su área era mayor en hembras que en machos, este dimorfismo también fue suprimido por medio de la orquidectomía de machos y la androgenización de las hembras. Los resultados muestran que el proceso de diferenciación sexual y la estructura del Organo Vomeronasal dependen de hormonas sexuales (Segovia y Guillamón, 1993).

Capítulo 5: Función del Organo Vomeronasal.

Se han propuesto distintas hipótesis para explicar la verdadera función del OVN. En 1811 Jacobson creyó que el vomeronasal era un órgano secretor que servía para lubricar y humectar las cavidades nasales de los animales y para disponer a estas partes para la función sensitiva. Varios investigadores han sugerido que este órgano es un receptor de olores estimulantes sexuales. (Gratiolet, 1845; Mihalkovics, 1898; Planel, 1951; Mann, 1961; Winans y Scaglia, 1970). Cajal en 1904 denominó al OVN como una región de una sensibilidad olfatoria especial y una precisión análoga a la mácula lútea de la retina. Otros autores como Broman en 1920 y Kerkhoff 1924, consideraron a este órgano como un recurso para percibir los olores provenientes de los líquidos. Negus en 1958 propuso que la función del OVN es oler la comida durante la masticación.

La función primaria más aceptada del OVN de mamíferos, es la relacionada con la reproducción por medio de la quimiorrecepción especializada de hormonas sexuales y/o sus productos derivados (Estes, 1972; Bertmar, 1981). Esto ha sido demostrado por medio de experimentos realizados en cobayos, a los cuales se le destruyó el OVN. Los machos no presentan el comportamiento de cópula y las hembras no presentan lordosis, pierden interés por el compañero y rara vez quedan preñadas (Planel, 1953). La desaferentación periférica del sistema vomeronasal produce déficits severos en el comportamiento sexual de hámsters machos y hembras (Powers y Winans, 1975; Winans y Powers, 1977). Estos autores encontraron que los efectos de la remoción o prevención de la función normal del OVN eran agudos cuando el animal no había tenido experiencia sexual previa, en cambio, si el animal ya había participado de una experiencia sexual, los efectos de la remoción del OVN eran menos dramáticos. Sin embargo, la administración de GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas,) en animales que carecían de OVN, restablece el comportamiento sexual. Por lo tanto, una cadena de eventos razonable sería: la estimulación del OVN es necesaria para liberar GnRH, la cual promueve un incremento en los niveles de hormona luteinizante (LH), la que a su vez induce el comportamiento sexual (Clancy et al, 1988; Meredith y Fernández- Fewel, 1994). Hasta aquí se demuestra la participación en la reproducción, pero cómo se estimula al OVN?. Experimentos muy sencillos se llevaron a cabo con ratas hembras anéstricas alojadas juntas en jaulas pequeñas. El oler a un macho, revertía esa situación y rápidamente inducía el estro (Johns, 1986). Estos resultados demuestran que el OVN es un órgano sensorial involucrado en la reproducción por medio de feromonas. Por otro lado, se han

propuesto otras funciones secundarias tales como: participar en el comportamiento agresivo de las madres en la defensa de las crías (Wysocki, 1987), influir sobre la gestación y la pubertad (Halpern, 1987).

Si bien la función relacionada con la reproducción está claramente demostrada, hay un consenso general entre los autores sobre la probable existencia de algunos aspectos funcionales más que quedan aún por descubrir (Døving y Trotier, 1998).

Capítulo 6: Modelos de funcionamiento del Organo Vomeronasal

Debido a que OVN es un tubo de extremo ciego, las sustancias odorantes sólo pueden ingresar a él mediante un sistema que las introduce activamente (Estes, 1972). Existen hechos sugestivos que podrían dar indicios sobre el funcionamiento de este órgano, tales como la aparición de una corriente de aire dentro de la luz del órgano. Durante la inspiración el aire penetra al OVN, a través de los conductos nasopalatinos. La estructura cartilaginosa que lo rodea, la cual le da rigidez, podría protegerlo del colapso durante la espiración (Estes, 1972).

Mantener las narinas bloqueadas y la tráquea cerrada por la epiglotis durante la inspiración, podría forzar al aire que entra a la cavidad oral, a través de los labios partidos, a que se introduzca en los ductos incisivos y así activar los receptores vomeronasales. (Estes, 1972). Cabe acotar que la aposición de los pasajes nasofaríngeos y laringeos, y una eficiente epiglotis evitan la respiración por la boca en la mayoría de los mamíferos excepto en los primates superiores (Negus, 1958).

La inhalación o exhalación a través de los ductos incisivos sacaría por aspiración los contenidos del OVN por medio de un efecto de la física de los fluidos denominado Venturi*.¹ El vacío resultante podría causar un flujo de aire dentro del órgano en la próxima respiración (Estes, 1972).

Herzfeld (1888) al principio y luego la mayoría de los investigadores (Mihalkovics, 1898; Broman, 1920; Kerkhoff, 1924; Mann, 1961; Schilling, 1970), asumieron que el agrandamiento y compresión del tejido eréctil que rodea al órgano es el mecanismo primario para la evacuación y llenado del OVN. Se sabe que la vasoconstricción de la mucosa olfatoria ocurre durante la excitación sexual, y que podría ser inducida experimentalmente por la inyección de adrenalina o ciertas hormonas sexuales (Moulton, 1967). Por otro lado, la estimulación del sistema autónomo causa vasodilatación y engrosamiento de la mucosa, que podrían ser inducidos por la inyección de histamina.

Broman (1920) sugiere que los senos venosos en la pared del órgano operan como una bomba, elevando su presión y comprimiendo al OVN, el contenido es expelido. Cuando se reduce la presión en los senos, el OVN se expande y se produce una presión negativa provocando que el líquido o el aire sea succionado dentro del lumen.

*El efecto Venturi se produce por un estrechamiento en el tubo de conducción de la corriente de aire, reduciendo la presión con la que entra el aire evitando la formación de remolinos y quedando asegurado el flujo estacionario del aire.

Es conocida la ocurrencia de una expansión y compresión del tejido eréctil del OVN. Esto que ocurre también en la mucosa nasal, podría funcionar sinérgicamente con la respiración para facilitar el movimiento de aire (Mann, 1961).

La tasa y velocidad del fluido de aire a través de los ductos incisivos podrían ser reguladas por la variación del tamaño de las aberturas en la cavidad oral (Negus, 1958; Schilling, 1970).

Los mamíferos, según la ordenación de OVN y ductos incisivos, y pueden ser categorizados en (Estes, 1972):

a.- Aquellos que tienen un OVN abiertos a los ductos pero éstos no se comunican con la boca. Por ejemplo perissodactilos, camellos, jirafas y algunos cerdos.

b.- Aquellos que tienen un OVN desconectado de los ductos pero que se abre directamente a la cavidad nasal. Por ejemplo roedores y lagomorfos.

La difusión que ocurre, ayudada por una estructura de presión, mientras las fosas nasales están cerradas y la cabeza inclinada, probablemente facilite el flujo de aire dentro de los ductos del órgano. Este método parecería ser una alternativa razonablemente eficiente para respirar a través de los ductos incisivos (Estes, 1972).

La posición del OVN en marsupiales, edentados y ciertos insectívoros sugiere que el aire inspirado nasalmente también podría ser el modo predominante de llenar su OVN aunque los ductos incisivos se abran a la boca (Estes, 1972).

El reflejo Flehmen y su significado funcional.

El reflejo Flehmen (Schneider, 1930) es una mueca distintiva, en respuesta a la orina de las hembras coespecíficas. Esta mueca (en ungulados) consiste en abrir la boca, extender y elevar la cabeza, retraer el labio sobre las narinas, fruncir la nariz y mostrar la encía. Luego siguen movimientos rápidos de lamido y de la boca.

La función principal del reflejo Flehmen sería la oclusión de las narinas externas y facilitar el funcionamiento del OVN ya que el lamido ayudaría a que los olores entren por los orificios de los ductos incisivos. Con la cabeza elevada, la fuerza de gravedad podría ayudar al fluido a entrar al vomeronasal (Estes, 1972).

Aunque esto podría facilitar el proceso de introducir feromonas al OVN, el reflejo Flehmen no es esencial. Algunas especies tienen una musculatura nasal suficientemente compleja tal que las narinas pueden ser cerradas sin recurrir a los músculos labiales (Moulton, 1967). Dichos animales no tienen la necesidad de la mueca Flehmen. Esto podría explicar su ausencia en cerdos, la mayoría de los carnívoros, primates y otros animales (Estes, 1972)

Capítulo 7. Aspectos moleculares de la comunicación feromonal vía OVN en mamíferos.

La comunicación feromonal en los mamíferos provee un rango de información social y sexual utilizando un complejo programa de emisión de señales y un sistema especialmente dedicado a la detección de esas señales, el Sistema Olfatorio Accesorio (Meredith y Fernández-Fawell, 1994). Algunas de esas señales químicas, o feromonas, activan los receptores vomeronasales. Se han sugerido varias moléculas como posibles candidatos de feromonas de mamíferos (Robertson et al, 1993). Sin embargo, los resultados más interesantes y concluyentes son aquellos que proponen que algunas proteínas actúan como feromonas (Mucignat-Caretta et al, 1995). Estas moléculas activas están presentes en la orina, secreciones sexuales y glándulas especializadas, y es posible que sean necesarias mezclas específicas más que componentes individuales para producir una respuesta comportamental dependiente de feromonas (Tirindelli et al, 1998).

7.1 Respuestas dependientes del OVN producidas por feromonas.

Las feromonas pueden ser clasificadas en dos grupos de acuerdo a la duración de acción o a sus respuestas evocadas. La liberación de feromonas actúa como atrayente o repelente e induce respuestas comportamentales relativamente rápidas, tales como actividad sexual, cuidados parentales y agresión. Se ha demostrado que el OVN participa en las siguientes respuestas:

- 1- Efecto Lee-Boot: un grupo de ratones hembras alojados en una misma caja producen una supresión o modificación de su ciclo estral (Van der Lee y Boot, 1955).
- 2- Efecto Vandenberg: el paso a la pubertad en ratones hembras jóvenes puede ser acelerado por feromonas utilizando moléculas no volátiles contenidas en la orina de machos adultos (Vandenberg, 1969).
- 3- Efecto Bruce: la presencia física o la orina de un ratón macho no conocido por la hembra, puede evitar la implantación de oocitos fertilizados en esa hembra recientemente apareada (Bruce, 1960).

- 4- Efecto Witthen: se puede inducir la sincronización del estro con orina de ratón macho en hembras que habían suprimido el estro por el efecto Lee-Boot (Witthen, 1966).

7.2 Respuestas sexuales producidas por proteínas feromonales.

Conocido el efecto Vandenberg surgió la pregunta si las proteínas actúan como feromonas, ya que en la orina del ratón macho, las proteínas más abundantes corresponden a la superfamilia de las Proteínas Urinarias Principales (MUPs), y por lo tanto podrían desempeñar la función de feromonas (Tirindelli et al, 1998). Las MUPs son lipocalinas, una superfamilia de proteínas relacionadas (Flower, 1993), algunas de las cuales se sabe que ligan y transportan ligandos hidrofóbicos. A pesar de su secuencia poco conservada, todas estas proteínas poseen un “bolsillo” modelado para albergar pequeñas moléculas lipofílicas (Bocskey, 1992). Las MUPs purificadas de la orina, aún contienen y conservan la capacidad de inducir una respuesta comportamental. Sin embargo, cuando el ligando endógeno fue removido y la proteína sola fue testada, apareció que la proteína más que su ligando volátil, fue responsable por el efecto Vandenberg (Mucignat-Caretta et al, 1995). Más sorprendente aún fue cuando se demostró que una simple MUP podía mimificar el efecto (Mucignat-Caretta et al, 1995). De esta forma se pone en evidencia que las lipocalinas funcionan no sólo como transportadores de feromonas en ratones sino que también tienen la función de modular al OVN por sí mismas.

7.3 Subclases de neuronas receptoras vomeronasales

En varios estudios se han demostrado, usando diferentes métodos, que existen dos poblaciones de neuronas quimiosensoriales en el OVN. La primera distinción de las subclases de neuroreceptores en el OVN fue realizada por Mori (1987a) usando anticuerpos monoclonales generados contra un homogenato de axones (fibras nerviosas vomeronasales). Este anticuerpo monoclonal (R4B12) marcó positivamente una subclase de fibras nerviosas vomeronasales que se proyectan a los glomérulos de la parte rostrolateral del bulbo olfatorio accesorio (BOA). Otro anticuerpo monoclonal (R5A10) reconoce una subclase

complementaria de fibras nerviosas vomeronasales que se proyectan hasta los glomérulos de la parte caudomedial del BOA. La molécula de adhesión celular olfatoria OCAM (antígeno de R4B12) se expresa en las neuronas más superficiales del epitelio sensorial y estas neuronas se proyectan hasta la parte rostral del BOA en ratones (von Campenhausen et al, 1997). Los anticuerpos monoclonales CC1 y CC6, los cuales reaccionan frente a glicolípidos, marcan neuronas receptoras conectadas a las regiones rostral y caudal del BOA, respectivamente (Schwartz y Crandall, 1991b). La lectina *Vicia villosa* agglutinin (VVA), la NADPH-diaforasa y el anticuerpo para proteína marcadora olfatoria (OMP) todas colorean la parte rostral del BOA más intensamente que la parte caudal (Shapiro et al, 1995).

Otro marcador de subpoblaciones neuronales es la proteína G. La distribución de proteínas G ha sido bien estudiada en el epitelio vomeronasal y en el BOA en una comadreja (Halpern et al, 1995) y del ratón (Berghard y Buck, 1996) utilizando técnicas inmunohistoquímicas. En el epitelio sensorial, el anticuerpo contra $G_{\alpha o}$ colorea la capa de neuronas más basal del epitelio. Estas neuronas proyectan a la parte caudal del BOA. En cambio el anticuerpo $G_{\alpha 2}$ colorea la capa de neuronas ubicada más superficialmente en el epitelio. Estas neuronas proyectan a la parte rostral del BOA.

7.4 Receptores de feromonas

Dulac y Axel (1995) aislaron una familia de aproximadamente 30 secuencias codificantes para receptores putativos (V1Rs) expresados en células receptoras vomeronasales. El análisis de las secuencias de esos genes indica que ellos forman una familia separada de proteínas con 7 dominios de transmembrana no relacionadas con los receptores expresados en el epitelio olfatorio (Buck y Axel, 1991). Los órganos olfatorio y vomeronasal utilizan entidades moleculares diferentes para transducir la señal química en actividad eléctrica, a pesar de su origen común en la placoda olfatoria (Retzius, 1894).

En 1997, tres grupos independientes descubrieron una nueva familia de aproximadamente 100 genes que codifican para una clase de molécula receptora con 7 dominios transmembrana (V2Rs) (Herrada y Dulac, 1997; Matsunami y Buck, 1997; Ryba y Tirindelli, 1997). Esta molécula tiene una secuencia similar al receptor metabotrópico de glutamato y al sensor de Ca^{++} (Masu et al, 1991), presentando una larga secuencia hidrofílica sobre ambos lados de los 7 dominios transmembrana.

Para recapitular, el receptor V1Rs se expresa en neuronas superficiales, las que además expresan $G_{\alpha i2}$, OCAM y CC1 y proyectan a la parte rostral del BOA. El receptor V2Rs se expresa en neuronas basales, las que además expresan $G_{\alpha o}$ y CC6 y proyectan a la parte caudal del BOA.

Las eferencias centrípetas de las divisiones anterior y posterior del BOA fueron recientemente estudiadas por Martínez-Marcos y Halpern (1999). En este trabajo se demuestra que las proyecciones de las divisiones rostral y caudal del BOA se superponen a lo largo de la amígdala vomeronasal. Sin embargo, sólo la división caudal proyecta a las capas internas de los núcleos amigdalinos antero-dorsal, antero-ventral y postero-ventral.

7.5 Propiedades fisiológicas de las neuronas receptoras

Desde que los estudios moleculares indicaron que los receptores están acoplados a proteína G, comenzaron los estudios para determinar qué segundo mensajero podría estar involucrado en la activación de la corriente de transducción. Las células receptoras vomeronasales no expresan canales activados por AMP cíclico (Liman y Corey, 1996). El inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) es el segundo mensajero que está aparentemente involucrado en los procesos de transducción. Esta conclusión sucede a experimentos que demuestran que la estimulación con vomeroferinas incrementa los niveles de IP3 en el OVN del hámster (Kroner et al, 1996). La incubación, con orina o fluidos seminales de membranas obtenidas de las microvellosidades del OVN, resulta en un incremento de la producción de IP3. La curva dosis-respuesta para la producción de IP3 a bifásica, con un componente dependiente de GTP a concentraciones bajas de estímulos y un incremento no específico en los niveles de IP3 con altas concentraciones de estímulos. La estimulación dependiente de GTP es reproducida por $GTP\gamma S$ y bloqueada por $GDP\beta S$ (Wekesa y Anholt, 1997). Inamura et al (1997) confirmaron estos resultados bloqueando la respuesta evocada por la orina en neuronas vomeronasales con antagonistas específicos para el IP3. El efecto exacto del IP3 no es conocido, pero se cree que podría liberar Ca^{++} de los depósitos intracelulares o tener un efecto directo sobre los canales de membrana (Døving y Trotier, 1998).

Capítulo 8: Metodología general

8.1 Obtención y mantenimiento en cautiverio de los armadillos.

Obtención de los animales.

Los animales utilizados para la realización de esta Tesis fueron capturados en campos cercanos a la localidad de Cacharí, provincia de Buenos Aires, a 250 km al Sur de la Capital Federal por la ruta nacional N° 3. Se capturaron animales adultos de ambos sexos. Las capturas eran realizadas durante cualquier época del año, por lugareños ayudados con perros entrenados para ubicar a los armadillos. Luego de la captura y para evitar daños entre los animales, se los confinaban en cajas de madera de 40 cm x 40 cm x 40 cm; de esta forma eran trasladados hasta el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

Las instalaciones que presenta nuestro Instituto en el Bioterio Central cuentan con un pasillo central que comunica a ambos lados con laboratorios, quirófano, salas de servicios, salas de cría y stock y jaulas de semicautividad; éstas últimas con comunicación directa al ambiente exterior.

Adaptación al cautiverio.

La adaptación y mantenimiento en condiciones de cautiverio de animales de uso no tradicional en la investigación es de fundamental importancia en el momento de comenzar un estudio, ya que es el principal elemento que afecta el desarrollo físico y social del animal durante la investigación. Las condiciones de mantenimiento deben ser diseñadas cuidadosamente para facilitar un buen desarrollo del animal y minimizar las variables experimentales (Nih, 1985). La adaptación y reproducción de armadillos salvajes a las condiciones del cautiverio son muy dificultosas (Wampler, 1969; Stors y Greer, 1973; Borchfield et al., 1976; Job et al., 1984). Se han ensayado diversos tipos de alimentación (Gilber y Giacometti, 1972; Meritt, 1973) y algunos autores han encontrado numerosos problemas sanitarios vinculados al proceso de adaptación (Resoagli et al., 1985; Millan et al, 1986; Ramirez y Rott, 1986; Resoagli et al, 1986).

En nuestro Instituto se logró vencer estas dificultades y se obtuvo un exitoso mantenimiento en cautiverio de peludos y mulitas. En esta última especie también se logró

la reproducción de los ejemplares durante 4 años seguidos. Parte de las experiencias sobre condiciones de cautividad y cría del peludo y la mulita fueron volcadas en Iodice y Affanni (1986; 1988), Iodice (1986) y Ferrari, et al (1997).

La adaptación del peludo constaba en un aislamiento sanitario dentro de una sala destinada a tal fin durante los primeros 30 días. Los peludos eran puestos, en forma individual, en jaulas de mampostería de 50 cm de ancho x 50 cm de profundidad x 60 cm de alto, adosadas a las paredes en doble fila horizontal. Tienen puertas y pisos hechos con barrotes de hierro, éstos últimos sobrelevados para que los animales no tomen contacto con sus deyecciones. Dicha sala posee un sistema de recambio forzado de aire. Las condiciones de luz, humedad y temperatura son las mismas que el ambiente exterior; en época invernal o de bajas temperaturas la sala es calefaccionada.

Durante este período, los animales estaban bajo la observación del Med. Vet. Omar Iodice (Prof. Princ. CONICET), responsable de la sanidad de colonia de peludos del Bioterio. Se realizaba una evaluación del estado general de los animales que consistía en controles clínicos periódicos, análisis coproparasitológicos y curación de posibles heridas que los animales podrían traer. Se procedía en forma preventiva a tratarlos con antiparasitarios externos e internos y antibióticos vitaminados (Oxitetracilina®, Lab. Holliday) para evitar las complicaciones secundarias al estrés de cautiverio. Durante este período se los adaptaba a su nuevo régimen de alimentación.

La alimentación consistía en agua *ad libitum*, la cual se renovaba diariamente, y alimento balanceado seco para perros. Siguiendo experiencias anteriores, se utilizó alimento balanceado comercial para caninos, el cual es ofrecido en un comedero de estructura suficientemente resistente (se usan baldosas de vidrio por su dureza y fácil higienización). Se utilizó alimento balanceado Pedigree Premium (Effem Productos Alimenticios, Brasil), con las siguientes características:

- Composición básica: cereales, carne fresca, harina de carne, harina de carne de pollo, caramelo, sal, grasa, suplemento vitamínico y mineral.
- Composición centesimal: humedad (máx.) 12 %; proteína bruta (mín.) 21 % (base seca); grasa bruta (mín.) 5 %; fibra bruta (máx.) 3 %; cenizas (máx.) 12 %; calcio (máx.) 3 % y fósforo (mín.) 1%.

La frecuencia de alimentación era día por medio y ocasionalmente se procedía a suplementar la dieta con vitaminas hidro y liposolubles. La limpieza de la sala y de las jaulas se realizaba también día por medio con agua a presión y desinfectante, tarea que se veía

facilitada por el hecho de que los pisos de las jaulas se encuentran sobrelevados.

Finalizada esta etapa de observación y adaptación, los animales pasan a formar parte de la colonia general, debidamente identificados.

Mantenimiento

Los animales eran trasladados a otra sala para su mantenimiento. Las jaulas eran exactamente iguales a las de adaptación y la rutina de limpieza y alimentación se conservaba con el mismo esquema. El tipo y frecuencia de alimentación es el mismo al de la etapa de adaptación. La temperatura del aire era mantenida alrededor de 20°C en época invernal y de 25°C en época de verano, con un rango aproximado de $\pm 1^\circ\text{C}$. Tanto en el período de adaptación como en el de mantenimiento el fotoperíodo era el natural, con aproximadamente 10L:14O en invierno y 14L:10O en verano. Esta sala también cuenta con un sistema de renovación forzada de aire, el cual es tomado desde el nivel del piso para evacuar los vapores de amoníaco producido por la orina de los animales.

En el aspecto sanitario los animales reciben desparasitaciones externas e internas estratégicas.

8.2 Procesamiento histológico de las muestras

Para microscopía óptica

Obtención y fijación de las muestras:

Para la obtención del material, anestesiarnos a los animales de la siguiente forma:

Inyección intramuscular de un relajante (Ketamina 50 mg/ml) en una dosis de 40 mg/kg.

Inyección intraperitoneal de un barbitúrico (Tiopental sódico 1g/10 ml) en una dosis de 60 mg/kg.

La fijación se realizó por medio de la perfusión cardíaca del animal con los líquidos fijadores, previo lavado de la sangre con solución fisiológica al 0,9 %. De esta forma evitamos la retracción celular (Pearse, 1980).

Es conocido que durante la perfusión con solución fisiológica se produce la muerte

celular; para evitar ésto, lavamos la sangre con la siguiente solución (González Aguilar y De Robertis, 1963):

Cloruro de sodio.....8 g
Sacarosa.....8 g
Glucosa.....4 g
Agua destilada.....1000 ml

Antes de comenzar la perfusión administramos intracardiamente 0,1 ml de un anticoagulante (Heparina 5000U-ml) y 0,1 ml de un vasodilatador (Nitroprusiato de sodio 2.4 %) que benefician el lavado de la sangre.

Para las técnicas de microscopía óptica utilizamos básicamente dos fijadores: Bouin. (Bancroft, 1990) y Formol salino al 10%.

Una vez extraídas las muestras, se transfieren a alcohol 70°, o a formol neutro.

Extracción de las muestras:

Para la extracción de las piezas utilizamos dos procedimientos distintos:

- Aislamiento del OVN.
- Descalcificación del hocico entero.
- Extracción de Bulbos Olfatorios.

Aislamiento del OVN:

Este procedimiento consiste en disecar al hocico bajo lupa hasta llegar al OVN y aislarlo completamente sin dejar rastro del hueso que se encuentra asociado a él.. Este método lo utilizamos principalmente para retirar las muestras que luego serían procesadas para microscopía electrónica e inmunohistoquímica.

Descalcificación del hocico:

Para descalcificar un hocico entero probamos varias metodologías distintas que se detallan a continuación:

I- Descalcificación electrolítica:

Este método emplea la electrólisis para descalcificar las secciones de hueso. Los materiales usados en esta técnica incluyen:

- un recipiente de vidrio, que contiene a la solución ácida descalcificante, compuesta por 80 ml de ácido clorhídrico concentrado, 100 ml de ácido fórmico al 90% y 1000 ml de agua destilada.

- electrodos de carbón

- la pieza ósea a descalcificar.

La sección de hueso se sujeta al electrodo positivo (ánodo), y las sales de calcio insolubles se cambian por sales ionizables, por la acción del ácido de la solución. La corriente eléctrica, proporcionada por una fuente, causa un campo eléctrico entre los electrodos, permitiendo que los iones de calcio migren rápidamente desde el espécimen (ánodo) hasta el electrodo de carbón (cátodo). Los radicales ácidos migran libremente desde el cátodo hacia el ánodo. La temperatura de la reacción es regulada entre 30° y 45°C, porque si excede el límite máximo podría causar la desintegración del espécimen (Sheehan y Hrapchak, 1980).

Este método presenta tres parámetros que pueden variar la calidad de la descalcificación, tiempo de descalcificación, temperatura de la solución descalcificante durante el tratamiento y voltaje de la fuente. Esta técnica reduce mucho el tiempo de descalcificación, pero hay que tener cuidado de no excederse en ninguno de los parámetros anteriormente mencionados, lo cual podría deteriorar rápidamente el tejido.

Para el caso específico de una cabeza entera de armadillo, sin casquete cefálico, el tiempo de descalcificación fue de 32 hs., a un voltaje promedio de 11,13 Voltios a una temperatura de 38°C.

II- Método del Citrato de Sodio y el Acido Fórmico:

Este método utiliza el fluido de Evans y Krajian como solución descalcificante (Sheehan y Hrapchak, 1980). Las soluciones consisten en:

Solución A: 50g de citrato de sodio en 250 ml de agua destilada

Solución B: 125 ml de ácido fórmico 90 % en 125 ml de agua destilada.

La solución final consiste en agregar partes iguales de cada una de las soluciones anteriores.

El ácido fórmico es considerado un agente descalcificante general que permite una

coloración satisfactoria de núcleos. Es una técnica lenta de descalcificación pero que deja al tejido en buenas condiciones.

III- Método del Acido nítrico:

Existen muchas variantes de esta técnica, sin embargo la más usada es la que utiliza al ácido nítrico al 5%, ya que no causa hinchazón de la célula y es muy efectivo (Sheehan y Hrapchak, 1980).

El principio de acción de los agentes descalcificantes ácidos (II; III), involucra a las solubilidades de las sales metálicas (Sheehan y Hrapchak, 1980). El calcio presente en los huesos está en la forma de sales de carbonatos o fosfatos, y esas sales son solamente insolubles en agua. Un ácido actúa liberando el calcio y que se combina con el anión, efectuando un intercambio iónico dado por la sal de calcio soluble.

Entonces:



Los iones de calcio liberados se mantienen en la solución descalcificante y son efectivamente removidos del hueso (Sheehan y Hrapchak, 1980).

Extracción de los Bulbos Olfatorios

Luego de la perfusión con la solución de Bouin, se abrió la calota y se extrajo el encéfalo.

Deshidratación e inclusión de las muestras.

Una vez extraídas las muestras fijadas, se deshidrataron en baños sucesivos de las siguientes soluciones:

Alcohol 70°.....14 hs.

Alcohol 96°.....9 hs.

Alcohol 100°.....16 hs.

Alcohol 100°.....2 hs.

Luego, se trasladó la pieza a una solución de partes iguales de alcohol 100° y cloroformo. Para ello, se colocó en un recipiente el alcohol 100° y luego con una pipeta se colocó el cloroformo de manera tal que quedó en el fondo del recipiente, a fin de constituir una capa exclusivamente clorofórmica.

En cuanto las piezas, que se mantenían durante algún tiempo en la interfase del alcohol y el cloroformo, descendían del todo, se las traspasaba a cloroformo puro. Allí permanecían aproximadamente 12 hs. Luego fueron pasadas a cloroformo-parafina durante 6 hs.

Finalmente las muestras eran incluidas.

Se probaron varios materiales de inclusión tales como parafina, histowax y paraplast, no encontrando diferencias muy significativas entre uno y otro.

Con cualquiera de los materiales utilizados, se realizaron dos cambios de 30 min del baño de inclusión para lograr una buena penetración.

Sección de las muestras.

Las muestras incluidas o "tacos" fueron seccionadas con un micrótomos Micron HM 350 de Zeiss a distintos grosores.

Para las coloraciones de rutina, el grosor de los cortes fue de 5 micrones. Para el procesamiento del tejido nervioso se realizaron secciones de parafina de 15 micrones.

Las secciones semifinas fueron cortados con un ultramicrotomo Sorbal MT2 en cortes de 1 micrón.

Adhesión de las secciones.

Los cortes fueron adheridos a los portaobjetos utilizando la técnica del alumbre de cromo-gelatina (Pappas, 1971).

Los portaobjetos, primero se lavaron durante 12 h en solución sulfocrómica. Luego se dejaron en agua corriente 4 hs., seguido de 2 hs. de agua destilada.

Luego se colocaron durante 2-3 segundos en una solución de Gelatina preparada de la siguiente forma:

A 100 ml de agua destilada caliente se le agrega 1 gr de gelatina (Merck) y 0,05 gr de sulfato potásico de cromo, se enfría esta solución y se la filtra.

Luego de pasar el portaobjetos por la solución, se dejan secar verticalmente en un lugar libre de polvo durante una noche y se los guarda en cajas cerradas hasta el momento de usarlos.

Técnicas de tinción.

Se utilizaron técnicas histológicas rutinarias como Hematoxilina y Eosina y Tricrómico de Masson que sirvieron para caracterizar a grandes rasgos el sistema vomeronasal.

Para Microscopía Electrónica

Utilizamos 12 animales adultos de *Chaetophractus villosus* de ambos sexos. Bajo anestesia, antes de la perfusión, se expuso el corazón y se le inyectó intracardiamente 0.5 ml de Heparina-5000U/ml- (anticoagulante) y 0.5 ml de Nitroprusiato de sodio al 2.4% (vasodilatador). Los órganos del animal fueron fijados mediante perfusión vía aorta, con dos litros de solución fisiológica modificada (0.8% NaCl, 0.8% de sacarosa, 0.4% de glucosa) seguida de dos litros de glutaraldehído al 2% (Merck) como fijador, en buffer cacodilato 0.1 M. (pH 7.2) (Sigma). El OVN fue disecado bajo fijador frío y refijado en el mismo fijador durante 4 hs. a 4°C. Los tejidos luego de la fijación permanecieron durante toda la noche en el mismo buffer con el agregado de sacarosa 0.2 M. Luego de tres lavados de 5 minutos en el mismo buffer, postfijamos durante 1 hora en OsO₄ en el mismo buffer. Posteriormente lavamos de la misma forma que en el paso anterior; deshidratamos mediante series crecientes de etanol; aclaramos en acetona, y luego infiltramos a las muestras en araldita. Secciones semifinas (1 µm) y ultrafinas (0,07 µm, oro pálido) fueron obtenidas mediante el uso de navajas de vidrio utilizando un ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B. Las secciones semifinas fueron coloreadas con azul de Toluidina. Las secciones ultrafinas fueron montadas sobre grillas de 200 Mesh y teñidas con acetato de uranilo al 1% en etanol al 70% y con Citrato de plomo de Reynolds. Las secciones fueron analizadas en un microscopio electrónico Zeiss M-109 Turbo (LANAIS-MIE, Facultad de Medicina, UBA).

Parte 3: Aportes originales de la presente Tesis.

Capítulo 9: Estructura y ultraestructura del Órgano Vomeronasal de *Chaetophractus villosus*.

Este capítulo incluye material que fue publicado en Journal of Anatomy (Carmanchahi et al, 1999 a)

9.1 Introducción:

Estudios neuroanatómicos previos realizados en el Instituto de Neurociencia (INEUCI) sobre el armadillo *Chaetophractus villosus* describieron un gran desarrollo de las estructuras nasales (Ferrari, 1997), de los bulbos olfatorios principal y accesorio y de las regiones del cerebro relacionadas (Benítez et al, 1994). El único trabajo que relacionaba al OVN con los armadillos fue realizado por Broom (1897), donde solamente se reporta la presencia de este órgano en los armadillos sin hacer ninguna descripción histológica. La estructura y la ultraestructura de este órgano no fue estudiada en los armadillos ni en ningún otro integrante del orden Xenarthra (perezosos y osos hormigueros). En este capítulo de la tesis, se hace una descripción estructural y ultraestructural del OVN del armadillo *Chaetophractus villosus*.

9.2 Posición y morfología del OVN

El OVN de *Chaetophractus villosus* es una estructura par situada sobre el hueso vomeriano del paladar, en el piso de la cavidad nasal. Cada órgano aparece como un cilindro hueco, ubicado bilateralmente en la base del septo nasal (Figura 1). El tamaño de cada OVN fue de 18 ± 0.41 mm E.S. (n=8). Rostralmente se comunica con la cavidad nasal a través de un conducto, el canal incisivo (Figura 2), mientras que caudalmente el tubo termina ciego. Los canales incisivos se abren por medio de un poro localizado sobre el piso de la cavidad nasal aproximadamente a 1 cm en dirección caudal a la punta de la nariz. Este poro tiene una forma ovalada con un tamaño máximo anteroposterior de 2 mm. El OVN está parcialmente encerrado por el cartilago hialino vomeronasal que presenta una forma de J y aparece incompleto en la región dorsolateral (Figura 3 a). Senos venosos grandes, nervios y tejido glandular penetran en el órgano a través de esta región

(Figura 3 a). En corte transversal, el lumen del órgano, presenta una forma de medialuna con dos caras principales:

-1- una inferior interna, cóncava al lumen, de mayor espesor, donde se encuentra el epitelio sensorial vomeronasal (ES) (Figura 3 b).

-2- una superior externa, convexa al lumen, de menor espesor, revestida por un epitelio pseudoestratificado, cilíndrico y ciliado denominado epitelio no sensorial (ENS) (Figura 3 c).

El lumen del órgano es relativamente estrecho y puede contener una cantidad variada de secreción. Adicionalmente se pueden definir dos tipos de áreas de unión entre los epitelios: una dorsal y otra ventral. La dorsal está relacionada con la terminación de los conductos de las glándulas vomeronasales. Ambas áreas de unión muestran una abrupta transición entre el ES y el ENS.

9.3 Descripción microscópica

El canal incisivo que provee la comunicación del OVN con la cavidad nasal (Figura 2) está revestido por un epitelio estratificado plano. Este epitelio, caudalmente es reemplazado por los epitelios que caracterizan al OVN.

Epitelio Sensorial: El ES es un epitelio pseudoestratificado de 75 a 85 μm de altura. Contiene 3 capas celulares morfológicamente identificables: capa de células de sostén (CS), capa de neuronas receptoras vomeronasales (NRV) y células basales (CB) (Figura 3 b).

Las CS forman una capa celular conspicua y discreta en la región externa del epitelio sensorial, extendiéndose desde la membrana basal hasta la superficie epitelial. La región nuclear está situada en la extremidad apical (Figura 3 b). La superficie apical está cubierta por numerosas microvellosidades las cuales se ramifican ocasionalmente (Figuras 4 a y b). El citoplasma supranuclear contiene muchas mitocondrias tubulares, vesículas de pinocitosis, numerosas vesículas membranosas, cuerpos multivesiculares, escaso retículo endoplasmático liso y rugoso (REL y RER) y ribosomas libres (Figura 4 a). Los complejos de unión indican la íntima relación entre las NRV y las CS y entre CS vecinas (Figura 4 a). El citoplasma perinuclear contiene retículo endoplasmático liso, complejos de Golgi, microtúbulos y numerosas mitocondrias tubulares orientadas longitudinalmente (Figura 5). Los núcleos son ovalados, claros y con masas de heterocromatina periférica. También se puede observar la presencia de nucleolos (Figura 5). El

citoplasma infranuclear se adelgaza formando un proceso que se dirige hacia la región basal entre los cuerpos celulares de las NRV. Estos procesos terminan en una expansión basal que descansa sobre la membrana basal (Figura 8 a). Estas expansiones basales se unen por desmosomas y contienen mitocondrias, gránulos de lipofucsina y ribosomas libres. En esta zona también se puede observar frecuentemente sistemas concéntricos de RER (Figura 8 a).

Las NRV son células bipolares. La región nuclear usualmente está situada por debajo del nivel nuclear de las CS (Figura 3 b). El pericarion está, frecuentemente, en contacto con otra NRV o con las expansiones basales de las CS (Figura 6). Un proceso dendrítico periférico se extiende desde el cuerpo celular hacia la superficie epitelial, mientras que un axón central va hacia la lámina basal. La dendrita discurre entre los núcleos de las CS y en la región apical se expande formando una terminación redondeada que porta numerosas microvellosidades (Figuras 4 a, 5 y 7 a). Las microvellosidades son largas ($4,94 \pm 0,48 \mu\text{m}$ S.D.; $n = 5$), y pueden ramificarse (Figuras 4 a y b). Cubriendo las microvellosidades puede observarse un glicocáliz delgado. Las dendritas pueden ser identificadas fácilmente de las CS que las rodean por su citoplasma electrón claro con retículo endoplasmático liso, vesículas de pinocitosis, mitocondrias tubulares, vesículas claras pequeñas, acúmulos de centriolos y microtúbulos orientados longitudinalmente (Figuras 4 a y 5). La región apical de las dendritas muestra grupos de centriolos asociados a las raicillas estriadas, las que aparecen como paquetes estriados de filamentos, además pueden observarse los pies basales que se extienden radialmente desde el corpúsculo basal (Figura 7 a). El citoplasma supranuclear está caracterizado por un gran desarrollo del complejo de Golgi, los REL y RER, cuerpos similares a lisosomas secundarios, numerosos gránulos de lipofucsina, cuerpos multivesiculares y mitocondrias tubulares (Figura 6). El núcleo es pálido y redondo con la membrana perinuclear irregular y escasa cromatina periférica. Una masa muy grande de heterocromatina central aparece asociada a 1 o 2 nucleolos (Figuras 6 y 7 b). Tanto el citoplasma perinuclear como el infranuclear presentan abundante RER, ribosomas libres, cuerpos similares a lisosomas, numerosos gránulos de lipofucsina, cuerpos multivesiculares y mitocondrias tubulares (Figuras 6 y 8 a).

Las CBs están confinadas a una capa conspicua de células asociadas íntimamente con la membrana basal (Figura 3 b). Tienen forma irregular con su eje más largo paralelo a la lámina basal (Figura 8 a). Tanto el citoplasma como el núcleo son ligeramente electrondensos. El núcleo es ovalado o redondeado, con un fino borde de cromatina periférica y con acúmulos heterocromatínicos dispersos en el carioplasma (Figura 8 a). Los nucleolos pueden observarse frecuentemente. El citoplasma contiene ribosomas libres, vesículas, pequeños complejos de Golgi y mitocondrias (Figuras 8 a y b). A menudo también pueden observarse paquetes de tonofilamentos (Figura 8 b). Los desmosomas se encuentran entre CBs y células vecinas (Figura 8

b). Los hemidesmosomas unen a las CBs con la lámina basal (Figura 8 b). También puede observarse axones de las NRV rodeados por el citoplasma de las CB.

El ES de las áreas de unión presenta dos tipos de células basales. Uno es similar al encontrado en el resto de la capa basal del ES. El segundo, menos frecuente, presenta una forma ovalada o redondeada con un núcleo grande y escaso citoplasma. Tanto el núcleo como el citoplasma son electrón claros (Figura 9). No se pudieron observar nucleolos. El citoplasma contiene numerosos ribosomas libres y mitocondrias pero el resto de las organelas son escasas. Tampoco se pudo observar paquetes de tonofilamentos (Figura 9).

Es común observar la presencia de células plasmáticas (plasmocitos) infiltradas en el área de unión dorsal. Se observó que estas células podían presentar RER en forma no dilatada (Figura 10 a) como dilatada (Figura 10 b). Estas células están íntimamente relacionadas con el soma y las proyecciones axonales de las NRV y las expansiones basales de las CS (Figura 10 b).

Epitelio no sensorial: El ENS es un epitelio pseudoestratificado columnar con tres tipos de células: células ciliadas (CCs), células secretoras no ciliadas (SeCs) y células basales (BCs) (Figura 3 c). Entre las células epiteliales se puede observar frecuentemente una alta cantidad de neutrófilos infiltrados (Figura 3 c y 11).

Las CCs son columnares con cilias largas ($8,78 \pm 0,29 \mu\text{m}$ S.D; $n=5$). Estas células en su superficie apical, muestran microvellosidades orientadas regularmente y ramificadas (Figura 12). Las cilias están relacionadas con una fila regular de cuerpos basales. (Figuras 13 y 12). La estructura interna de la cilia muestra el arreglo típico de las cilias móviles. También pueden ser observadas estructuras accesorias tales como raicillas estriadas y piecitos basales (Figura 12). Numerosas protrusiones membranosas de diferentes tamaños y diámetros, de forma ovalada o irregular se extienden desde la membrana ciliar (Figuras 12, 13 a y b). El citoplasma apical presenta algunas mitocondrias tubulares, retículo endoplasmático liso, pequeñas vesículas, partículas de glucógeno (del tipo alfa) y centriolos (Figura 12). Los complejos de unión se hallan entre CCs y SeCs como también entre CCs vecinas (Figura 12). El citoplasma supranuclear contiene mitocondrias tubulares orientadas longitudinalmente, RER, ribosomas libres, retículo endoplasmático liso, pequeños granos de lipofucsina y complejos de Golgi. El núcleo es ovalado con un borde fino de heterocromatina periférica. El nucleolo se localiza cerca de la membrana nuclear interna (Figura 11). El citoplasma infranuclear se adelgaza y forma un proceso que se pone en contacto con las células vecinas por medio de desmosomas y llega hasta la membrana basal (Figura 11).

Las SeCs son menos frecuentes que las CCs (Figura 11). Su citoplasma es delgado y más electrodensito que las CCs (Figuras 11 y 14 a). Estas células se caracterizan por presentar gránulos secretorios en escasa cantidad pero de gran tamaño y microvellosidades en la superficie apical (Figura 14 b). A diferencia de las CCs, estas células no son ciliadas (Figuras 11 y 14 b). Las microvellosidades muestran un arreglo peculiar de partículas esféricas pequeñas espaciadas regularmente íntimamente asociadas con el glicocáliz (Figura 14 b y 15). Los complejos de unión las unen a células adyacentes (Figura 14 b). El citoplasma apical se halla invadido por abundante REL y mitocondrias. También en esta región fueron observados gránulos secretorios grandes y con una matriz clara y homogénea (Figura 14 a). Ellos están rodeados por una simple unidad de membrana (Figura 14 b). La descarga de estos gránulos secretorios puede ser descrita como un mecanismo merócrino (Figura 16). La región apical también contiene numerosas vesículas pinocíticas, centriolos, cuerpos multivesiculares, paquetes de filamentos intermedios, RER y ribosomas libres (Figuras 14 b y 16). El citoplasma supranuclear contiene un complejo de Golgi conspicuo con gránulos secretorios putativos, unas pocas cisternas de RER, ribosomas libres, gránulos de lipofucsina y mitocondrias (Figura 14 a). El núcleo es ovalado y presenta masas heterocromáticas periféricas y nucleolo (Figura 14 a). La región basal muestra ribosomas libres y mitocondrias. Las SeCs se unen a la membrana basal mediante numerosos hemidesmosomas.

Las BCs muestran las mismas características estructurales que las BCs del epitelio sensorial (Figura 11). El gran desarrollo de espacios intercelulares entre las células BC y las expansiones de las CCs y SeCs, forma el “laberinto basal”(Figuras 11 y 17). Numerosas microvellosidades se extienden desde las BCs y células adyacentes hacia estos espacios intercelulares (Figura 17). Los procesos celulares con desmosomas se interponen entre las BCs y también entre los procesos basales de las SeCs y CCs (Figura 17).

Células infiltradas con las características ultraestructurales de los neutrófilos, pueden ser frecuentemente observadas en NSE y las áreas de unión entre el SE y el NSE (Figura 11).

Lámina propia:

La lámina propia que está por debajo del ES está compuesta por tejido conectivo liso con abundante cantidad de fibras reticulares y colágeno, también se pueden observar elementos celulares como fibroblastos, macrófagos, plasmocitos, mastocitos y células leucocitarias infiltradas (mononucleares y polimorfonucleares). Además se pueden distinguir capilares fenestrados y no fenestrados, vasos linfáticos y senos vasculares pequeños. Paquetes de axones no mielínicos atraviesan esta lámina propia y convergen en la submucosa formando el nervio vomeronasal.

La lámina propia que se encuentra por debajo del ENS se caracteriza por la presencia de un tejido conectivo laxo con una gran cantidad de fibras colágenas, reticulares y menos células que en la lámina propia del ES. Los linfocitos son las células más numerosas, pero también pueden observarse unos pocos fibroblastos y células plasmáticas.

Submucosa:

La submucosa presenta un tejido conectivo laxo con fibras reticulares y colágenas, fibroblastos, células plasmáticas, macrófagos, grandes vasos sanguíneos, glándulas vomeronasales (VG) y paquetes del nervio vomeronasal. En la región donde no hay cartilago, están presentes senos vasculares de gran calibre (Figura 3 a) que comprenden de 5 a 7 capas de células musculares lisas, además pequeños senos también se distribuyen a través de la submucosa. Ambas características dan a la submucosa la apariencia de un tejido cavernoso.

Glándulas vomeronasales:

Son glándulas túbulo acinares compuestas, localizadas principalmente en la submucosa a lo largo de toda la longitud de la cara dorsal del órgano vomeronasal. Su secreción es liberada en el lumen del OVN a través de ductos que terminan en el área de unión dorsal. Los ductos secretorios están revestidos por un epitelio simple escamoso o cúbico. Las células se hallan adheridas por los típicos complejos de unión. (*zónula ocludens*, *zónula adherens* y *mácula adherens*). El lumen es circular u ovalado en sección transversal con algunas microvellosidades. Algunas células ductales contienen gránulos secretorios similares a los serosos. Estas células ductales presentan espacios intercelulares con microvellosidades en la región láterobasal. Los acinos glandulares están formados por células acinares serosas (Figura 18). A estas células las clasificamos como serosas en base a su apariencia al microscopio óptico y electrónico (Tandler, 1993; Tandler y Philips 1993). Tienen forma piramidal con un núcleo basal ovalado o redondo (Figura 18). La superficie luminal presenta en ocasiones microvellosidades. Complejos de unión unen a las células adyacentes (Figura 18). Estas células presentan todas las características estructurales de células que sintetizan proteínas para exportación. El citoplasma supranuclear contiene gránulos secretorios discretos de características serosas. Existen grandes diferencias entre los gránulos secretorios observados. Pueden ser reconocidos 4 tipos:

- 1- Gránulos con una matriz electrondensa homogénea (Figura 19 a).
- 2- Gránulos con una matriz sin estructura y homegéneamente electrondensa en la cual están suspendidas inclusiones densas (Figura 19 b).

3- Gránulos que contienen una matriz con regiones esféricas claras inmersas en un material de densidad moderadamente alta; también pueden ser observadas inclusiones lenticulares más densas que la matriz (Figura 19 c).

4- Gránulos similares al tipo 3 sin las inclusiones lenticulares densas (Figura 19 d).

La cantidad de gránulos varía de célula a célula. Algunas células tienen gran cantidad de gránulos que en ocasiones pueden llenar hasta el citoplasma basal. Otras contienen sólo unos pocos gránulos. Células secretoras sin gránulos pueden observarse frecuentemente (Figura 20). La mayoría de las células secretoras poseen gránulos del tipo 1 o 2. El mecanismo de descarga de los gránulos secretorios podría ser nuevamente descrito como merócrino (Figura 20 y 22). El Complejo de Golgi se encuentra principalmente en la región media y apical del citoplasma (Figuras 18 y 20). El Complejo de Golgi de las células secretoras con gránulos del tipo 1 está asociado con gránulos secretorios putativos grandes de baja electrondensidad (Figura 21 a). El Complejo de Golgi de células secretoras con gránulos del tipo 2 está asociado con gránulos secretorios putativos grandes de baja electrondensidad en los cuales se pueden observar inclusiones densas similares a las de los gránulos maduros (Figura 21 b). En células secretoras con gránulos del tipo 3 los gránulos secretorios putativos inmaduros asociados con el complejo de Golgi son estructuralmente similares a los gránulos secretorios maduros, pero tienen una densidad electrónica baja (Figura 21 c). Los diferentes tipos de gránulos secretorios presumiblemente maduran por acreción y compactación del material secretorio. La región infranuclear de las células secretoras presenta cisternas de RER espiraladas fuertemente empaquetadas entre los gránulos secretorios putativos inmaduros. La región láterobasal presenta espacios intercelulares con microvellosidades (Figura 22). En raras ocasiones pudieron observarse figuras mitóticas en los acinos secretorios. La superficie basal de las células acinares se pone en contacto directamente con la lámina basal, separando la célula acinar del tejido conectivo. No se observaron células mioepiteliales adyacentes a la región basal de los acinos. Se pudo observar que la región basal de células glandulares se pone en íntimo contacto con terminales nerviosas hipolemales que presentan numerosas vesículas claras y escasas vesículas de centro denso (Figura 23). Ellas están usualmente localizadas en los espacios intercelulares basolaterales. En las áreas intersticiales de las glándulas vomeronasales se pudo observar algunos capilares fenestrados y no fenestrados. También fueron frecuentemente observadas células plasmáticas en íntimo contacto con células acinares (Figura 24).

Nervio vomeronasal:

Estos nervios amielínicos están rodeados por procesos citoplasmáticos de las células de Schwann ramificados entre los axones (Figura 25). La célula de Schwann presenta un escaso citoplasma con gránulos de lipofucsina y un núcleo de forma irregular localizado centralmente en el nervio (Figura 26). Cada paquete contiene axones envueltos por una lámina basal y fibras colágenas formando el endoneuro. Las fibras colágenas se presentan orientadas longitudinalmente (Figuras 25 y 26). Los axones poseen neurofilamentos microtúbulos vesículas y mitocondrias (Figura 26). Un perineuro delgado envuelve cada fascículo de fibras nerviosas (Figuras 25 y 26). El perineuro está compuesto por una capa simple de células aplanadas caracterizadas por algunas vesículas pinocíticas. Las células perineurales se hallan rodeados por una lámina basal sobre cada lado y están en contacto con fibrillas colágenas orientadas longitudinalmente.

9.4 Discusión

El órgano vomeronasal de este armadillo se abre directamente a la cavidad nasal. Esta comunicación directa fue observada en el conejo (Negus, 1958), el cobayo (Negus, 1958), algunas especies de marsupiales (Estes, 1952), algunas especies de murciélagos (Cooper y Bhatnagar, 1976), gatos (Ciges y Sanchez, 1977), rata (Vaccarezza et.al., 1981), ratón (Taniguchi y Mochizuki, 1983), hamster (Taniguchi y Mochizuki, 1982), chinchilla (Oikawa et.al., 1994), humanos (Morán et.al., 1995) y la rata mole ciega (Zuri et. al, 1998).

El armadillo muestra un epitelio sensorial en la pared medial y un epitelio no sensorial en la pared lateral como en la mayoría de las especies. Por el contrario, el epitelio no sensorial está ausente en la marmosa común (Taniguchi et.al., 1992), humanos (Morán et.al., 1995) y la rata mole ciega (Zuri et.al., 1998).

La ultraestructura de las NVR en *Chaetophractus villosus* difiere con respecto a las neuronas receptoras de la mucosa olfatoria de este mismo animal (Ferrari et.al.,1998b). En las neuronas vomeronasales no existe protrusiones olfatorias (Knobs) con cilias. En su lugar existe una marcada protrusión redondeada sobre la superficie epitelial cubierta con microvellosidades. Esta ausencia de cilias fue reportada en algunas especies de mamíferos (Adams, 1992). Las microvellosidades son consideradas como uno de los sitios más importantes para la quimiorrecepción (Miragal et.al., 1979).

Es digno de mencionar que la porción adluminal de las dendritas del armadillo contiene grupos de centriolos, algunas mitocondrias y vesículas claras. Estos grupos de centriolos también fueron observados en el ratón (Kolnberger y Altner, 1971), la rata (Vaccarezza et al, 1981), el

conejo (Luckhaus, 1969), la musaraña elefante (Kratzing y Woodall, 1988), el murciélago (Bhatnagar et al, 1982), el perro (Adams y Wiekamp, 1984), la vaca (Adams, 1986), el caballo (Taniguchi y Mikami, 1985), y en la musaraña arborícola (Loo y Kanagasuntheram, 1972). El significado funcional preciso de estos centriolos es aún desconocido. Ellos podrían representar una fase arrestada en el desarrollo de los receptores ciliados (Loo y Kanagasuntheram, 1972) o centros organizadores de microtúbulos involucrados en el transporte dendrítico (Adams, 1992). La concentración de mitocondrias cerca de la terminación distal de las dendritas fue descrita en ovejas (Kratzing, 1971), en la musaraña arborícola y en el lemur (Loo y Kanagasuntheram, 1972). Esta concentración de mitocondrias podría implicar una alta actividad metabólica en esta región (Lewis y Dahl, 1995). Una abundante cantidad de vesículas claras también fue descrita en neuronas vomeronasales de ratón (Kolnberger y Altner, 1971), rata (Vaccarezza et al, 1981), conejo (Luckhaus, 1969), la musaraña elefante (Kratzing y Woodall, 1988), murciélagos (Bhatnagar et al, 1982), perros (Adams y Wiekamp, 1984), oveja (Kratzing, 1981), vaca (Taniguchi y Mikami, 1985; Adams, 1986) y la musaraña arborícola (Loo y Kanagasuntheram, 1972). La presencia de estas vesículas sugiere que esta región tiene una alta actividad endocítica donde los complejos ligando-receptor podrían ser internalizados (Adams, 1992; Bannister y Dodson, 1992).

A diferencia de lo encontrado en la mayoría de los mamíferos, donde los cuerpos celulares contienen mucho REL (Bannister y Dodson, 1992), el armadillo muestra numerosas cisternas de RER. Esta característica es compartida por las neuronas olfatorias (Farbman, 1992 a, b). Las células de sostén del armadillo presentan una característica peculiar que las diferencia de las encontradas en otros mamíferos. La presencia de un RER altamente desarrollado en los procesos basales en esta región podría estar relacionado con la manufactura de proteínas de membrana integral o con la exocitosis basal. Sin embargo, no se pudieron observar gránulos secretorios en esta región.

En el ES del armadillo, las células basales forman una capa distintiva que muestra las mismas características estructurales que las células basales aplanadas encontradas en el epitelio olfatorio de esta especie (Ferrari et al, 1998). También, células basales con características similares a las células basales globosas del epitelio olfatorio principal (Ferrari et al, 1998b), fueron encontradas en el epitelio sensorial cerca del área de unión. Trabajos previos identificaron una población de células en división en el área de unión, que podrían originar neuronas receptoras (Barber y Raisman, 1978). Por otro lado, en el OVN de la comadreja existe una población de células proliferantes en la región basal cerca de la lámina basal en el epitelio sensorial (Jia y

Halpern, 1998). Sin embargo, se necesitan futuros análisis para establecer cuál es el rol de ambos tipos de células basales sobre la neurogénesis en el armadillo.

La presencia de varios tipos celulares en el ENS como ha sido visto en el armadillo, también fue reportada en varios mamíferos (Kratzing, 1971 a, b; Loo y Kanagasuntheram, 1972; Ciges y Sánchez, 1977; Adams y Wiekamp, 1984; Taniguchi y Mikami, 1985; Oikawa et al, 1994). Un hallazgo interesante de este estudio es la ocurrencia de numerosas protrusiones membranosas irregulares de diferentes tamaños y diámetros sobresaliendo desde la membrana plasmática de las cilia. Esto podría ser considerado como un tipo de secreción apócrino o como un mecanismo de renovación de la membrana de la cilia. Sin embargo, el significado funcional preciso de ello se mantiene aún incierto.

Las SeCs del armadillo muestran signos claros de actividad secretora. La presencia de células no ciliadas con gránulos secretores apicales también fue demostrada en el perro (Adams y Wiekamp, 1984), el caballo y vacas (Taniguchi y Mikami, 1985) y ovejas (Kratzing, 1971b). Otra característica remarcable de las SeCs es la presencia de microvellosidades con un arreglo peculiar de partículas esféricas pequeñas regularmente espaciadas asociadas con el glucocálix. Ellas son muy similares a las “Spikes” que cubren las microvellosidades de las células de sostén en la mucosa olfatoria humana encontradas por Polyzonis y colaboradores, (1979). Su origen o función es desconocido.

Con respecto a la región basal del epitelio no sensorial, *Chaetophractus villosus* presenta espacios intercelulares unidos por desmosomas que le dan una apariencia de “laberinto basal”. Estos espacios intercelulares también fueron vistos en la región basal del epitelio en perros (Adams y Wiekamp, 1984), humanos (Morán et al, 1985) y ratas (Vaccarezza et al, 1981). Algunos autores consideran que esta región es más sensible a la osmolaridad de la solución usada durante el procesamiento de las muestras que los otros tejidos adyacentes (Adams, 1992). Nosotros consideramos que este “laberinto” no es un artificio ya que usamos el mismo tratamiento para los epitelios respiratorio y olfatorio y no observamos espacios intercelulares en la región basal de los mismos.

Elementos leucocitarios polimorfonucleares fueron comunmente encontrados en el epitelio no sensorial del armadillo. Esta característica también fue observada en la musaraña almizclera (Oikawa et al, 1993), en cepas de ratas libres de virus y anticuerpos (Getchell y Kulkarni, 1995), en lemur (Loo y Kanagasuntheram, 1972), en ratas (Breiphol et al, 1979) y en vacas (Adams, 1986). Estas células infiltradas fueron identificadas como neutrófilos en el OVN de ratas (Getchell y Kulkarni, 1995). La infiltración de inmunocitos en el ENS es muy común entre los animales que presentan un OVN encerrado en una cápsula rígida aparentemente organizado de

tal forma que el tejido cavernoso actúa como una bomba. Los neutrófilos proveen una vigilancia inmune para la presencia de patógenos que ingresa desde la cavidad nasal hacia el OVN y pueden actuar como la primer línea de defensa en la prevención de la invasión del órgano (Getchell y Kulkarni, 1995).

La arquitectura de las glándulas vomeronasales (VG) encontradas en la submucosa de *Chaetophractus villosus* fue similar a la descrita en otros mamíferos (Adams, 1992). En este armadillo sólo se encontraron acinos del tipo seroso. Este tipo de acinos también fue descrito en primates prosimios (Loo y Kanagasuntheram, 1972), conejos, cobayos, gatos, perros (Ciges y Sánchez, 1977), marsupiales (Kratzing, 1984) y ratones (Mendoza, 1986). Sin embargo, también se describieron VG mixtas, con acinos serosos y mucosos, en hámster (Taniguchi y Mochizuki, 1982), cerdo (Adams, 1992) y chinchilla (Oikawa et al, 1994).

En el armadillo se observaron cuatro tipos de gránulos secretorios. Ellos podrían reflejar diferentes estadios del ciclo secretor o la madurez de gránulos individuales. Sin embargo, esta variabilidad podría indicar la presencia de diferentes secreciones. De acuerdo con esta hipótesis, fueron observados en la proximidad de las cisternas del Golgi, gránulos secretorios inmaduros similares en textura a los diferentes tipos de gránulos descritos anteriormente. Diferentes tipos de gránulos secretorios electrondensos fueron encontrados en las VG de los marsupiales (Kratzing, 1984) y en la chinchilla (Oikawa et al, 1994). Los gránulos secretorios de las VG difieren en su patrón estructural de los gránulos descritos en las glándulas de Bowman en este armadillo (Ferrari et al, 1998b), sugiriendo un rol diferente de estas glándulas en la percepción olfatoria.

Es muy llamativa la red vascular altamente desarrollada y el vasto número de capilares fenestrados en las VG. La presencia de vasos fenestrados podrían indicar una actividad endócrina por parte de estas glándulas.

La presencia de terminales nerviosas hipolemales con vesículas claras y de centro denso contactando las células glandulares en el armadillo, sugieren la participación del sistema nervioso en la regulación de la actividad secretoria de las VG. El mismo tipo de terminales también fue observado en ratón (Mendoza y Kühnel, 1987).

Las VG fueron menos estudiadas que la mucosa vomeronasal. Sin embargo, las VG juegan un papel funcional importante en la actividad xenobiótica (Rama Krishna et al, 1994), en la secreción de mucus (Cooper y Bhatnagar, 1976), en la producción de posibles proteínas transportadoras de feromonas (Ohno et al, 1996) y en los procesos inmunológicos. Nosotros asignamos una importancia especial al hallazgo de células plasmáticas íntimamente asociadas tanto con el epitelio sensorial como con las VG. Se sabe que las secreciones nasales contienen inmunoglobulinas incluyendo IgA e IgM (Getchell y Getchell, 1991). Estas estructuras (epitelio

sensorial y VG) por lo tanto, podrían representar sitios de secreción inmune hacia el lumen del órgano vomeronasal.

Las características histológicas y estructurales del órgano vomeronasal de *Chaetophractus villosus* indican que esta estructura sensorial es activamente funcional en esta especie. Estos hallazgos y la presencia de una mucosa olfatoria altamente desarrollada (Ferrari et al, 1998b) sugieren que los armadillos poseen un agudo sentido del olfato.

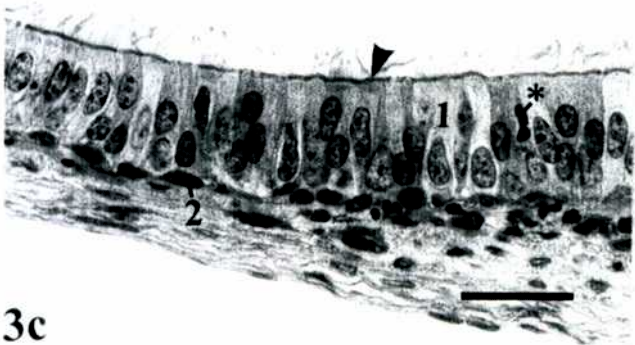
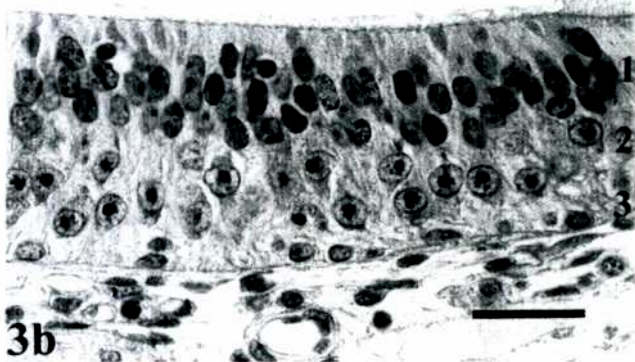
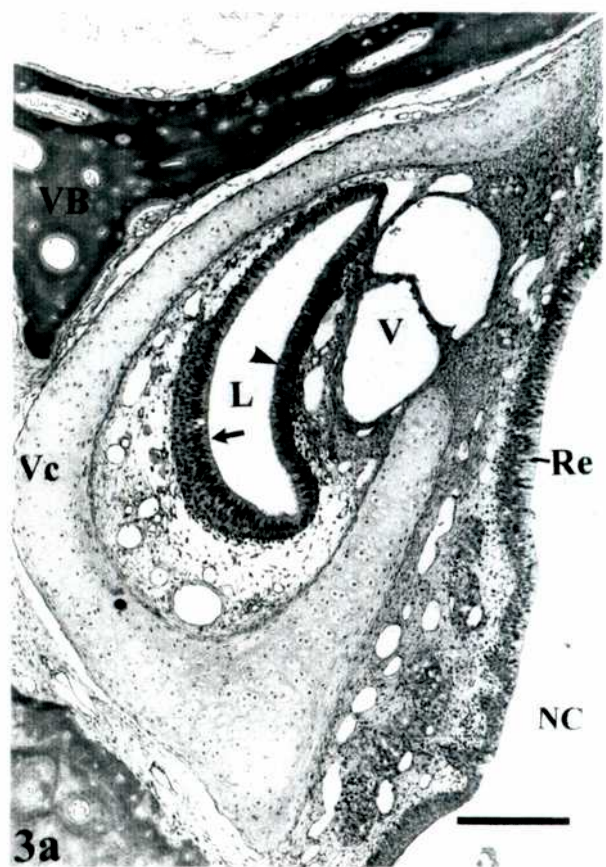
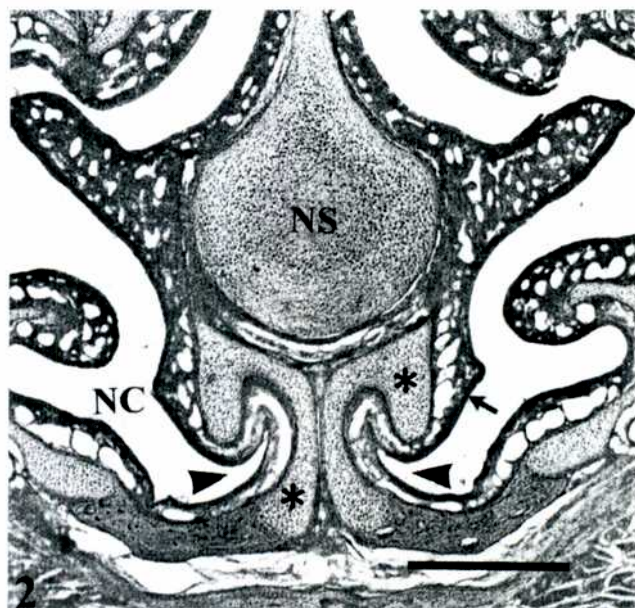
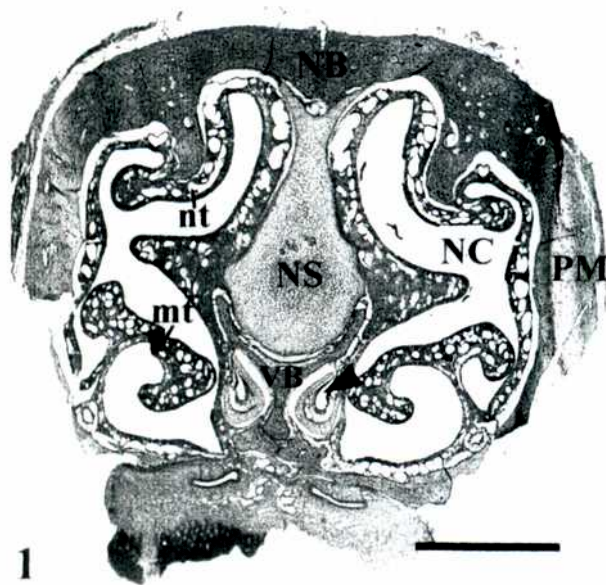


Figura 1: Vista de baja magnificación de una sección transversal de la cavidad nasal de *Chaetophractus villosus*. Mt, Maxiloturbinal; NB, Hueso nasal; NC, Cavidad nasal; NS, Septo nasal; nt, nasoturbinal; PM, Premaxilar; VB, hueso vómer. ► Organó vomeronasal. Barra, 2,5mm.

Figura 2: Vista de baja magnificación mostrando la terminación rostral del OVN y su comunicación con la cavidad nasal (►). NC, Cavidad nasal; NS, septo nasal; * Cartílago vomeronasal; flecha, Epitelio respiratorio. Barra, 1,5mm.

Figura 3: (a) Sección transversal de la región media del OVN de *Chaetophractus villosus*. Tricómico de Masson. L, Lumen del OVN; NC, Cavidad nasal; Re, Epitelio respiratorio; VB, Hueso vómer; Vc, cartílago vomeronasal; V, Seno vascular grande; Flecha, Epitelio sensorial; ► Epitelio no sensorial. Barra, 200µm. (b) Epitelio sensorial vomeronasal con tres capas distinguibles: 1, Células de soporte; 2, Neuronas receptoras vomeronasales; 3, Células basales. Hematoxilina-eosina. Barra, 30µm. (c) Epitelio no sensorial vomeronasal. A nivel del microscopio óptico, sólo se pueden observar las células ciliadas (1) y las células basales (2). En esta fotografía puede notarse la línea conspicua de cuerpos basales (►) y células infiltradas (*) en el epitelio. Hematoxilina-eosina. Barra, 30µm.

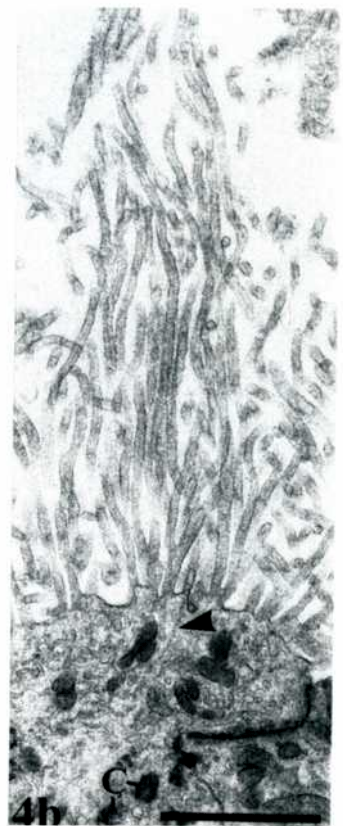
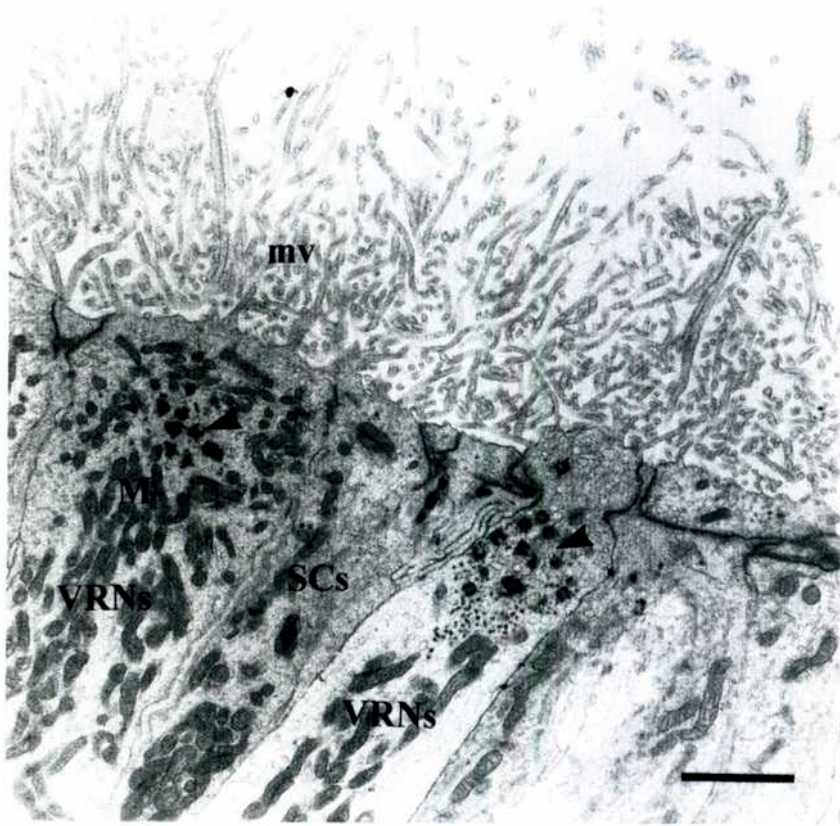


Figura 4: (a) Región apical del epitelio sensorial de *Chaetophractus villosus* mostrando las neuronas receptoras vomeronasales (VRNs) entre las células de soporte (SCs); mv, Microvellosidades; M, Mitocondrias. Nótese las microvellosidades largas sobre la superficie libre de ambos tipos celulares y las masas de centriolos (►) en la VRNs. Barra, 0,7µm. (b) Terminación distal de la dendrita de la VRN. En esta fotografía pueden ser observadas microvellosidades ramificadas y no ramificadas, con el centro fibrilar (►) extendiéndose hacia adentro del citoplasma apical. C, Centríolos. Barra, 0,7µm.

Figura 5: Región nuclear de las células de soporte (SCs) con dendritas (D) corriendo entre ellas. Las dendritas son fácilmente distinguibles de las SCs que las rodean debido a su citoplasma electronclaro. ► Nucleolo. Barra, 0,2µm.

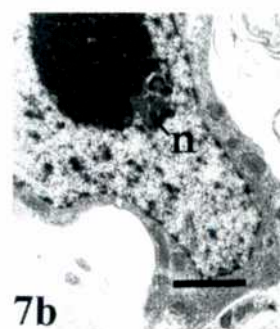
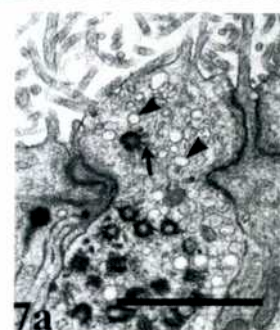
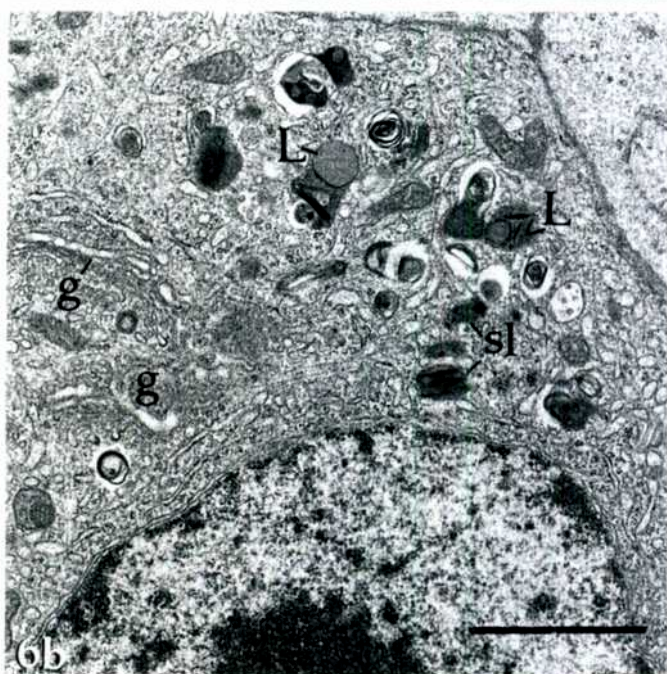
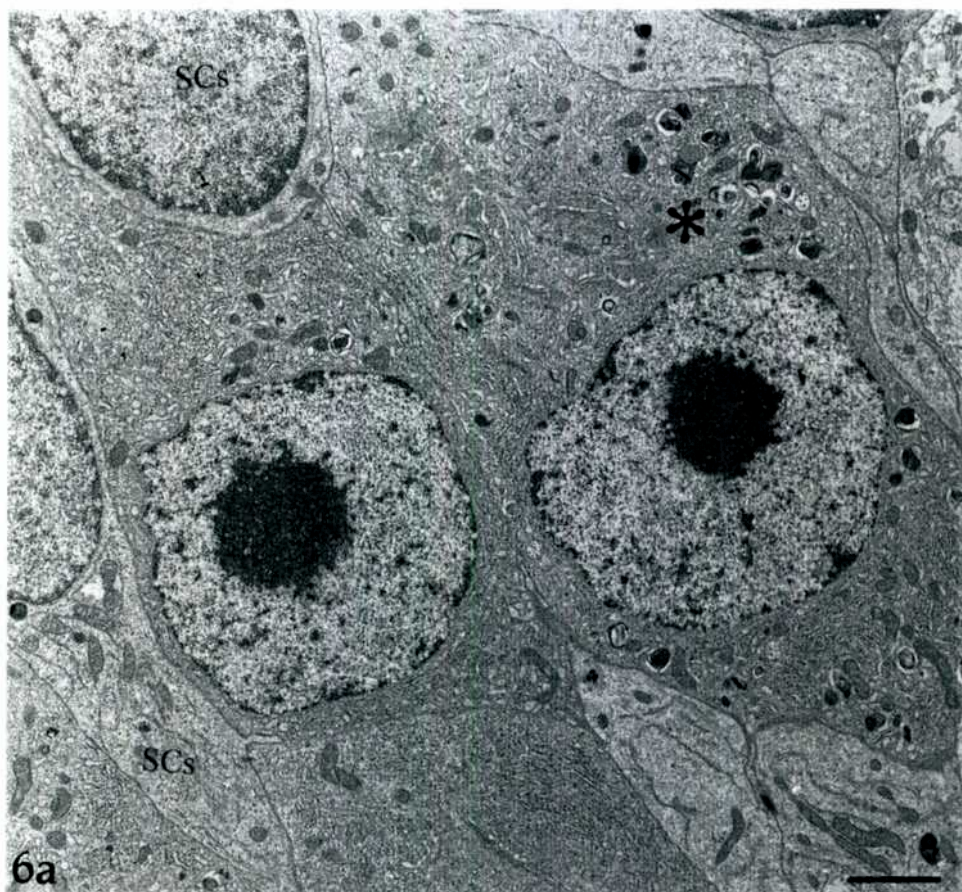


Figura 6: (a) Sección longitudinal incluyendo el soma de dos neuronas receptoras vomeronasales, el núcleo de la neurona se caracteriza por una masa heterocromatínica central grande y escasa cromatina periférica. El citoplasma perinuclear contiene una gran cantidad de RER, cuerpos similares a lisosomas secundarios y gránulos de lipofucsina. SCs, Células de soporte. Barra 0.7µm. (b) Detalle del citoplasma supranuclear de la neurona marcada con un * en la figura 6a, mostrando varios complejos de Golgi (g), RER, cisternas dispersas de REL; sl, Cuerpos similares a lisosomas secundarios, L, gránulos de lipofucsina. Barra, 0.7µm.

Figura 7: (a) Detalle de un proceso dendrítico de la VRNs con vesículas claras pequeñas (►) y centriolos con los piecillos basales (flecha). Barra, 0,7µm. (b) Detalle del núcleo de una VRN con una masa central de heterocromatina asociada con el nucleolo (n). Barra, 0,2µm.

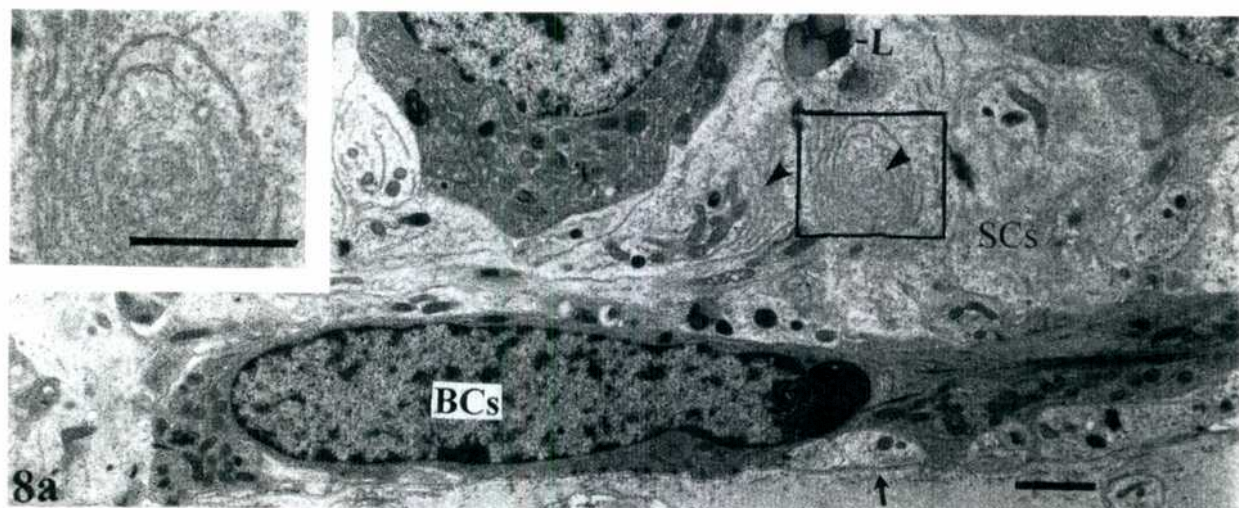
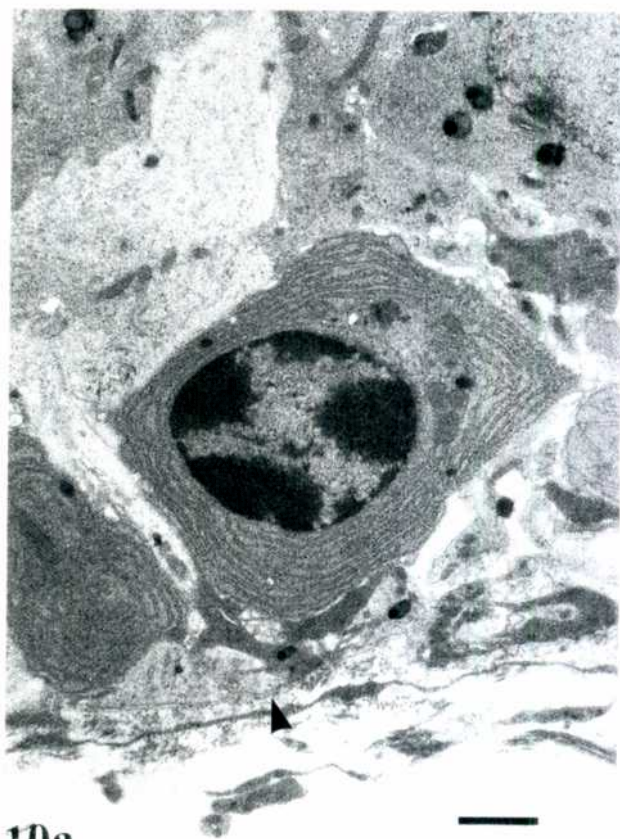
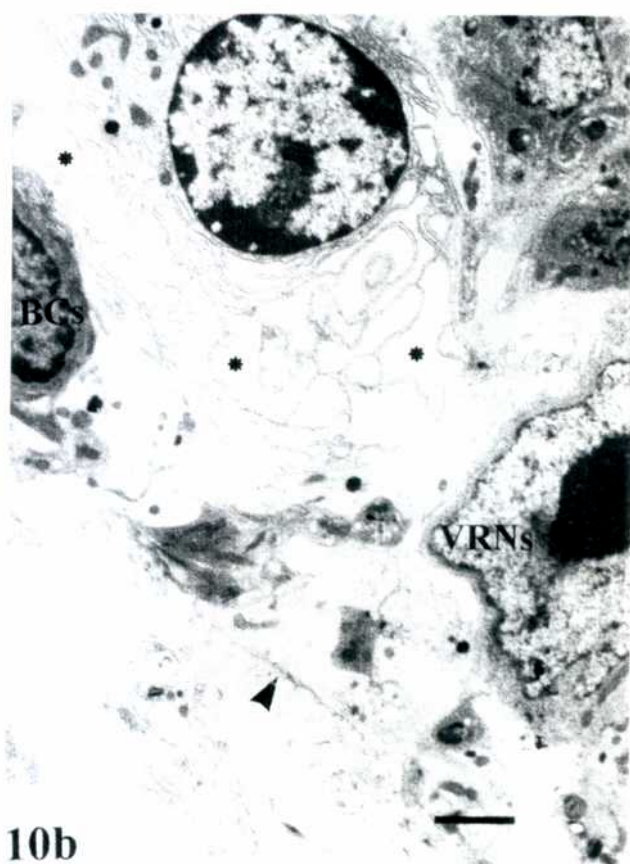


Figura 8: (a) Región basal del epitelio sensorial. Las células basales aplanadas (BCs) están en contacto con la lámina basal y se caracterizan por presentar un núcleo y un citoplasma moderadamente electrondenso. Las expansiones basales de las células de soporte (SCs), se ponen en contacto tanto con las BCs, como con la lámina basal (flecha). Nótese la presencia de cisternas concéntricas de RER (►) y gránulos de lipofucsina (L) en las expansiones basales. Barra, 0,7µm. El agregado en la región superior izquierda de esta microfotografía muestra las cisternas concéntricas de RER a mayor aumento. Barra, 0,7µm. (b) Microfotografía a gran aumento de una porción de la célula basal. El citoplasma contiene ribosomas libres, RER, mitocondrias tubulares y grandes paquetes de tonofilamentos (t). Las células basales se unen a la lámina basal por medio de hemidesmosomas (flecha). Los desmosomas se encuentran presentes entre BCs y células vecinas (►). Barra, 0,7µm.

Figura 9: Región basal del epitelio sensorial en el área de unión. Nótese la presencia de dos tipos de células basales. El tipo I está caracterizado por un núcleo y un citoplasma moderadamente electrondenso, por el contrario, el tipo II se caracteriza por presentar un núcleo y un citoplasma electronclaro. Barra, 0,7µm.



10a



10b

Figura 10: Células plasmáticas infiltradas en la región basal del epitelio sensorial del área de unión. (a) Célula plasmática con RER no dilatado. Barra 0,7 μ m. (b) Célula plasmática con RER dilatado (*). VRNs , neuronas receptoras vomeronasales; BCs, Células basales; ►, membrana basal. Barra, 0,7 μ m.

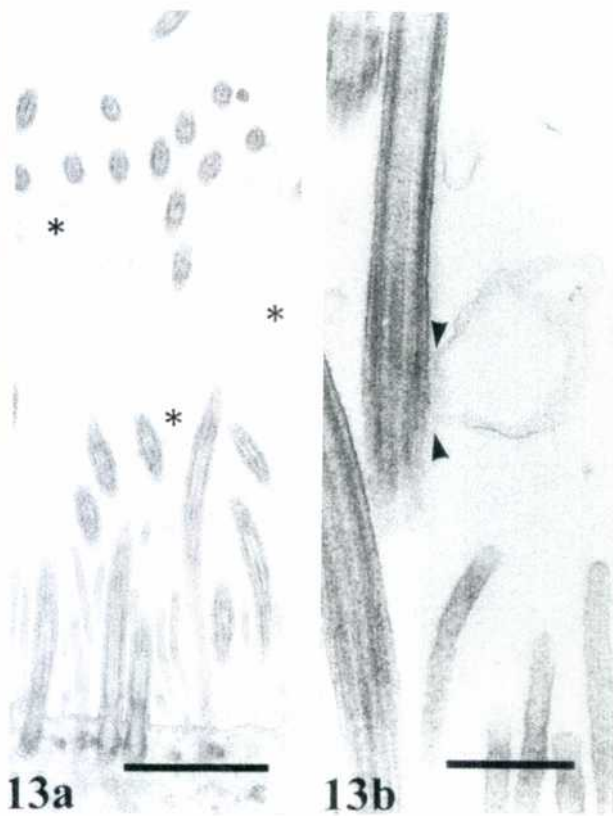
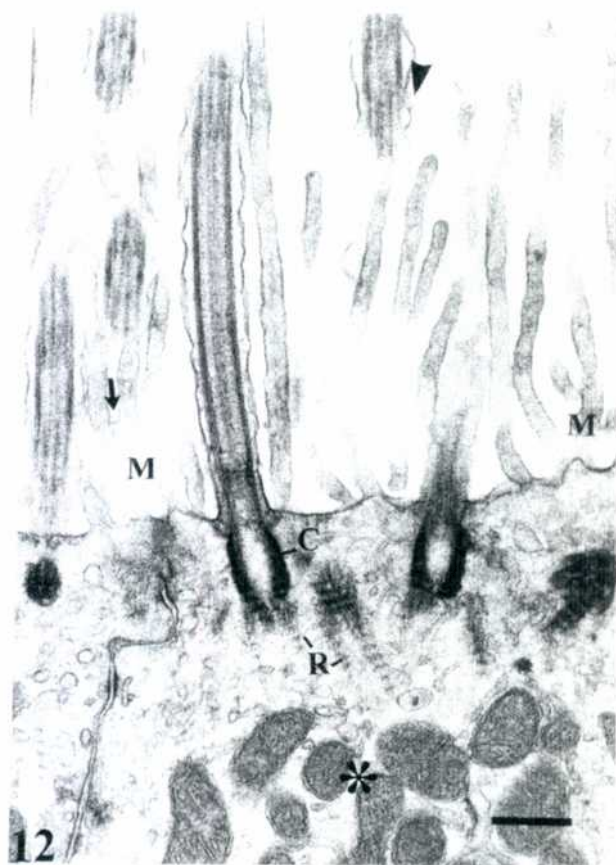
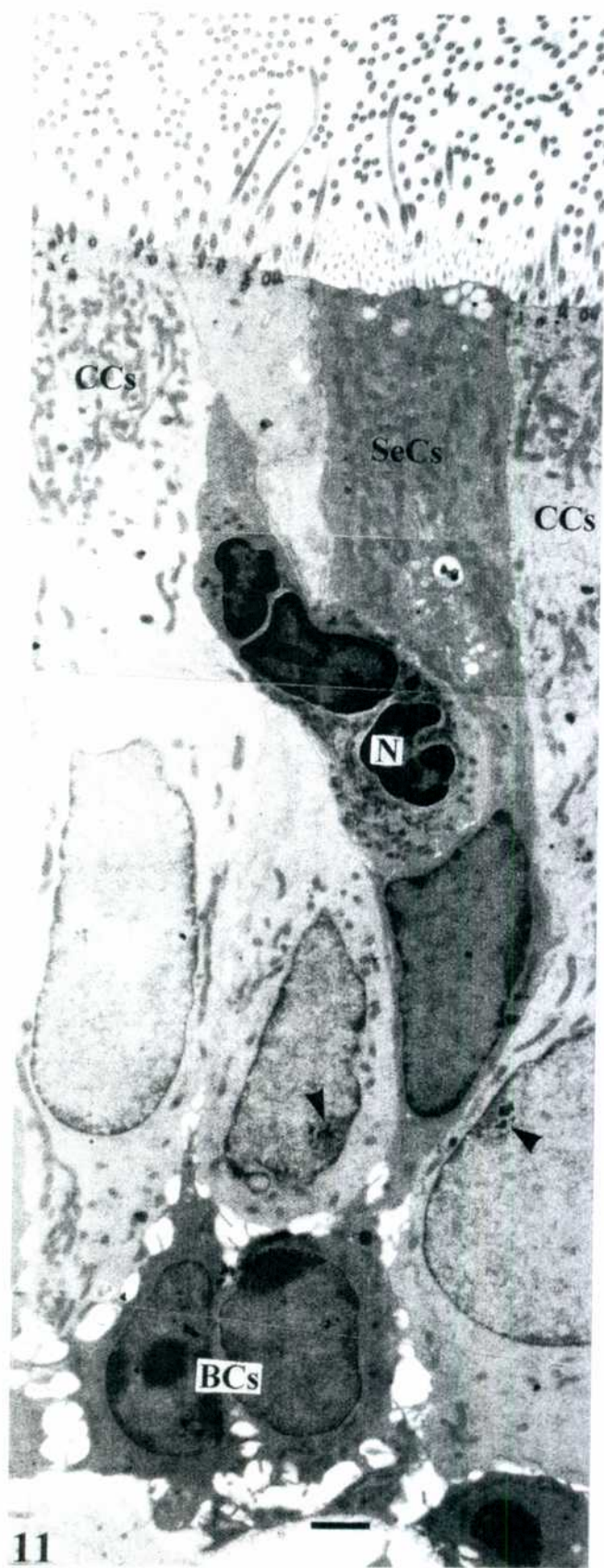


Figura 11: Epitelio no sensorial del OVN de *Chaetophractus villosus* mostrando células ciliadas (CCs), células secretoras no ciliadas (SeCs), células basales (BCs) y neutrófilos infiltrados (N). Nótese los espacios intercelulares formando un “laberinto basal” en la región basal. ►, Nucleolo de las CCs. Barra, 0,7µm.

Figura 12: Detalle de la terminación distal de dos células ciliadas del epitelio no sensorial. La cilia exhibe cuerpos basales (C) y raicillas estriadas (R). M, Microvellosidades; ►, protrusión membranosa de la cilia, flecha, Microvellosidad ramificada; *, acumulación apical de mitocondrias tubulares. Barra, 0,7µm.

Figura 13: (a) Detalle de la superficie apical de una célula ciliada. Se puede observar numerosos cuerpos membranosos de forma irregular u ovalados (*). Barra, 0,7µm. (b) En esta microfotografía puede observarse una protrusión membranosa grande que se extiende desde la cilia (►). Barra, 0,2µm.

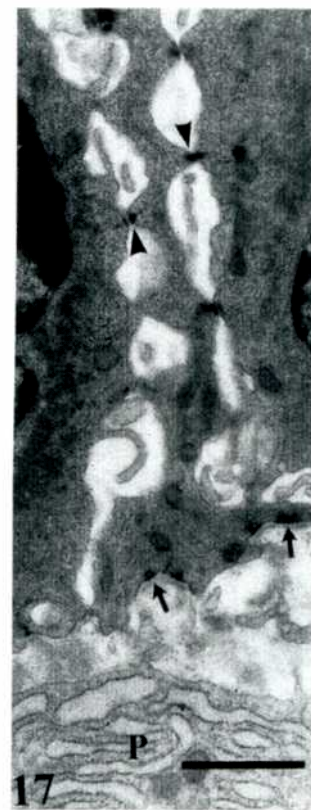
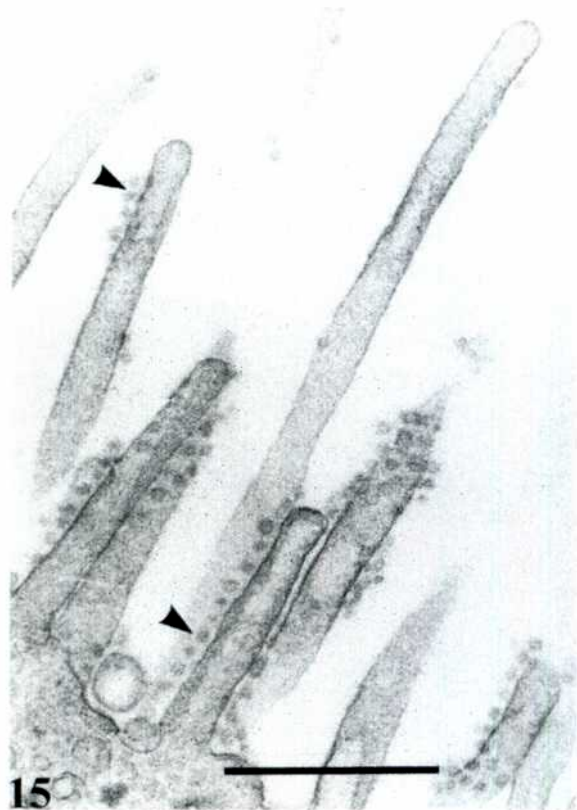
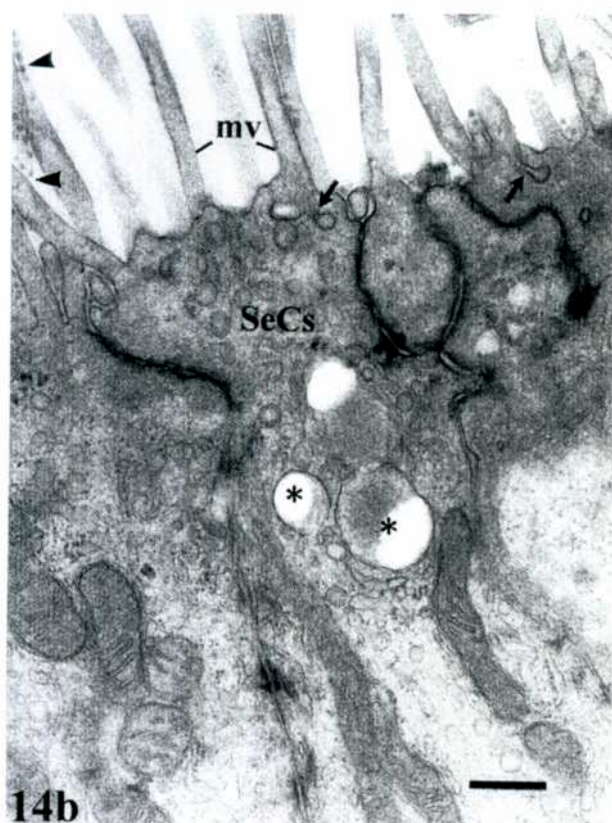
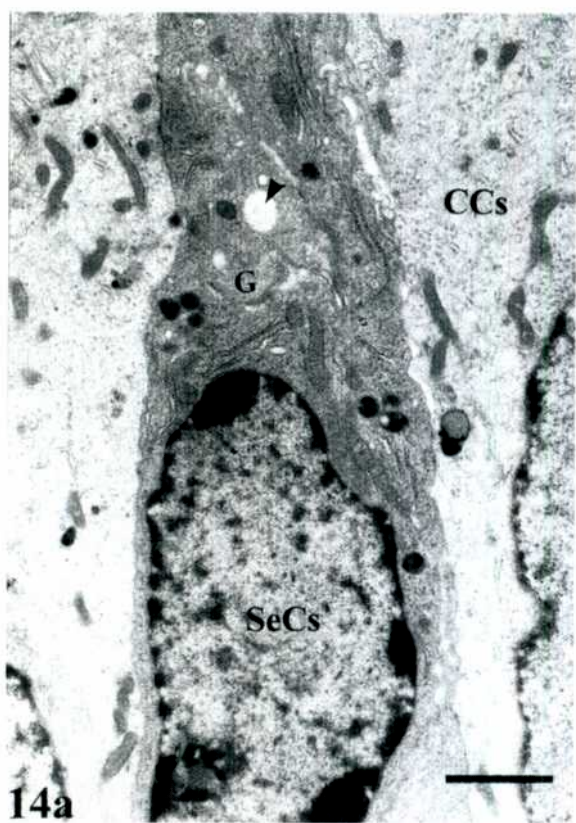


Figura 14: (a) Región supranuclear de la célula secretora no ciliada (SeCs). Su citoplasma es más electrondenso que el de las células ciliadas (CCs). Esta célula contiene complejos de Golgi (G) asociados con gránulos secretorios putativos (►), cisternas paralelas de RER, mitocondrias y gránulos de lipofucsina. Barra, 0,7µm. (b) Región apical de una célula secretora no ciliada (SeCs) presentando numerosas vellosidades (mv). Nótese que las microvellosidades están parcialmente cubiertas por partículas esféricas pequeñas (►). También pueden observarse gránulos secretorios (*) y vesículas pinocíticas pequeñas (flecha). Barra, 1,4µm.

Figura 15: Detalle de la microvellosidad de la célula secretora no ciliada. Las ► marcan las partículas igualmente espaciadas presentes sobre la superficie de la microvellosidad. Barra 0,2µm.

Figura 16: Detalle de la región apical de la célula secretora no ciliada en proceso de descarga de un gránulo. Barra 0,2µm.

Figura 17: Región basal del epitelio no sensorial. Las células basales proyectan procesos citoplasmáticos hacia el espacio intercelular. Nótese la presencia de desmosomas entre ellos (►). P, célula plasmática en la lámina propia; flecha, hemidesmosoma unido a la lámina basal. Barra 0,2µm.

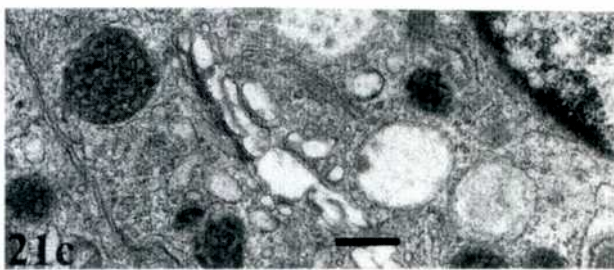
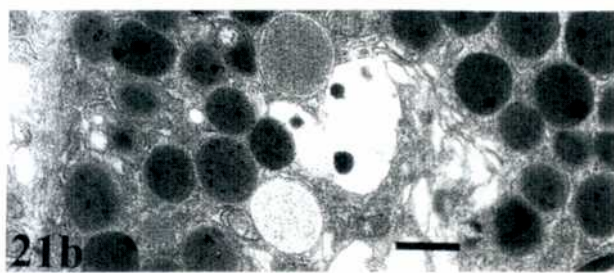
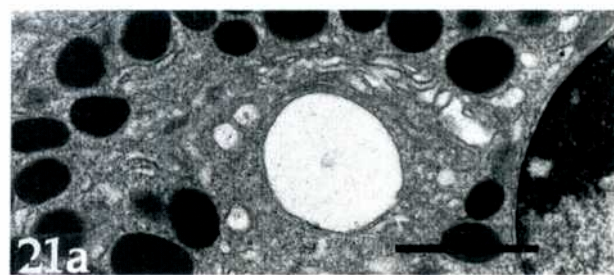
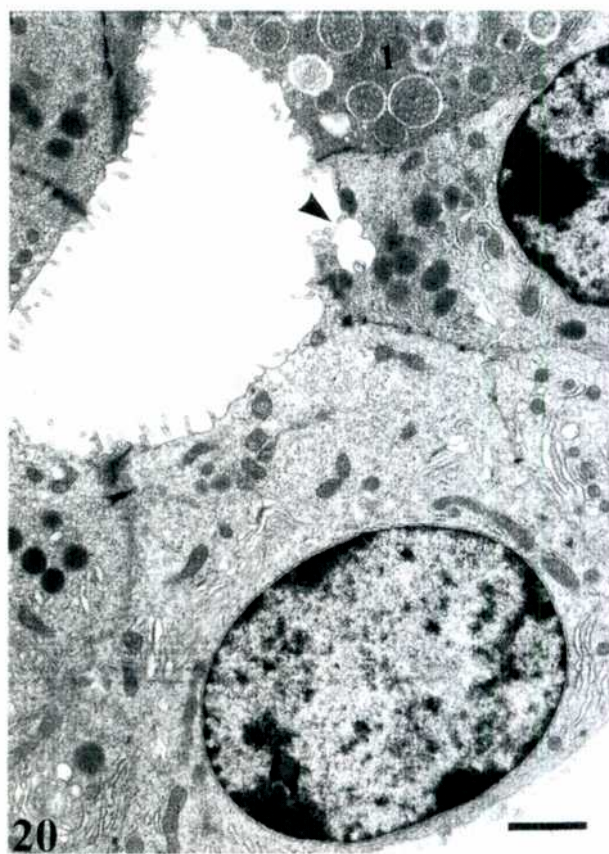
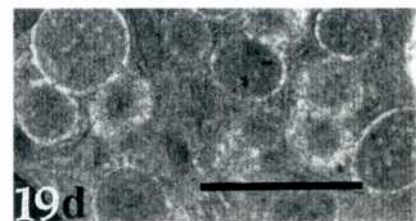
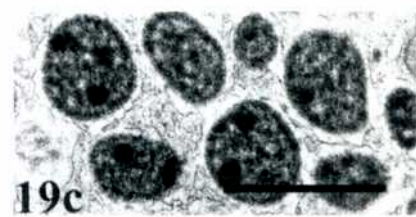
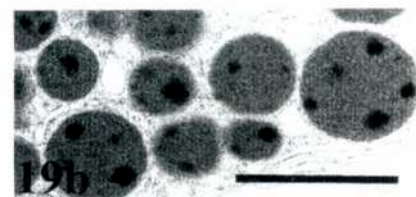
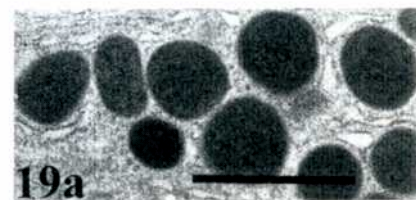
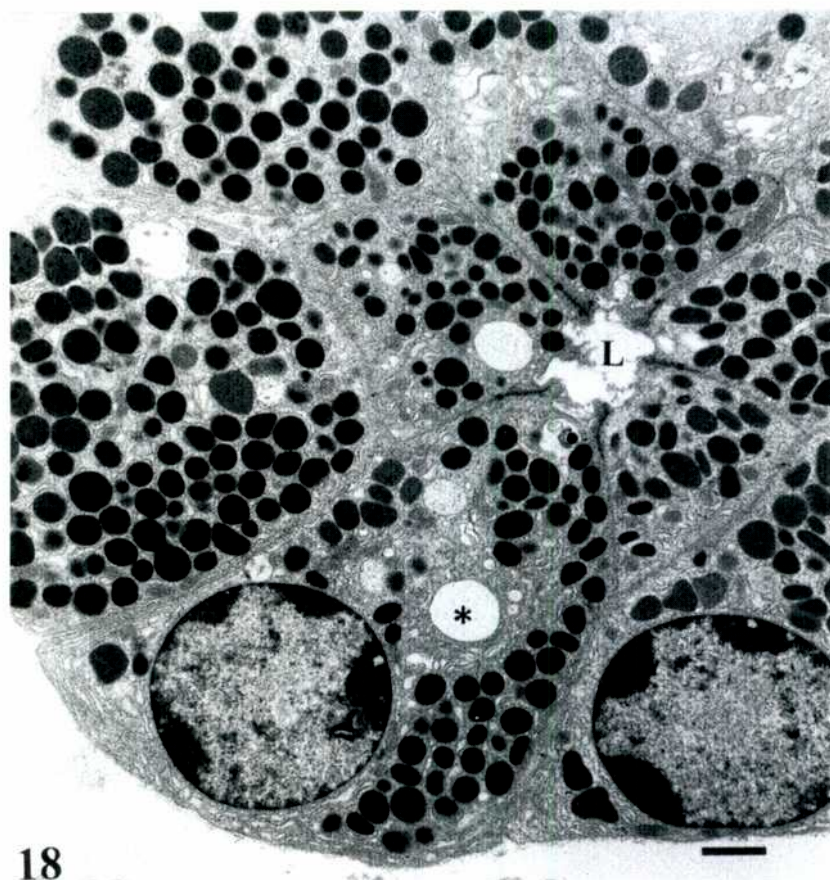


Figura 18: Las células secretoras que revisten los acinos secretores túbuloacinares están caracterizadas por presentar un núcleo redondo localizado basalmente y numerosos gránulos serosos electrondenso. Se pueden observar gránulos secretores inmaduros putativos localizados cerca del complejo de Golgi (*). L, lumen. Barra, 0,7 μ m.

Figura 19: Tipos de gránulos secretores serosos encontrados en la glándula vomeronasal. (a) Gránulo secretor del tipo I. Barra, 0,7 μ m. (b) Gránulo secretor del tipo II. Barra, 0,7 μ m. (c) Gránulo secretor del tipo III. Barra, 0,7 μ m. (d) Gránulo secretor del tipo IV. Barra, 0,7 μ m.

Figura 20: Transición abrupta entre una célula acinar serosa y una célula que no tiene gránulos. La ► indica una invaginación producida por exocitosis. También puede observarse una célula acinar serosa con gránulos del tipo IV (1). Barra 0,7 μ m.

Figura 21: Estadíos tempranos en la formación de gránulos secretores en estrecha relación con el complejo de Golgi. Barra 0,2 μ m. (a) Gránulo putativo del tipo I inmaduro. Barra 0,2 μ m. (b) Gránulo putativo del tipo II inmaduro. Barra 0,2 μ m (c) Gránulo putativo del tipo III inmaduro. Barra 0,2 μ m.

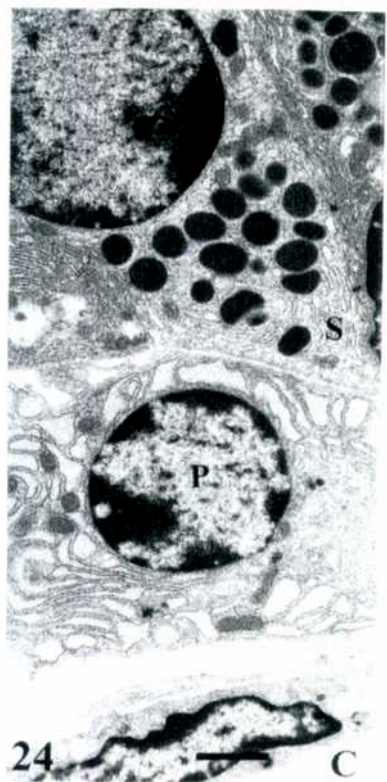
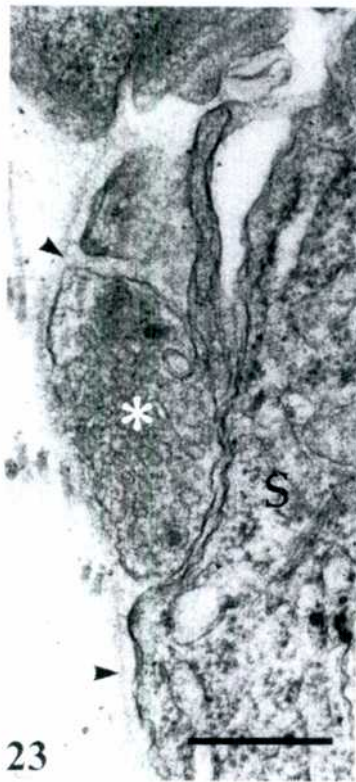
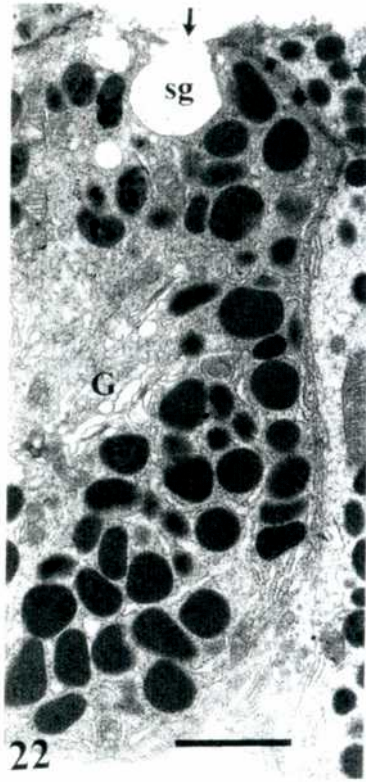


Figura 22: El gránulo secretor (sg) es secretado mediante un mecanismo merócrino (flecha). G, Complejo de Golgi. Barra, 0,7µm.

Figura 23: Terminal nerviosa hipolemal (*) conteniendo vesículas de centro denso y numerosas vesículas claras, localizadas cerca de la región basal de la célula secretora (S) de la glándula vomeronasal. ►, Lámina basal. Barra 0,2µm.

Figura 24: Región basal de la célula secretora (S) presentando una estrecha relación con una célula plasmática intersticial (P). C, Capilar. Barra, 0,7µm.

Figura 25: Sección transversal de un fascículo del nervio vomeronasal compuesto por 16 compartimentos que contienen fibras nerviosas. Cada compartimento está compuesto por axones amielínicos rodeados por células de Schwann y por fibras colágenas que forman el endoneuro (E). El perineuro consiste en una única capa de células (Pe) y fibras colágenas asociadas. Barra, 0,7µm.

Figura 26: Región restringida del nervio vomeronasal que demuestra la relación entre los procesos de la célula de Schwann y los axones vomeronasales. L, Gránulo de lipofucsina; Pe, Célula perineural aplanada; S, Núcleo de la célula de Schwann; ►, Fibras de colágeno del endoneuro. Barra, 0,7µm.

Capítulo 10. Estudio de los residuos de azúcares por medio de la detección con Lectinas.

Este capítulo incluye material que fue publicado en Journal of Anatomy (Carmanchahi et al, 1999 b).

10.1 Introducción

Se considera que la capa mucosa que recubre a los epitelios del OVN juega un papel muy importante en el acceso de las moléculas estimulantes de las neuronas receptoras y que podría afectar el umbral de reconocimiento molecular (Bal y Anholt, 1993). El glicocáliz es también considerado como un sitio de interacción aire-mucosa. Este representa la barrera final entre las membranas plasmáticas de las células de los epitelios y el medio externo, mientras que además actúa como un “filtro molecular” que regula el acceso a las membranas celulares (Foster et al, 1992). Varias propiedades del mucus y el glicocáliz dependen de su contenido de glicoconjugados (GCs). Los GCs presentes en el mucus son los determinantes más importantes de su viscosidad, su permeabilidad y su pegado de iones y bacterias (Foster et al, 1991). Se demostró que los GCs de las superficies celulares participan en la diferenciación, degeneración y regeneración celular (Breer, 1991).

Las lectinas son glicoproteínas no inmunes de origen vegetal o animal, que se pegan a los residuos carbohidratados de los GCs. Ellas son herramientas muy utilizadas en: 1- reconocimiento de componentes del mucus y el glicocáliz (Menco y Farbman, 1992; Foster et al, 1992; Bal y Anholt, 1993); 2- localización intracelular de residuos de azúcares (Ihida et al, 1991; Danguy et al, 1994); y 3- Caracterización de distintos tipos celulares (Spicer y Schulte, 1992; Acilli et al, 1992;).

Existe muy poca bibliografía acerca del patrón de pegado de lectinas en el OVN. Los trabajos existentes revelan la presencia de residuos azucarados específicos en neuronas receptoras vomeronasales y en las glándulas (Barber, 1989; Takami et al, 1994; Shapiro et al, 1995). Sin embargo, los resultados de estos autores no concuerdan. El patrón de pegado es diferente, aún en especies altamente relacionadas (Salazar y Sánchez Quinteiros, 1998).

Además, los estudios de lectinohistoquímica en mamíferos fueron realizados en pocas especies (Loo y Kanagasuntheram, 1972; Lundt et al, 1989; Taniguchi et al, 1992; Saito et al. 1994; Takami et al, 1994; Nakajima et al, 1998).

En este capítulo se identificaron y localizaron residuos azucarados específicos utilizando 21 lectinas en el OVN del armadillo *Chaetophractus villosus*. Además, se hizo un análisis comparativo con resultados obtenidos en la mucosa olfatoria de este mismo animal.

10.2 Metodología

Para realizar el estudio lectinohistoquímico se utilizaron muestras fijadas en tres soluciones diferentes: fluido de Bouin, formol neutro en buffer salino y B4-G (6% HgCl y 0,1 % de glutaraldehído en acetato de sodio al 1 %). Se considera a esta última solución como un buen fijador de tejidos que contienen GCs (Foster et al, 1991; Spicer y Schulte, 1992). Sin embargo, los resultados obtenidos fueron similares utilizando cualquiera de los tres fijadores.

Los sitios de pegado de las lectinas fueron demostrados por medio de sondas marcadas con biotina. Las secciones de parafina fueron hidratadas y lavadas en Buffer Fosfato Salino (PBS) 0.05M (pH: 7,4) por 15 minutos. Luego, los portaobjetos fueron incubados con las lectinas marcadas con biotina (Tabla 1) por 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron tratados con estreptoavidina conjugada con FITC (molécula fluorescente) 1:50 (Vector Labs. Burlingame, CA). Por último fueron lavados nuevamente en PBS y montados en PBS-glicerol. La concentración necesaria para dar una intensidad de coloración óptima fue determinada en 1:50.

Los controles para el procedimiento de coloración con lectinas incluyeron: a) omisión de la lectina del medio, b) pre-incubación de la lectina con el hidrato de carbono específico (0,2 - 0,5 M en Buffer Tris) por 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 1).

Tabla 1. Especificidad de los carbohidratos utilizados.

Lectinas	Origen	Especificidad de pegado	Azúcar inhibitorio
N-acetilglucosamina			
DSL	<i>Datura stramonium</i>	(β -1,4) N-acetilglucosamina	N- acetilglucosamina
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i>	(β -1,4) N-acetilglucosamina > β galactosa	N- acetilglucosamina
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	β -N-acetilglucosamina	α y β N- acetilglucosamina
STL	<i>Solanum tuberosum</i>	β -N-acetilglucosamina	N- acetilglucosamina
S-WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	β -N-acetilglucosamina	N- acetilglucosamina
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	N-acetilglucosamina	N- acetilglucosamina
Manosa			
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-manosa > α -glucosa	Manosa
LCA	<i>Lens culinaris</i>	α -D-manosa	Manosa
PSA	<i>Pisatum sativum</i>	α -D-manosa	Manosa
S-ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-manosa	Manosa
Galactosa/N-acetilgalactosamina			
BSL-I	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	α -N-acetilgalactosamina, α -galactosa	N-acetilgalactosamina
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	α -N-acetilgalactosamina	D-galactosa
JAC	<i>Artrocarpus integrifolia</i>	α -galactosa	D-galactosa
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	complejos oligosacáridos	D-galactosa
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	complejos oligosacáridos	D-galactosa
PNA	<i>Arachis hypogea</i>	galactosa terminal, β 1,3 N-acetilgalactosamina	D-galactosa
RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis</i>	β -galactosa, β -N-acetilgalactosamina	D-galactosa
SBA	<i>Glycine max</i>	α -N-acetilgalactosamina	N-acetilgalactosamina
SJA	<i>Sophora japonica</i>	β -N-acetilgalactosamina	α -N-acetil-D-galactosamina
VVA	<i>Vicia villosa</i>	β -N-acetilgalactosamina	N-acetilgalactosamina
Fucosa			
UEA I	<i>Ulex europaeus</i>	α -fucosa	Fucosa

10.3 Resultados

Para este estudio dividimos al epitelio sensorial (SE) en cuatro regiones: a) Complejo mucomicroviliar, compuesto por las microvellosidades de las terminales dendríticas y las neuronas receptoras vomeronasales (NRVs), las microvellosidades de las células de soporte y el componente mucoso sobre la superficie libre (definido por Rama Krishna et al., 1992), b) Neuronas receptoras vomeronasales, c) Células sustentaculares o de sostén, y d) Células basales.

El epitelio no sensorial (ENS) está compuesto por un complejo mucociliar y el epitelio columnar pseudoestratificado con tres tipos celulares: células columnares ciliadas, células columnares secretoras no ciliadas y células basales. El complejo mucociliar incluye a las cilias y microvellosidades de las células columnares y al componente mucoso sobre su superficie libre.

El patrón de pegado de lectinas en el OVN y sus estructuras asociadas están resumidas en las tablas 2 y 3.

Patrón de pegado de lectinas en el epitelio sensorial.

Complejo mucomicroviliar. La mayoría de las lectinas biotiniladas aparecen pegadas en esta región. Intensa reactividad para DSL (Figura 1 a), ECL (Figura 3), LEL (Figura 7 a), S-WGA (Figura 6), WGA (Figuras 5ª y 5b), BSL-I (Figura 2a), PHA-L (Figura 12a), PNA (Figura 13) y UEA-I (Figura 19) fue observada en todo el complejo; mientras que una moderada reactividad fue observada para STL (Figura 4a), LCA (Figura 8a), JAC (Figura 17), PHA-E (Figura 11a), RCA₁₂₀ (Figura 14a) y VVA (Figura 16). DBA mostró una fluorescencia moderada asociada con regiones con una débil fluorescencia o sin fluorescencia (Figura 18). SJA presentó una débil reacción (Figura 15). La unión entre el ES y el ENS fue demarcada fuertemente con S-WGA, WGA y UEA-I. No se obtuvo reacción con Con A, PSA, S-Con A y SBA.

Células de Soporte. Una marca intensa con UEA-I pudo observarse en las membranas celulares y el citoplasma, pero no en el núcleo (Figura 19). Una fluorescencia débil con el mismo patrón fue observada con DSL (Figura 1a), LEL (Figura 7a), STL (Figura 4a) y Con A (Figura 9). La región apical mostró una fluorescencia granular moderada BSL-I (Figura 2a) y fluorescencia débil para WGA (Figura 5a).

Neuronas Receptoras Vomeronasales. Los cuerpos de las células receptoras, pero no los núcleos mostraron una reactividad moderada para S-WGA (Figura 6), WGA (Figuras 5a y 5b) y PNA (Figura 13). Una marca granular intensa con S-WGA, WGA y PNA distribuida en la región supranuclear y procesos dendríticos proximales, pudo ser observada con una magnificación mayor. Los procesos dendríticos y los cuerpos celulares, pero no los núcleos fueron marcados fuertemente con UEA-I (Figura 19). Fluorescencia débil en los procesos dendríticos fue obtenida con STL (Figura 4a). Con A marcó fuertemente el citoplasma perinuclear, pero la marca fue más fuerte aún en la región supranuclear (Figura 9). El citoplasma supranuclear exhibió una marca puntual moderada con LCA (Figura 8a) y S-Con A (Figura 10). También se observó una marca débil con ECL (Figura 3) y RCA120 (Figura 14a). Interesantemente, BSL-I coloreó moderadamente las neuronas localizadas cerca de la capa basal (Figuras 2c y 2d).

Células Basales. Reactividad intensa en el citoplasma, pero no en el núcleo fue observada con S-WGA (Figura 6), LCA (Figura 8a) y UEA-I (Figura 19). Fluorescencia moderada fue observada con DSL (Figura 1a), LEL (Figura 7a), STL (Figura 4a), WGA (Figuras 5a y 5b), Con A (Figura 9), BSL-I (Figura 2a), JAC (Figura 17) y VVA (Figura 16).

Patrón de pegado de lectinas en el epitelio no sensorial.

Complejo mucociliar. Este complejo mostró una fuerte reacción con ECL (Figura 3), DBA (Figura 18), JAC (Figura 17), RCA₁₂₀ (Figura 14b) y SJA (Figura 15), mientras que una intensidad moderada fue observada para STL (Figura 4b), LCA (Figura 8b), PHA-E (Figura 11b) y PHA-L (Figura 12b). Una débil coloración fue obtenida con LEL (Figura 7b), BSL-I (Figura 2b), VVA (Figura 16) y UEA-I (Figura 19). El complejo mucociliar que cubre una subpoblación de células columnares ciliadas fue coloreado con LEL, BSL-I, SJA y UEA-I. PHA-E y RCA₁₂₀ aparentemente fallaron en colorear el complejo que cubre las células secretoras columnares.

Células Columnares. Una fuerte marca con DBA fue distribuida en la membrana celular y en el citoplasma, pero no en el núcleo (Figura 18). DSL coloreó fuertemente las membranas de las células ciliadas. Usando esta misma lectina, se obtuvo marca con aspecto

granular en la región supranuclear de estas células (Figura 1b). Esta lectina también coloreó los gránulos de los neutrófilos infiltrados (Figura 1b). LCA mostró una reactividad fuerte en la región supranuclear (Figura 8b). LEL (Figura 7b) y SJA (Figura 15) exhibieron reactividad moderada sólo en la región apical de las células ciliadas. Ninguna de las lectinas se unió a los gránulos secretorios de las células secretoras no ciliadas.

Células Basales. Reacción intensa se observó con DSL (Figura 1b). LEL (Figura 7b), LCA (Figura 8b) y BSL-I (Figura 8b) mostraron una moderada coloración. Débil fluorescencia se obtuvo con STL (Figura 4b).

Glándulas Vomeronasales. Las células acinares mostraron una intensa reactividad para S-WGA, WGA (Figura 5c), DSL, LEL, LCA (Figura 8c), DBA, PNA (Figura 13) y RCA₁₂₀ (Figura 14c). Además, PNA y RCA₁₂₀ también marcaron las células de los ductos. Sin embargo, se observó una moderada intensidad para ECL (Figura 3) y ConA (Figura 9), y una débil coloración con PSA, S-ConA (Figura 10) y SBA. Todas la lectinas utilizadas excepto ECL, S-WGA, Con A, S-Con A y DBA colorearon los acinos glandulares completos. Estas últimas lectinas mostraron reactividad solamente en algunas células glandulares.

Nervio Vomeronasal. Una intensa reacción fue observada con LEL, STL y WGA (Figura 5b).

Tabla 2. Pegado de Lectina en el epitelio sensorial del órgano vomeronasal *Chaetophractus villosus*.

Lectinas	Complejo	Neuronas		Células		Células
	Mucomicroviliar	Receptoras		Sustentaculares		Basales
		Dendrita	Cuerpo	Basal	Apical	
N-acetilglucosamina						
DSL	+++					++
ECL	+++		+			
LEL	+++	+	++*			++
STL	++	+				++
S-WGA	+++	++	++*			+++
WGA	+++	++*	++*			++
Manosa						
Con A			+++*			++
LCA	++		++			+++
PSA						
S-Con A						
Galactosa/N-acetil						
Galactosamina						
BSL-I	+++					++
DBA	++*					
JAC	++					
PHA-E	++					
PHA-L	+++					
PNA	+++	++*	++*			
RCA ₁₂₀	++		+			
SBA						
SJA	+					
VVA	++					++
Fucosa						
UEA-I	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ Intensa coloración.

++ Moderada coloración.

+ Débil coloración.

Sin coloración

* Ver texto

Table 3. Pegado de lectinas en el epitelio no sensorial, glándulas y nervios del órgano vomeronasal de *Chaetophractus villosus*.

Lectinas	Epitelio No Sensorial			Glándula	Nervio
	Complejo Mucociliar	Célula Sustentacular	Células Basales	Vomeronasal	Vomeronasal
N-acetilglucosamina					
DSL		+++	+++	+++	++
ECL	+++*			++*	
LEL	++	++*	++	+++	
STL	++		+		++
S-WGA				+++*	
WGA				+++	
Manosa					
Con A				++*	
LCA		+++*	++	+++	
PSA				+	
S-Con A				+*	
Galactosa/N-acetil Galactosamina					
BSL-I	++		++		
DBA	+++*	+++*		+++*	
JAC	+++				
PHA-E	++				
PHA-L	++				
PNA				+++	
RCA ₁₂₀	+++*			+++	
SBA				+	
SJA	+++*	++			
VVA	+				
Fucosa					
UEA-I	++*	-	-	-	-

+++ Intensa coloración.

++ Moderada coloración.

+ Débil coloración.

Sin coloración

* Ver texto

10.4 Discusión

De las 21 lectinas utilizadas, 17 se unieron a residuos de azúcares presentes en el complejo mucomicrovillar. Este hecho demuestra la gran complejidad de la capa mucosa en el OVN, la cual contiene N-acetilglucosamina, α -D-manosa, galactosa/N-acetilgalactosamina y α -fucosa. Este patrón complejo de pegado de lectinas fue observado en ratas (Saito et al., 1994), ratones (Lundt et al. 1989) y la marmosa común (Nakajima et al., 1998).

Por otro lado, en la mucosa olfatoria (MO) de *C. villosus*, esta capa carece de residuos de α -Fucosa y α -D-manosa (Ferrari et al., 1999). El OVN también fue marcado con ECL, BSL-I, PNA, RCA, SBA, SJA y VVA. La composición del mucus en el OVN del armadillo es, aparentemente, más compleja que el mucus de la MO (Figura 20). La composición diferente en ambas capas mucosas podría reflejar diferencias en las propiedades de las moléculas estimulantes. Esto se sugiere por la probabilidad de que la composición del mucus influya sobre el acceso de odorantes a la membrana quimiosensorial, afectando el umbral para el reconocimiento de odorantes (Bal & Anholt, 1993). Esto está de acuerdo con previos estudios que reportaron que las células receptoras olfatorias son estimuladas por químicos volátiles y que las neuronas receptoras vomeronasales son principalmente activadas por moléculas no volátiles (Wysocki et al, 1982).

En el epitelio olfatorio, WGA está asociado a glicoproteínas de membrana involucradas en mecanismos de transducción olfatoria (Breer, 1991). Similarmente, las microvellosidades de las terminales dendríticas de las NRVs contienen residuos de azúcares con N-acetilglucosamina y podrían estar asociados con mecanismos de transducción similares al olfatorio. Los carbohidratos presentes en el ES son más complejos que los hallados en el ENS. Por otro lado, PHA-E y PHA-L colorean la capa mucosa tanto del epitelio vomeronasal, como el epitelio olfatorio, pero no la capa mucosa del epitelio respiratorio (Ferrari et al, 1999) (Figura 20). Por tanto, los azúcares revelados con estas lectinas estarían presumiblemente involucrados en la transducción olfatoria.

En este armadillo el patrón de pegado de lectinas en las células de soporte vomeronasales difiere del encontrado en la mucosa olfatoria (Figura 20). La característica más importante fue la presencia de UEA-I, aparentemente específica para el ES vomeronasal, ya que no se obtuvo ninguna marca con esta lectina en la mucosa olfatoria de este mismo animal. El mismo patrón fue descrito en ratones y ratas (Lundh et al. 1989; Saito, 1994).

Las NRV mostraron una mayor variedad de azúcares terminales que las neuronas receptoras olfatorias. Los cuerpos celulares de las NRV mostraron N-acetil-glucosamina, α -D-manosa, D-galactosa/N-acetilgalactosamina y α -fucosa. Nuestros resultados están de acuerdo con los reportados por Saito et al, (1994) en ratas. Por otro lado, las NRVs de la marmosa común carecen de N-acetil-glucosamina (Nakajima et al, 1998). Con A coloreó el área supranuclear de las neuronas receptoras pero no el proceso dendrítico. Este descubrimiento demuestra un pegado transitorio de Con A, LCA, PNA, y WGA a los hidratos de carbono durante la transición del retículo endoplasmático y/o el complejo de Golgi (Danguy et al. 1994; Brinck et al. 1995). Además, nosotros hemos demostrado la presencia de esas organelas en la región supranuclear (ver capítulo 9). Adicionalmente, el OVN mostró una gran cantidad de α -Fucosa. Por el contrario, este residuo de azúcar no fue encontrado en la mucosa olfatoria de este mismo animal (Ferrari et al, 1999). La gran cantidad de α -Fucosa en las NRV y su ausencia en la MO, indica presumiblemente que este azúcar podría jugar un papel importante en la acción de las moléculas no volátiles sobre el OVN.

Nuestros resultados también indicaron una distribución diferencial de los sitios de pegado para BSL-I en las NRV. En algunos de los somas, localizados en la región cercana a la capa basal se ha observado una distribución perinuclear. La presencia de dos tipos de neuronas vomeronasales ha sido demostrada usando lectinohistoquímica por medio de la lectina VVA (Takami et al.1994) y con anticuerpos anti-proteína G (Halpern et al,1995). Tanto la VVA como la BSL-I presentan la misma especificidad de pegado para la N-acetil Galactosamina. Por lo tanto, estos resultados sugerirían la existencia de dos tipos de neuronas. Esta segregación indicaría dos posibilidades funcionales: Definir subdivisiones en el bulbo olfatorio accesorio (Shapiro et al.1995) o estadios inmaduros de NRVs (Jia y Halpern, 1998).

El pegado de lectinas en las células basales del OVN difiere del que se ha hallado en la MO de *Chaetophractus villosus* (Ferrari et al.1999). Esto indicaría que las células basales del OVN presentan una composición diferente o que poseen distintos patrones de diferenciación neuronal. A nivel ultraestructural hemos descrito dos tipos de células basales: las células basales del tipo globosas que se encuentran en el área de unión y las células basales del tipo aplanadas que se encuentran sobre la membrana basal (ver capítulo 9). Sin embargo, estos dos tipos de células basales no se diferenciaron por su patrón de pegado de lectinas.

Ninguna de las lectinas utilizadas en este estudio permitió caracterizar los gránulos secretorios en las células columnares secretorias no ciliadas reportadas en el estudio ultraestructural (ver capítulo 9). Sólo la región apical de las células ciliadas reaccionó con LEL

y SJA. LEL indica la presencia de residuos con N-acetilgalactosamina (Danguy et al.1994) la cual podría estar relacionada con el glucógeno (Spicer et al.1983). Esta característica está de acuerdo con nuestros estudios ultraestructurales que mostraron la presencia de partículas de glucógeno (tipo alfa) en la región apical de estas células (ver capítulo 9).

Las glándulas vomeronasales contienen glicoconjugados con N-acetilglucosamina, alfa-D-manosa y galactosa/N-acetilgalactosamina. Probablemente, los glicoconjugados presentes en el componente mucoso del complejo mucomicroviliar deriven primariamente de estas glándulas. Sin embargo, el patrón de pegado de lectinas de las glándulas difiere del encontrado en ambos complejos mucosos del OVN. LEL, BSL-I, JAC, PHA-L, SJA y VVA marcan el complejo mucomicroviliar pero fallaron al colorear las células acinares. Este resultado podría ser atribuido a varios factores:

Primero, modificación de carbohidratos después de ser secretados.

Segundo, los residuos de azúcares son expresados sobre las microvellosidades de las terminales dendríticas y el borde libre de las células de sostén (Nakajima et al.1998).

Tercero, la especificidad de una lectina puede ser descripta en término de pegado a monosacáridos en solución (especificidad a un azúcar libre). Sin embargo, en secciones de tejidos, las lectinas con especificidades nominalmente idénticas a un azúcar simple puede pegar un complejo de carbohidratos diferentes. Así, no sólo se accede a un azúcar predeterminado, sino también que la mezcla de azúcares adyacentes influyen sobre la afinidad de la lectina por un determinado hidrato de carbono (Leathem y Atkins,1983; Lundh et al 1989).

Cuarto, las células de sostén del epitelio sensorial pudieron contribuir al contenido de glicoconjugados de la capa mucosa, ya que la región apical de las células de soporte se colorearon con LEL y BSL-I. Sin embargo, no pudimos observar evidencias ultraestructurales de gránulos secretorios en estas células (ver capítulo 9).

Quinto, las células secretorias del ENS podrían también colaborar en la composición de la capa mucosa. Además, los estudios ultraestructurales mostraron una gran cantidad de gránulos secretorios en estas células (ver capítulo 9). Nosotros encontramos una glándula inusual con pocos acinos en la lámina propia del ES. Estos acinos fueron observados únicamente con Alcian Blue (pH 2,5), y presumiblemente participan en la producción de mucus.

N-acetilglucosamina, alfa-D-manosa, galactosa/N-acetilgalactosamina y alfa fucosa fueron reportados en glándulas vomeronasales de ratas y la marmosa común (Saito et al.1994; Nakajima, et al 1998). Sin embargo, las glándulas vomeronasales del armadillo no mostraron

residuos con alfa-fucosa. Esto podría ser útil para saber si las glándulas vomeronasales son parecidas a las glándulas de Bowman. Ambas contienen N-acetilglucosamina, alfa-D-manosa y galactosa/N-acetilgalactosamina, pero ninguna de ellas se coloreó con UEA-I que es específico para residuos con alfa -fucosa. ECL, LCA y RCA sólo colorearon las glándulas vomeronasales mientras que LEL, JAC, SBA y SJA marcaron exclusivamente las glándulas de Bowman. Las diferencias entre el patrón de pegado de lectinas en las glándulas del OVN y la MO podrían ser explicadas por la naturaleza diferente de las moléculas involucradas en los procesos perireceptores de ambos sistemas.

Los resultados sobre el borde libre, las dendritas y los cuerpos celulares muestran que el número de lectinas que se pegaron al OVN es mayor que el que se unió a la MO (Figura 20). Estos resultados muestran un patrón similar al encontrado en roedores (Saito et al.1994; Takami et al.1994), pero difieren a los resultados previos obtenidos en la marmosa común (Nakajima et al, 1998). De acuerdo con esos resultados, Nakajima et al, (1998) hipotetizó que el OVN es menos activo que el epitelio olfatorio en algunas funciones fisiológicas, incluyendo la traducción de señales asociada con residuos de azúcares. Nosotros creemos que el número de lectinas pegadas en el OVN no está necesariamente relacionado con el grado de actividad de este órgano. El significado funcional de la mayoría de los glicoconjugados es aún desconocido, a pesar de los recientes avances en la glicobiología. Sin embargo, el estudio histoquímico de los glicoconjugados del OVN puede proveer una base para investigaciones experimentales futuras.

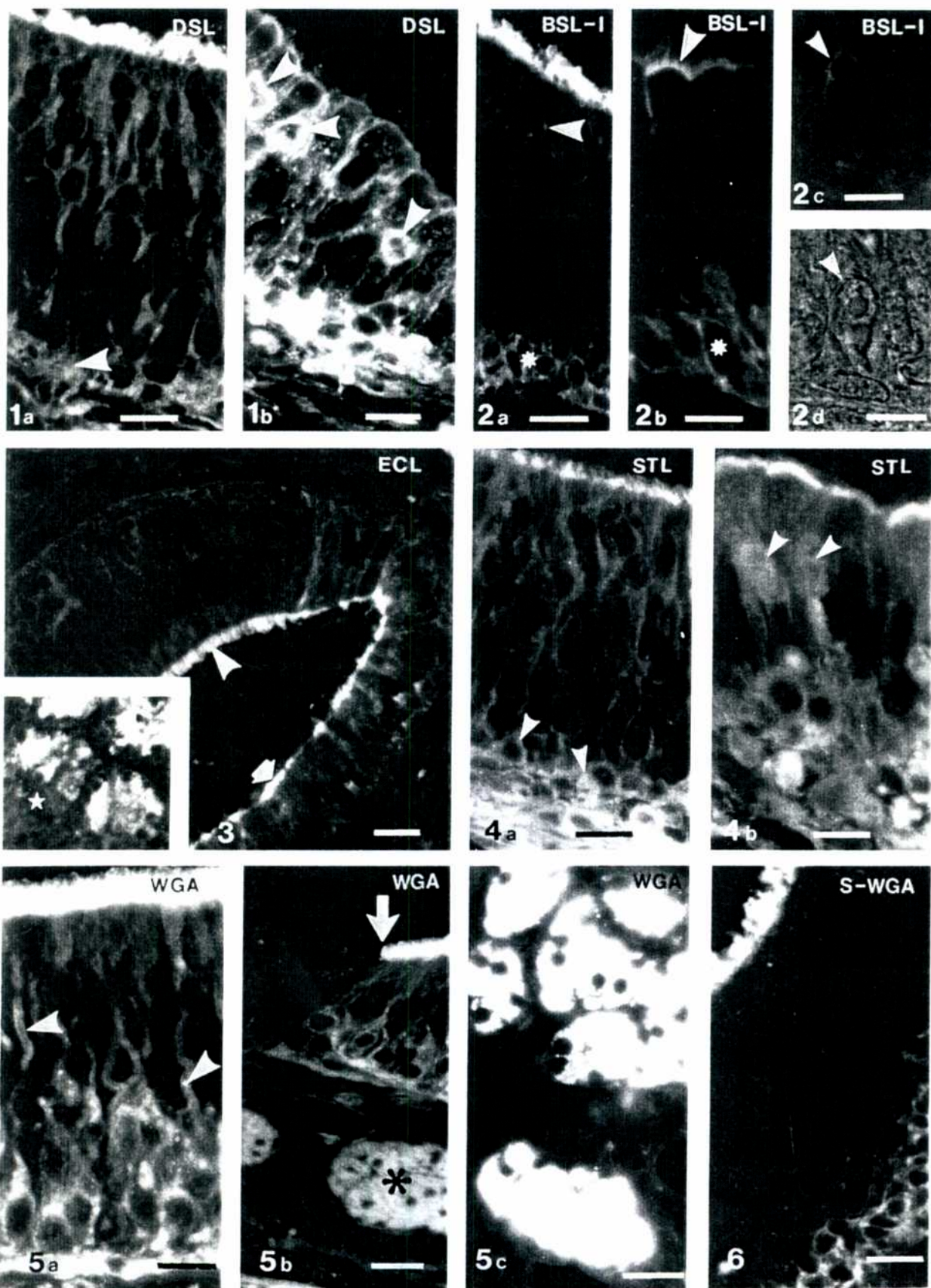


Figura 1: (a) DSL. Epitelio sensorial. Se pudo observar una fuerte reacción en el complejo mucomicroviliar. También se colorearon las membranas plasmáticas y los citoplasmas de las células subtentaculares y basales (►). Barra, 15µm. (b) DSL. Epitelio no sensorial. La membrana plasmática de las células basales y columnares se colorearon fuertemente, también se pudo observar neutrófilos infiltrados (►) entre las células columnares. Barra, 15µm.

Figura 2: (a) BSL-I. Epitelio sensorial. Se pudo observar una reacción positiva en el complejo mucomicroviliar y en la región apical de las células sustentaculares (►); las células basales también mostraron una reacción positiva (*). Barra, 15µm. (b) BSL-I. Epitelio no sensorial. Exhibió una reacción positiva en una subpoblación de células columnares ciliadas (►) y en células basales (*). Barra, 15µm. (c) Las neuronas cerca de la capa basal también presentaron marca con esta lectina (►). Barra, 15µm. (d) La fotografía muestra la misma neurona de (c) (►) visualizada con la técnica de interferencia diferencial (Nomarski). Barra, 15µm.

Figura 3: ECL. Ambos complejos, el mucomicroviliar (►) y el mucociliar (flecha) exhibieron una reacción positiva con esta lectina. El agregado en la región inferior izquierda de la fotografía, muestra una marca moderada en una subpoblación de células glandulares vomeronasales. También pudieron ser observadas algunas células sin marcas. Barra, 30µm.

Figura 4: (a) STL. Epitelio sensorial. Se pudo observar reacción positiva en el complejo mucomicroviliar. En las células basales se observó una fuerte reacción con esta lectina (►). Barra, 15 µm. (b) STL. Epitelio no sensorial. El complejo mucociliar y la capa basal presentaron una marca moderada. También se colorearon los neutrófilos infiltrados (►). Barra 15µm.

Figura 5: (a) WGA. Epitelio sensorial. Una reacción fuerte se observó en el complejo mucomicroviliar. Un patrón de coloración puntillado pudo ser observado en el citoplasma supra y perinuclear de las neuronas vomeronasales. Se pudieron observar dendritas distribuidas atravesando el epitelio (►). La capa basal exhibe una coloración moderada. Barra, 15µm. (b) WGA. Se pudo observar una abrupta transición (flecha) entre los epitelios sensorial y no sensorial. Los nervios vomeronasales (*) también presentaron una reacción positiva. Barra, 30µm. (c) Las células acinares de las glándulas vomeronasales mostraron una fuerte coloración. Barra, 15µm.

Figura 6: WGA. Epitelio sensorial. En el complejo mucomicroviliar se pudo observar una reacción positiva intensa. Por su parte, las células basales presentaron una marca menos intensa. Barra, 15µm.

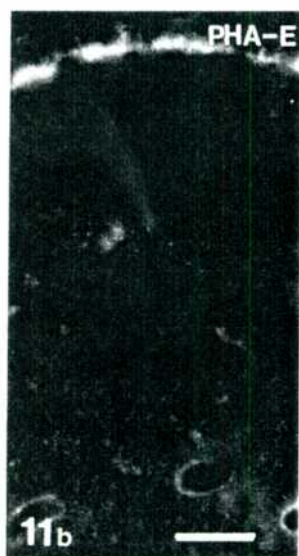
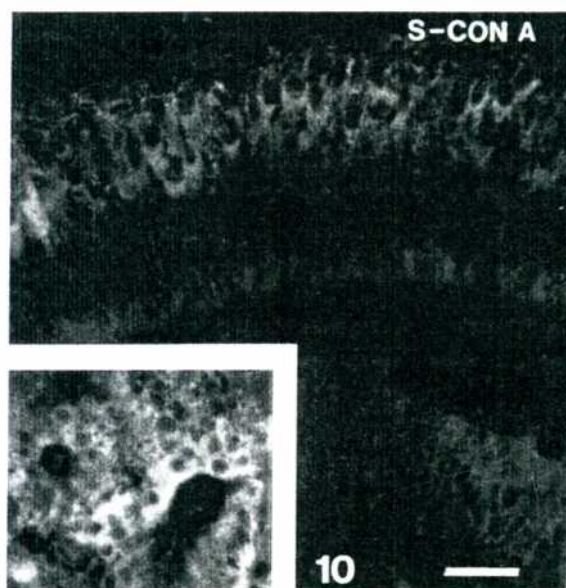
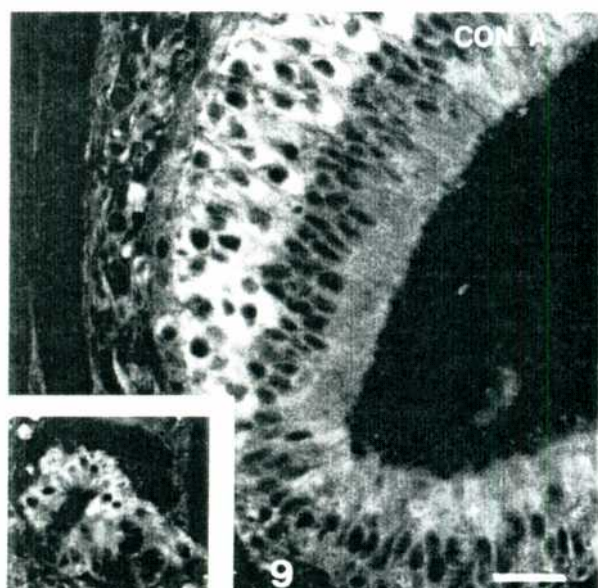
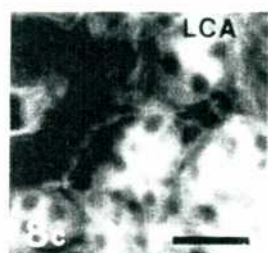
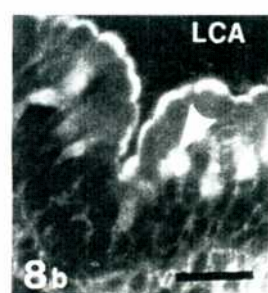
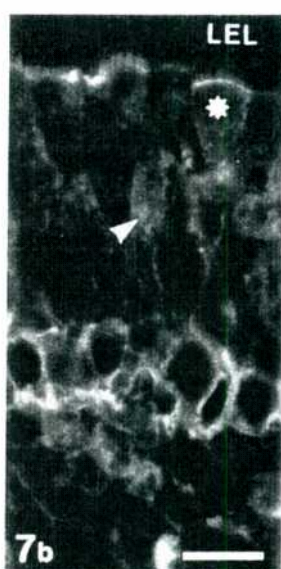
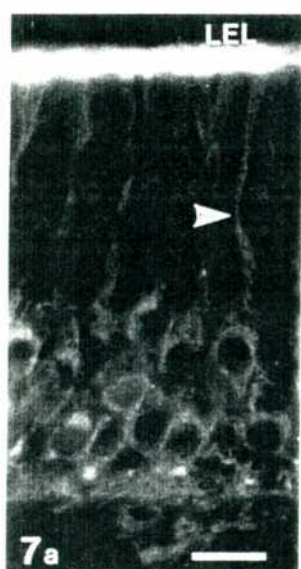


Figura 7: LEL. (a) Epitelio sensorial. El complejo mucromicroviliar exhibió una reacción fuerte. El citoplasma y las dendritas de las neuronas receptoras vomeronasales (►) presentaron un patrón de coloración puntillado utilizando esta lectina. Barra, 15µm. (b) LEL. Epitelio no sensorial. Esta lectina marcó una subpoblación de células columnares (*) y todas las células basales. También se pudieron observar neutrófilos infiltrados (►) en este epitelio. Barra, 15µm.

Figura 8: (a) LCA. Epitelio sensorial. El complejo mucromicroviliar y las células basales presentaron una reacción positiva. Barra, 15µm. (b) LCA. Epitelio no sensorial. El complejo mucociliar, el citoplasma supranuclear de las células columnares (►) y la capa basal se colorearon con esta lectina. Barra, 20µm. (c) Las células glandulares vomeronasales también se colorearon fuertemente. Barra, 30µm.

Figura 9: Con A. El epitelio sensorial presentó una fuerte reacción en el citoplasma perinuclear de la neurona receptora vomeronasal y en la región basal. Como se puede observar en el agregado, la mayoría de las células acinares de las glándulas vomeronasales presentaron una reacción positiva. Barra, 30µm.

Figura 10: S-Con A. Se observó una moderada reacción en el citoplasma supranuclear de la neurona receptora vomeronasal. En el agregado se puede observar una subpoblación de células glandulares con moderada coloración. Barra, 30µm.

Figura 11: PHA-E. Tanto el complejo mucromicroviliar (a), como el mucociliar (b), mostraron una reacción positiva frente a esta lectina. Barra, 15µm.

Figura 12: Todas las estructuras mostraron un patrón de coloración similar al de PHA-E. Barra 15µm.

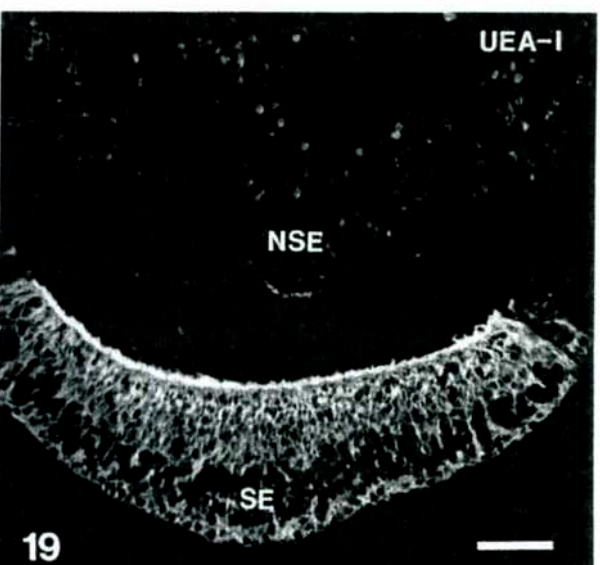
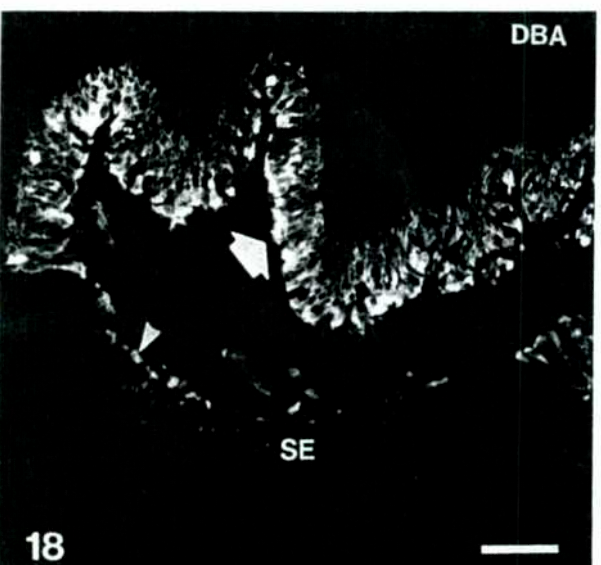
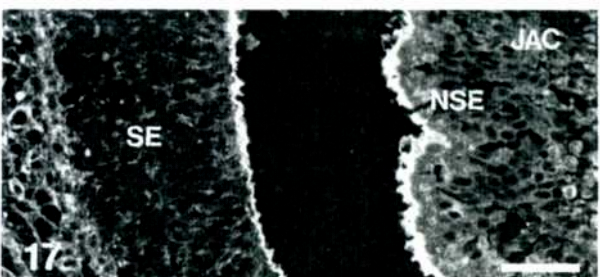
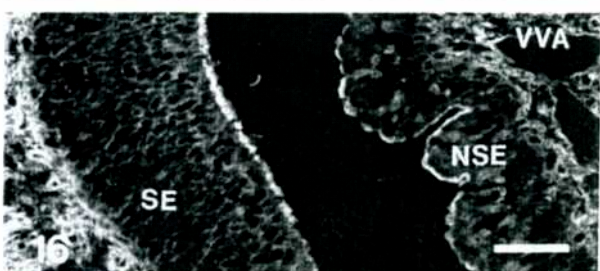
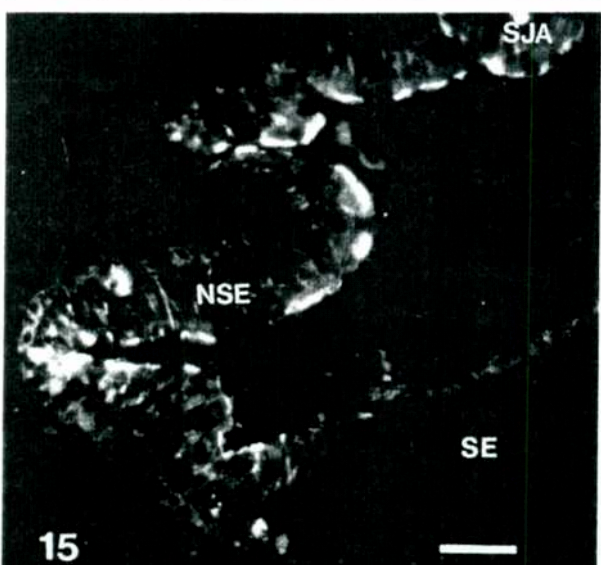
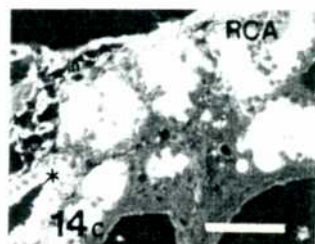
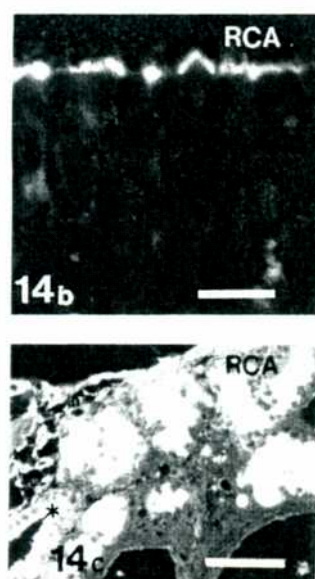
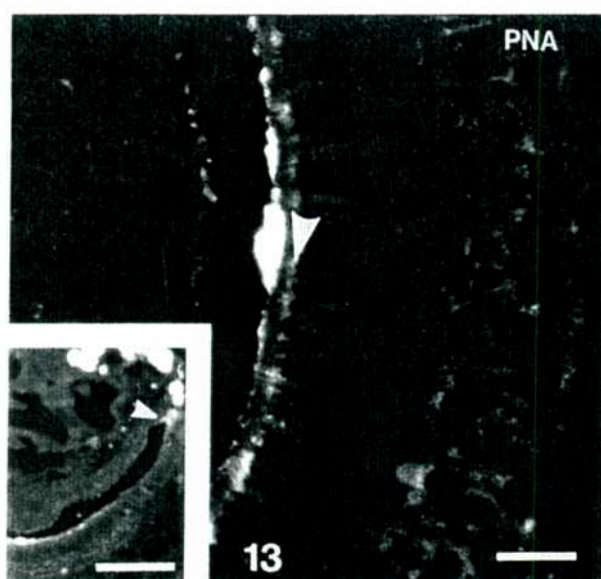


Figura 13: PNA. El complejo mucomicroviliario mostró una reacción fuerte frente a esta lectina. Por su parte, el citoplasma supranuclear y las dendritas se colorearon moderadamente. También, las protrusiones apicales de los procesos dendríticos presentaron marca (►). Barra, 30µm. El agregado muestra, a baja magnificación al OVN presentando una reacción fuerte en los conductos y las glándulas vomeronasales. La terminación de los conductos glandulares en el área de transición entre el SE y el NSE es marcada por medio de (►). Barra, 210µm.

Figura 14: RCA₁₂₀. Con esta lectina se marcaron: el complejo mucomicroviliario (a, Barra, 15µm), el complejo mucociliar (b, Barra, 30µm), y las glándulas vomeronasales con sus ductos (*) (c, Barra 210µm).

Figura 15: SJA. En el complejo mucociliar del NSE se observó una coloración con un patrón de parches utilizando esta lectina. Por su parte, el complejo mucomicroviliario del SE presentó una débil coloración. Barra, 30µm.

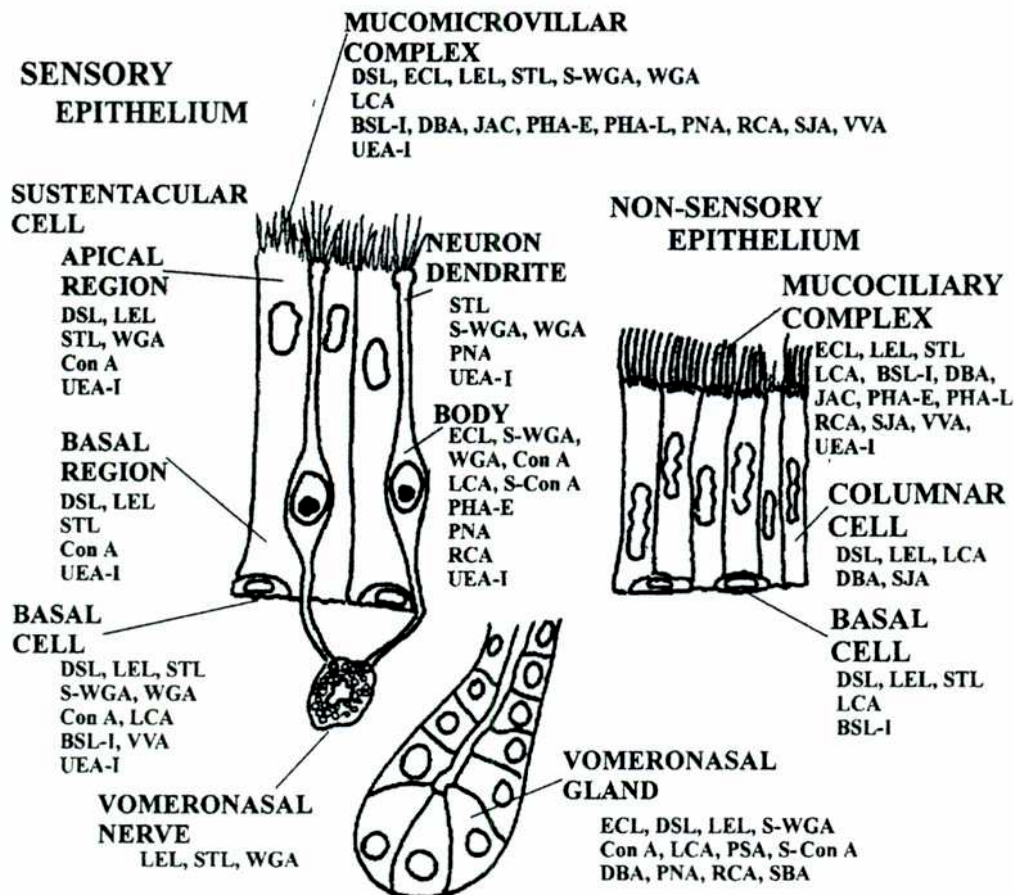
Figura 16: VVA. El complejo mucomicroviliario y la capa de células basales del SE, presentaron una reacción positiva moderada. El complejo mucociliar del NSE presentó una coloración débil. Barra 30µm.

Figura 17: JAC. Las células basales y el complejo mucomicroviliario presentaron una reacción positiva. En el epitelio no sensorial, el complejo mucociliar exhibió una intensa coloración. Barra, 30µm.

Figura 18: DBA. Esta lectina coloreó principalmente al epitelio no sensorial (flecha). En el complejo mucomicroviliario del SE solamente se pudo observar una reacción positiva con un patrón de parches (►). Barra, 30µm.

Figura 19: UEA-I. Esta lectina coloreó todas las capas del epitelio sensorial (SE), incluyendo el complejo mucomicroviliario. Por otra parte, en el complejo mucociliar de las células ciliadas columnares, se observó una débil coloración. Barra, 30µm.

VOMERONASAL ORGAN



OLFACTORY MUCOSA

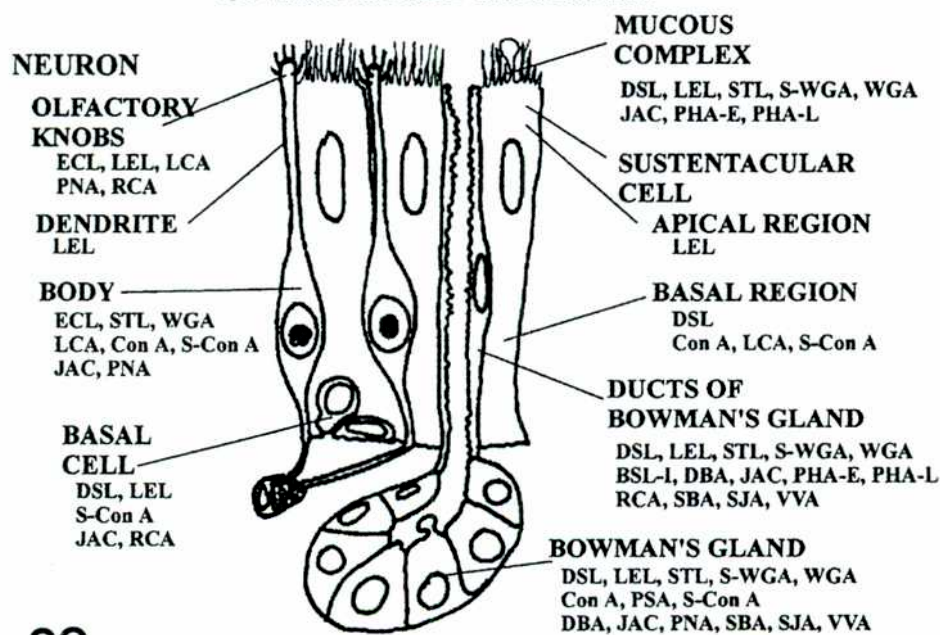


Figura 20: Diagrama ilustrando comparativamente la distribución de lectinas en el órgano vomeronasal y la mucosa olfatoria del armadillo *Chaetophractus villosus*.

Capítulo 11. Efectos del herbicida 2,6-diclorobenzonitrilo (diclobenil) sobre el órgano vomeronasal.

11.1 Introducción

El 2,6-diclorobenzonitrilo (diclobenil) es un herbicida de amplio espectro, que fue utilizado como control de malezas en cultivos. Este herbicida fue descrito como un potente tóxico tejido-específico de la mucosa olfatoria (Eriksson et al, 1996). Los efectos dañinos del diclobenil fueron reportados en anfibios y mamíferos (Erickson y Brittebo, 1991; 1995; Delaleu y Sicard; 1995). La documentación acerca de la toxicidad es escasa, y no se la ha considerado alta. Sin embargo, la toxicidad inducida por este herbicida en la mucosa olfatoria (MO) está relacionada con la activación metabólica oxidativa dependiente del Citocromo P450, que agota el glutatión de la célula. Esta molécula es un importante componente de los mecanismos de detoxificación celular (Erickson y Brittebo, 1991; 1995; Brittebo et al, 1992).

Trabajos anteriores informan que el efecto del Diclobenil sobre la mucosa olfatoria se basa en un ataque a las glándulas de Bowman, las que luego de la acción, presentan células necróticas o con núcleos marcadamente picnóticos. Esta acción también se ejerce sobre las células del epitelio olfatorio, en el que primero se observa una desorganización celular, luego una reducción en el número de neuronas y por último, un desprendimiento de la membrana basal (Brandt et al, 1990).

El efecto deletéreo en la mucosa olfatoria es transitorio, pues luego de algún tiempo, este tejido tiene la capacidad de regenerarse (Eriksson et al, 1996).

Efectos tóxicos del diclobenil sobre animales

El 2,6-diclorobenzonitrilo es un herbicida con numerosos usos terrestres y acuáticos. La toxicidad de esta sustancia no ha sido considerada alta. Estudios de toxicidad aguda (200 mg/kg, por vía oral), en conejos, han demostrado necrosis centrolobulillar en el hígado (Wit y Genderen, 1966).

Este componente está dentro de una lista de sustancias químicas que causan

degeneración de la MO en la cavidad nasal como consecuencia de la exposición sistemática por distintas rutas, además de la inhalatoria (Deamer et al, 1994). Hasta el presente se han comprobado los siguientes hechos:

- El diclobenil tiene un efecto tóxico selectivo sobre la MO de varios mamíferos y la extensión del daño es dosis-dependiente (Delaleu y Sicard, 1995).
- La administración intraperitoneal de una simple dosis de 12 mg/kg de diclobenil resulta en la degeneración de la MO, principalmente de la región dorso-medial de la cavidad nasal del ratón, a partir de las 24 hs, sin afectar en demasía al epitelio de la región más ventral y lateral de las vías aéreas (Brandt et al., 1990). La MO estaba afectada a nivel del epitelio olfatorio y de las glándulas de Bowman (GB) en la lámina propia.
- Estudios autorradiográficos e histológicos del epitelio olfatorio demostraron que el diclobenil es metabolizado en las GB, en las cuales induce necrosis y la posterior desorganización del epitelio olfatorio. En contraste, la toxicidad general del diclobenil y de sus principales metabolitos es baja.
- Bioquímicamente se ha demostrado que la toxicidad del diclobenil sobre el olfato es dependiente de la actividad del citocromo P450 -presente en las células de la GB-, pudiendo ser reforzada por administración de un agente deplesante del glutathione, siendo mitigada por la administración de N-acetilcisteína.

Autores como Deamer et al, (1994) estudiaron el efecto del diclobenil sobre el sistema olfatorio a través de la administración dermal. Encontraron un daño a nivel histológico de la MO (pérdida de neuronas receptoras olfatorias) en ratones después de simples ó multiples aplicaciones dermales del hebicida en dosis de 50 a 200 mg/kg. Con respecto a los niveles de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP, marcador inmunohistoquímico que denota la pérdida de neuronas en el SNC) en el BO, se midió un aumento significativo seguido a la administración de 150 y 200 mg/kg de diclobenil por vía dermal y de 25 mg/kg por inyección intraperitoneal. Se comprobó que el incremento de GFAP en el BO fue más grande en los ratones que recibieron el diclobenil por vía intraperitoneal, correlacionado con el incremento del daño del epitelio olfatorio en estos animales, comparados con aquellos expuestos a la aplicación dermal.

Delaleu y Sicard (1995) han demostrado que efectos similares a los observados en mamíferos ocurren en anfibios y que las modificaciones histológicas están asociadas con variaciones en las respuestas electrofisiológicas de la MO a estímulos olfatorios. Luego de los

daños severos, la regeneración histológica de la MO fue acompañada por la presencia de respuestas fisiológicas registradas por medio del electro-olfato-grama (EOG). La inyección de diclobenil (50 mg/kg) en anfibios indujo una importante necrosis de la MO 4 días después de la aplicación (Delaleu y Sicard; 1995). El epitelio olfatorio estaba totalmente destruido y las GB en la lámina propia mostraban acinos atípicos, formados por arreglos esféricos de células alrededor de grandes lagunas. Tres meses después se pudo observar un epitelio olfatorio pseudoestratificado y GB normales.

Todos los estudios previos reportan una alta especificidad de este tóxico con la mucosa olfatoria y también mencionan la ausencia de un efecto destructivo sobre el órgano vomeronasal (OVN) de las especies animales analizadas (Brandt et al, 1990). Sin embargo, en este trabajo se detectaron cambios fisiológicos y estructurales producidos por el DCB sobre el OVN de *Chaetophractus villosus*. La destrucción química del OVN por medio del diclobenil es una valiosa herramienta para estudiar los efectos fisiológicos de la desaferentación vomeronasal y también para estudiar los procesos involucrados en la dinámica celular tales como la muerte, la división y la diferenciación de los receptores neuronales vomeronasales.

11.2 Metodología Experimental

Para la manipulación del herbicida se tuvieron máximas precauciones, a pesar de su baja toxicidad, debido a que algunas de sus vías de ingreso al organismo son las rutas dermal e inhalatoria. Se trabajó con guantes de látex y barbijo para manipular la droga. Todo el material descartable e instrumental utilizado con diclobenil fue puesto en una solución con lavandina luego de su uso, para desactivar la toxicidad de la droga (Rodríguez, comunicación personal).

Se ha demostrado, en ratas y perros, que una única dosis oral de diclobenil es excretada, a los 4 días, entre el 85,8-97,2 % (60,0-80,7 % por la orina) (Griffiths et al, 1966). Entre ambas especies no se encontraron diferencias en el patrón de eliminación de los metabolitos, como así tampoco entre sexos para cada especie. Se comprobó que el diclobenil es totalmente metabolizado, y no se encuentran moléculas originales de la droga en orina o heces. Estos resultados dieron un margen de seguridad para manipular al animal durante los días sucesivos a la inyección del diclobenil, ya que en principio se consideró que la cámara de

registro, donde se estudiaba al animal, no contenía moléculas sin metabolizar del herbicida.

Animales: Para el estudio de la toxicidad del herbicida sobre el OVN se utilizaron ejemplares machos y hembras adultos de *Chaetophractus villosus*. Estos animales fueron mantenidos en jaulas con un ritmo natural de Luz - Oscuridad, y se les suministró una dieta de alimento balanceado y agua.

Sustancias químicas: Se utilizó el 2,6 - Diclorobenzonitrilo obtenido de Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, USA) que presentaba una pureza del 97%. Se utilizó Dimetil Sulfóxido (DMSO) como diluyente obtenido de los laboratorios Sintorgan S. A. (Buenos Aires, Argentina).

Dosis administradas: A los animales se le inyectó una única aplicación intraperitoneal con dosis de 30; 50 y 80 mg/kg de peso, disuelto en DMSO (1 µl/g de peso). A los armadillos controles sólo se les administró DMSO.

Histopatología: Los animales fueron anestesiados con clorhidrato de Ketamina (40mg/Kg, i.m.) y tiopental sódico (60mg/Kg, i.p.) y perfundidos via aorta con fluido de Bouin o con formol al 10% en solución fisiológica al 0,9%. Los OVN fueron removidos por disección bajo lupa. Las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina y se realizaron secciones transversales de 1 a 5 micrones del OVN. Los cortes fueron coloreados con Hematoxilina y Eosina y Tricrómico de Masson.

11.3 Resultados

Histopatología del Organo Vomeronasal.

Dosis de 30 mg/kg a los 6 días de la administración: Se observó en el epitelio sensorial de OVN, parches de un epitelio pseudoestratificado similar al epitelio no sensorial (Figuras 1; 2 y 3). Con esta dosis y al tiempo de examinación, no se detectaron cambios importantes en las glándulas asociadas y en el epitelio no sensorial.

Dosis de 50 mg/kg a los 6 días de la administración: El epitelio aparece con zonas que presentan distinto grado de destrucción. Se pudo observar zonas donde el epitelio sensorial mostraba una disminución del tamaño de las neuronas, con el núcleo picnótico y el soma retraído (Figuras 4 y 5). En otras regiones se encontró desprendido de la membrana basal, formando un conglomerado desorganizado de células en el lumen del órgano. Pegada a la membrana basal sólo podía observarse una única capa de células basales aplanadas (Figura 6). Sorprendentemente, no se observaron cambios significativos en el epitelio no sensorial y en las glándulas vomeronasales.

Dosis de 80 mg/kg a los 6 días de la administración: El epitelio sensorial mostraba una llamativa estratificación de las neuronas en dos capas: una muy uniforme, que se ubicaba en la región basal del epitelio y otra, más irregular, que se disponía en la zona media del epitelio (Figuras 7 y 8). El ENS y las glándulas vomeronasales permanecen intactos. La morfología aparentemente normal del OVN, junto con esta disposición tan particular de las neuronas indicaría que con esta dosis y a este tiempo de examinación, el epitelio sensorial haya sufrido un proceso de regeneración.

Para determinar los efectos progresivos del Diclobenil, se sacrificaron animales inyectados con una dosis de 80 mg/kg a 6 h, 12 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 53 días después de la administración. Se utilizó la dosis más alta porque en términos de una semana se podía observar el ciclo completo de destrucción - regeneración del epitelio. Utilizando dosis menores, tendríamos que haber empleado muchos más animales para determinar este efecto progresivo.

- *6 horas postratamiento:* El OVN no presentó cambios aparentes. (Figura 9).
- *12 horas postratamiento* En el ES de las áreas de unión aparecieron células con núcleos picnóticos. El resto del epitelio y la mucosa permanecían intactos. (Figura 10).
- *1 día postratamiento:* Apareció una desorganización celular en el ES. Comenzó la separación del ES de la capa basal. Muchos núcleos picnóticos. (Figuras 11 a y b).
- *2 días postratamiento:* En la capa basal, comenzó una ordenación lineal de las células basales y continuó la separación del ES de la capa basal. (Figura 12).
- *3 días postratamiento:* En la región basal se formó una capa bien diferenciada de células

basales. Aparecieron células basales grandes con núcleos claros en la zona de unión. Hubo una reducción en el número de neuronas y las presentes mostraban núcleo picnótico. Las células de sostén se ordenaron en una capa superior. (Figuras 13 a, b y c).

- *4 días postratamiento:* Las áreas de unión se hallaban desorganizadas y aumentadas. No eran distinguibles células de sostén pero sí neuronas que se encontraban entremezcladas con gran cantidad de células de núcleos grandes. (Figuras 14 a y b).
- *5 días postratamiento:* Las áreas de unión presentaban un aspecto normal. Apareció una marcada alineación de neuronas en la región basal del epitelio. Se pudo apreciar restos celulares en el lumen del órgano. (Figura 15).
- *6 días postratamiento:* Continuaba la alineación en la región basal de las neuronas dentro del epitelio. También aparecieron neuronas dispuestas irregularmente sobre esta capa ordenada. Aumentaba el número de neuronas. (Figura 16).
- *53 días postratamiento:* El epitelio mostró una morfología normal.

A ninguno de los tiempos examinados se pudo verificar algún efecto sobre el ENS y la mucosa del órgano.

11.4 Discusión

Con las tres dosis utilizadas pudimos observar que el efecto es gradual de acuerdo a las dosis empleadas y al tiempo de examinación. Estos resultados no fueron observados anteriormente en anfibios, como la rana (Delaleu y Sicard; 1995), ni en mamíferos, como el ratón, rata, conejo y perro (Erickson y Brittebo, 1991; 1995).

En la mucosa olfatoria, el diclobenil actúa primero sobre las glándulas de Bowman y secundariamente sobre el epitelio olfatorio. En cambio, este patrón de acción se modifica en el OVN del armadillo ya que no se verificaron efectos sobre las glándulas vomeronasales y por lo tanto, el diclobenil actuaría directamente sobre el epitelio sensorial.

La forma de acción sobre el OVN sí es comparable con la acción ejercida sobre la mucosa olfatoria, en ambos casos primero se observa una desorganización celular, luego una reducción en el número de neuronas y por último, un desprendimiento de la membrana basal.

El análisis de los cambios progresivos producidos por el diclobenil con una única dosis (80 mg/kg) sirvió para determinar paso a paso los sucesos que ocurren durante la destrucción y la regeneración epitelial. La presencia de una capa basal bien organizada durante el segundo y tercer día, sugieren que, en este animal, las células basales actúan como precursores de las otras líneas celulares. Por otro lado, las áreas de unión agrandadas y con una alta cantidad de células grandes durante el tercer y cuarto día, podrían sugerir que en esta zona también existen células precursoras. Al microscopio electrónico pudimos observar la presencia poco frecuente de un tipo de célula basal grande con escaso citoplasma y núcleo claro y grande (célula basal globosa) localizado en las áreas de unión (ver capítulo 9). Es lógico pensar que si este tipo de células globosas fueran precursoras de otras células, deberían observarse con poca frecuencia en epitelios normales y deberían aparecer en gran cantidad en un epitelio dañado como es el tratado por diclobenil y en proceso de regeneración luego de tres o cuatro días de la administración. Por eso suponemos que estas células globosas que aparecen en gran cantidad durante el cuarto día serían células precursoras.

Dado que la capa de células de sostén se empieza a organizar al tercer día y las áreas de unión aumentan en importancia al cuarto, se podría suponer que las células basales que se disponen ordenadamente en la región basal originarían a las células de sostén y que las células basales globosas que se localizan en las áreas de unión podrían ser precursoras de las neuronas vomeronasales. Mas estudios son necesarios para confirmar esta hipótesis, principalmente analizando marcadores de división celular (PCNA o similar) que coexpresen con marcadores específicos de células de sostén. Estos últimos no han sido caracterizados aún.

11.5 Conclusiones

Tradicionalmente se ha propuesto que la función del OVN está íntimamente relacionada con la reproducción, ya que se lo propone como receptor de estímulos feromonales. Sin embargo, una estructura tan desarrollada y tan conservada, podría tener algunas otras funciones importantes.

Para comprender el funcionamiento de un órgano, el mejor método es la ablación del mismo. Por eso proponemos al 2,6 - Diclorobenzonitrilo como un importante instrumento experimental no quirúrgico que podría ser utilizado en estudios fisiológicos destinados a clarificar otras funciones del OVN. Este herbicida aparece como un potente medio para

estudiar la dinámica celular y eventuales fenómenos de regeneración celular del mencionado órgano.

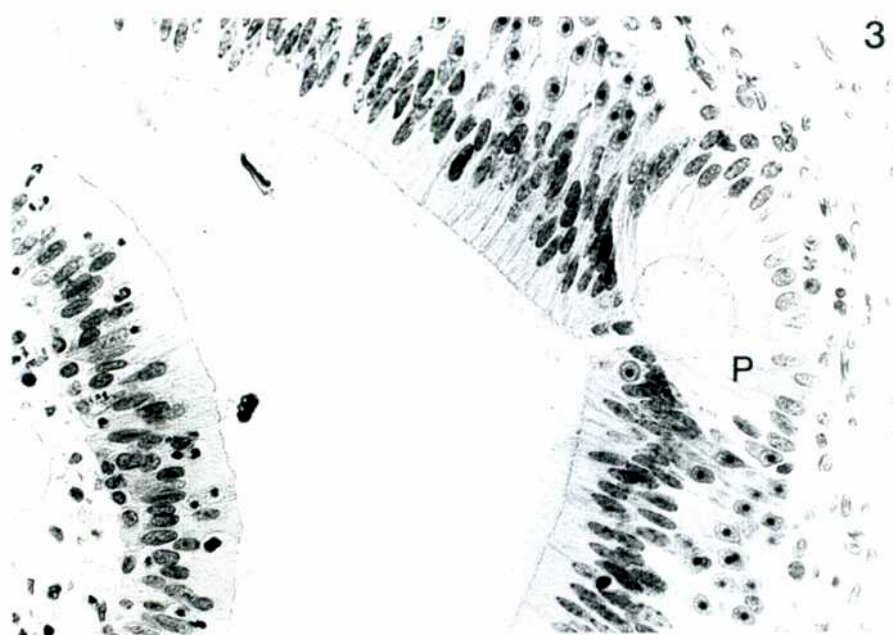
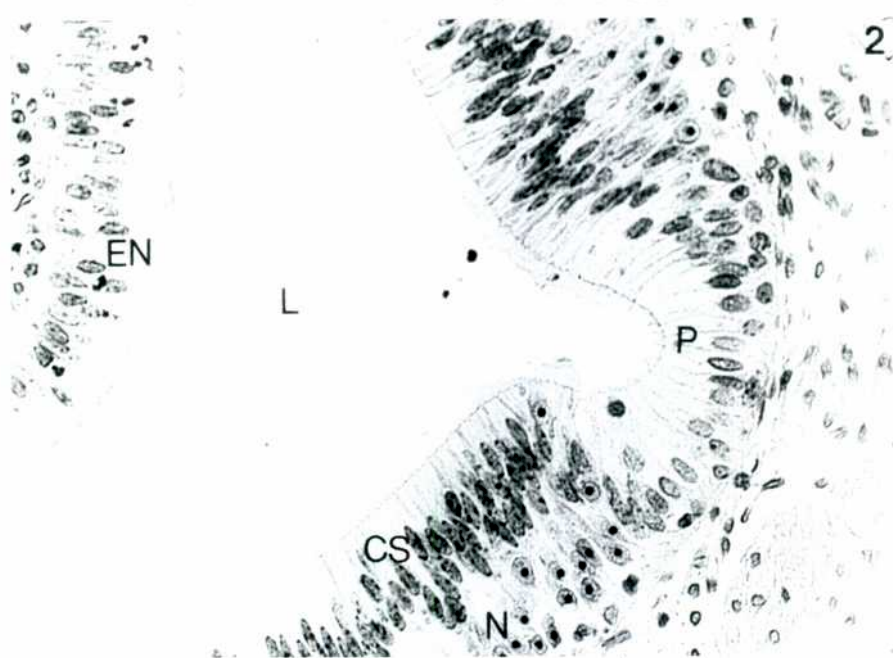
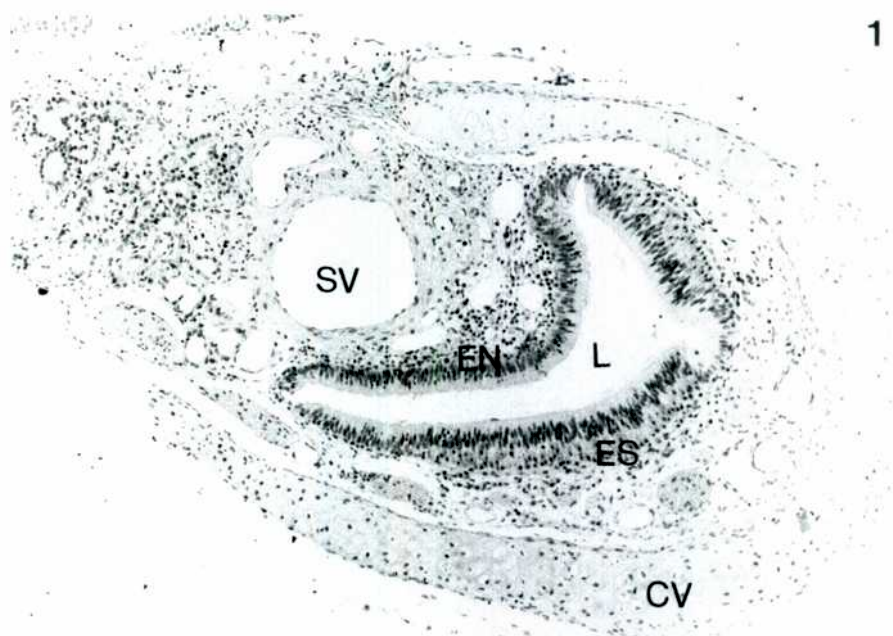


Figura 1: Corte transversal del OVN tratado con diclobenil en una única dosis de 30 mg/kg. ES, epitelio sensorial; EN, epitelio no sensorial; L, lumen; CV, cartilago vomeronasal; SV, seno venoso. Hematoxilina-eosina. A: 100X.

Figura 2: Detalle de la fotografía anterior donde se aprecia un “parche” (P) de un epitelio similar al NS. N, capa neuronal; CS, célula de soporte; L, lumen; EN, epitelio no sensorial. Hematoxilina-eosina. A: 400X.

Figura 3: En esta fotografía se observa el mismo “parche” de la figura anterior, pero en un corte más anterior. Hematoxilina-eosina. A: 400X.

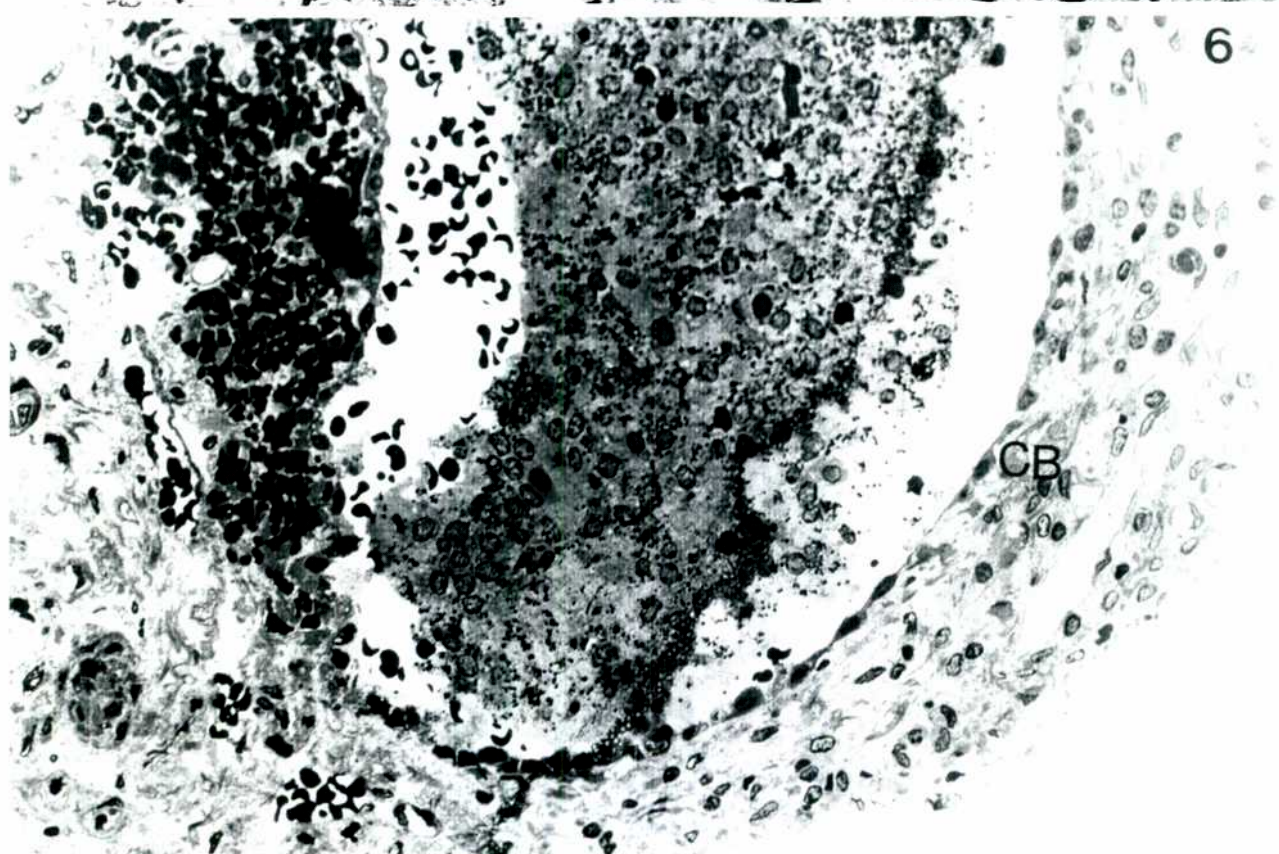
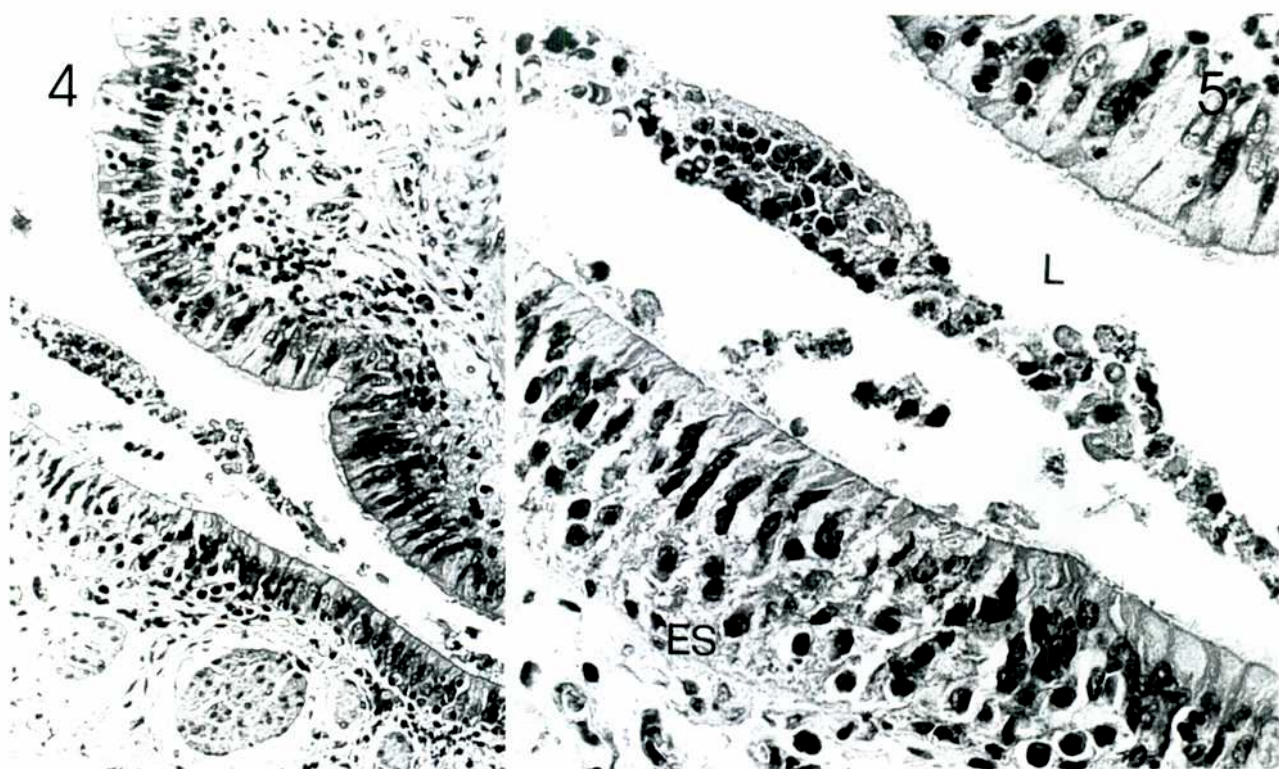
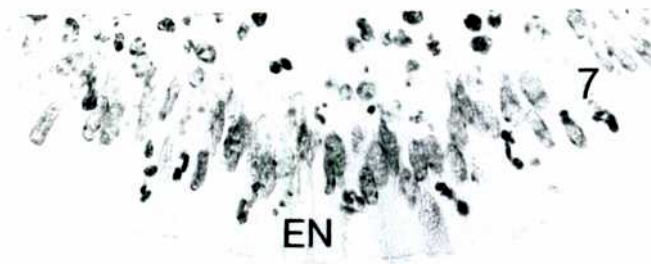


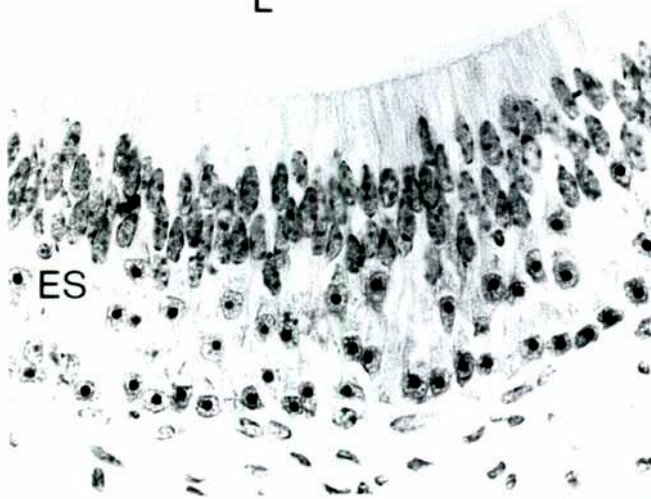
Figura 4: Fotografía del OVN de un animal tratado con diclobenil con una única inyección a una dosis de 50 mg/kg. Se puede observar una pronunciada desorganización del epitelio sensorial (ES). Hematoxilina-eosina. A: 250X.

Figura 5: Detalle de la figura 4, donde se observa el grave deterioro del epitelio sensorial (ES), La capa neuronal se halla reducida y las neuronas presentan un soma retraído con un núcleo muy picnótico. Inclusive, las células de sostén presentan el núcleo muy oscuro. También se puede observar un conglomerado de células en el lumen (L) del órgano. Hematoxilina-eosina. A: 400X.

Figura 6: Fotografía donde se aprecia el desprendimiento de los epitelio hacia el lumen. Se puede observar que sólo las células basales quedan unidas a la membrana basal. Tricrómico. A: 400X.



L



L

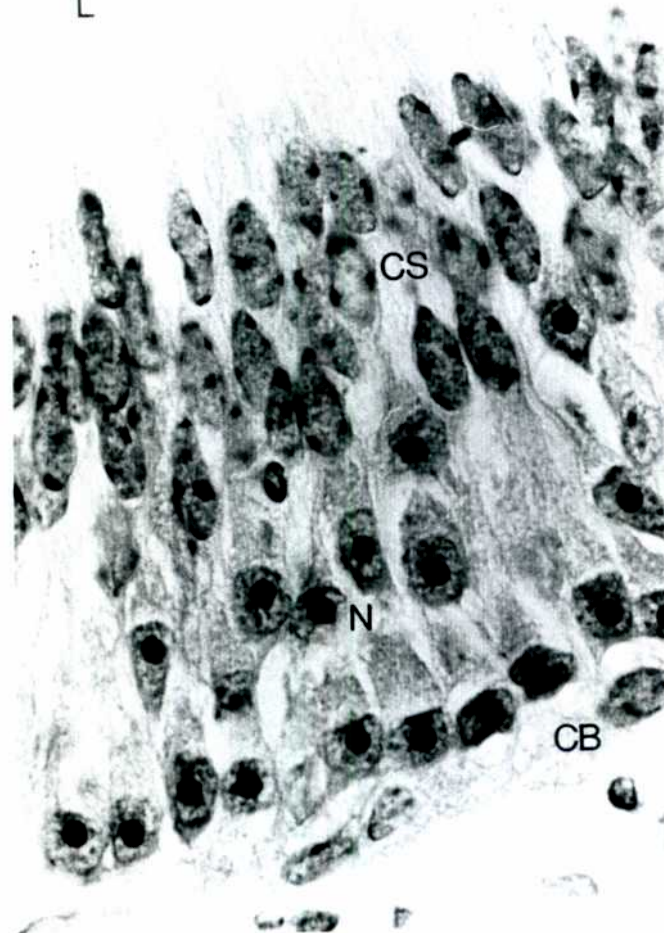
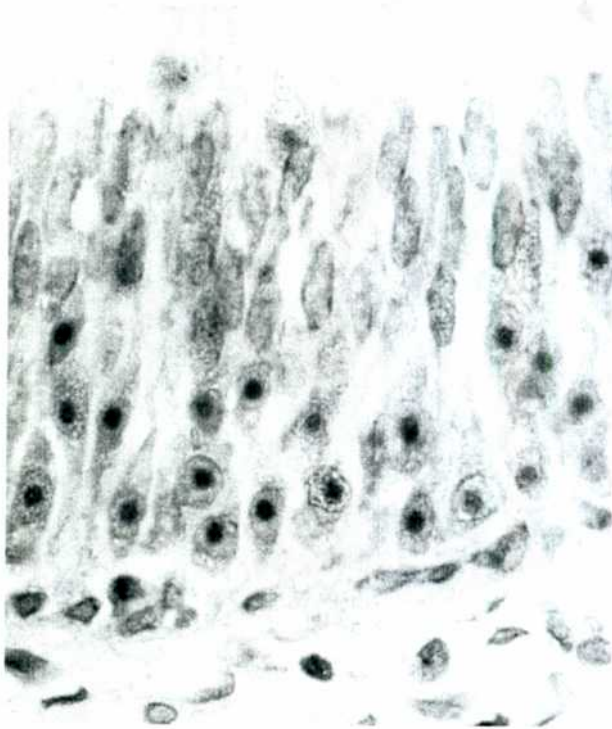


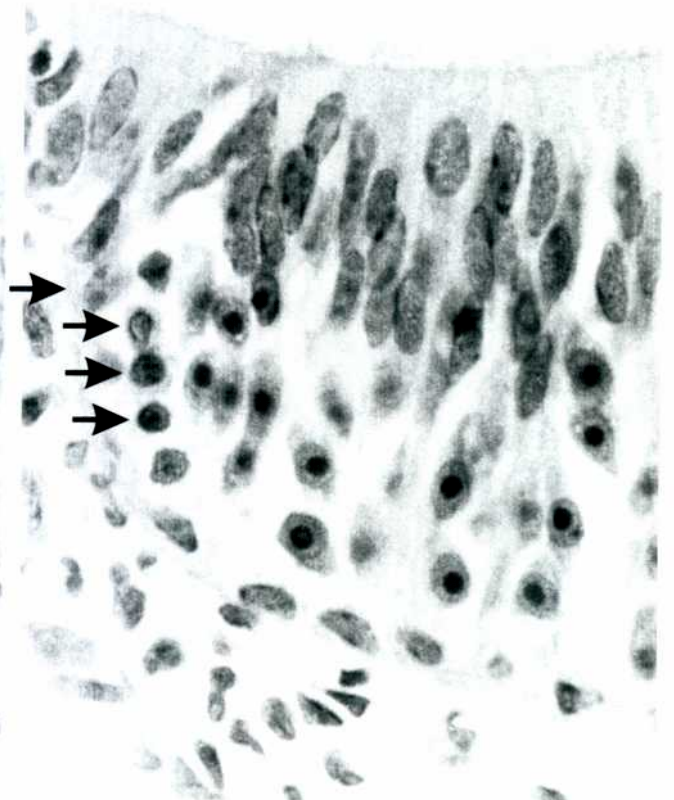
Figura 7: En esta fotografía se puede observar cómo las neuronas adoptan una posición estratificada dentro del epitelio. Algunas neuronas se agrupan formando una capa uniforme en contacto con las células basales. ES, epitelio sensorial; EN, epitelio no sensorial; L, lumen. Hematoxilina-eosina. A: 400X.

Figura 8: Detalle que muestra la capa basal de neuronas en el epitelio sensorial del OVN. N, neuronas; CB, células basales; CS, células de sostén; L, lumen. Hematoxilina-eosina. A: 1000X.

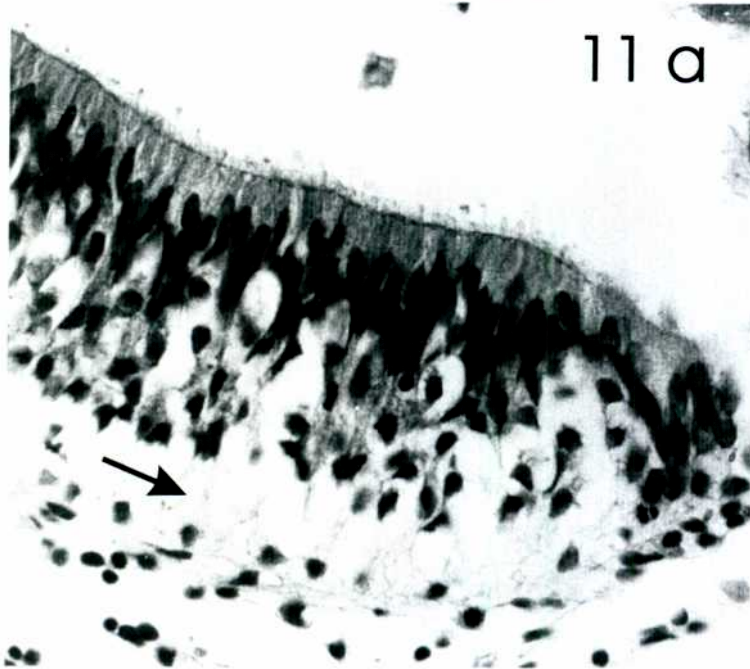
9



10



11 a



11 b

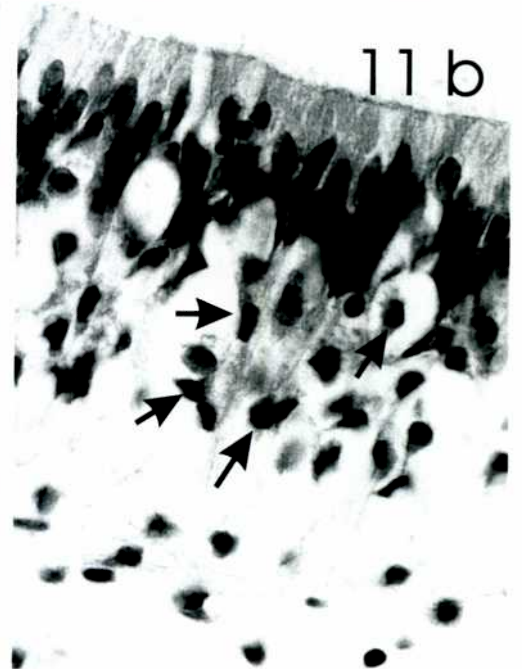


Figura 9: Epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a las 6 hs. de la inyección. Hematoxilina-eosina. A: 1000X

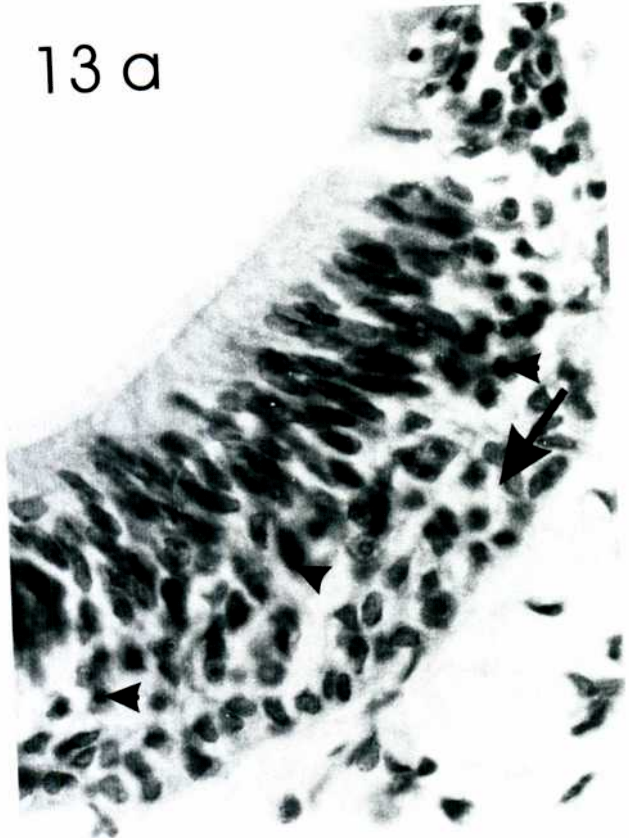
Figura 10: Area de unión del epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a las 12 hs. de la inyección. Las flechas indican núcleos picnóticos. Hematoxilina-eosina. A: 1000X

Figura 11: (a) Epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a las 24 hs. de la inyección. La flecha indica la separación del ES de la capa basal. Tricrómico. A: 400X. (b) Detalle de la fotografía anterior donde se puede apreciar la marcada cantidad de núcleos picnóticos en la capa neuronal (flechas). Tricrómico. A: 1000X.

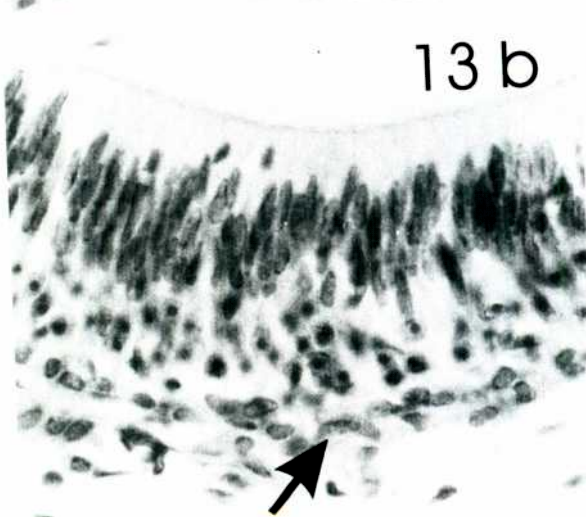
12



13 a



13 b



13 c



Figura 12: Epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los dos días de la inyección. Las flechas indican la ordenación basal de células. También se puede observar el completo desprendimiento del epitelio de la región basal. Hematoxilina-eosina. A: 1000X.

Figura 13: Epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los tres días de la inyección. (a) La flecha indica la capa bien diferenciada de células basales; ► indica la presencia de núcleos picnóticos en la capa neuronal. Nótese la reducción en el número de neuronas que conforman la capa media. (b) La flecha indica la región basal del epitelio con una capa celular bien diferenciada. Hematoxilina-eosina. A: 1000X. (c) Esta fotografía muestra el área de unión del epitelio sensorial. La flecha indica la presencia de células basales grandes. Hematoxilina-eosina. A: 1000X.

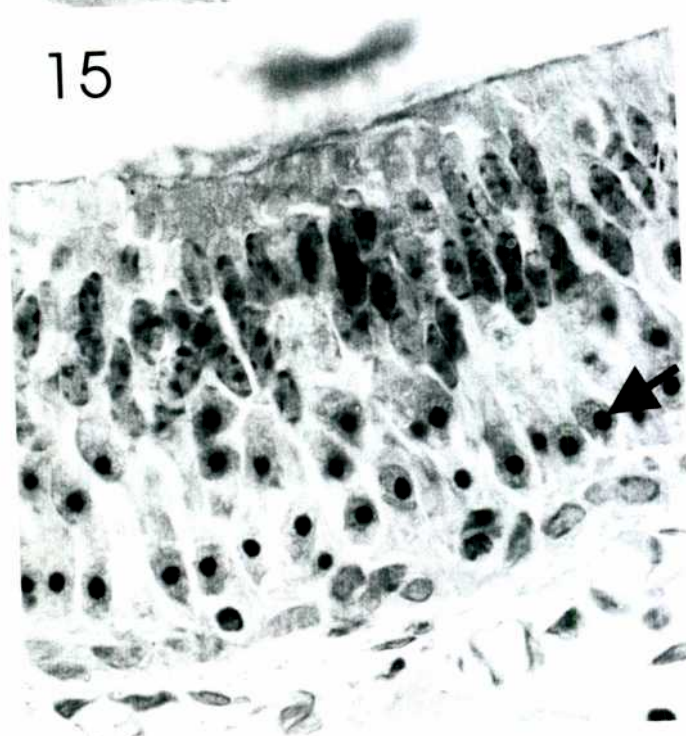
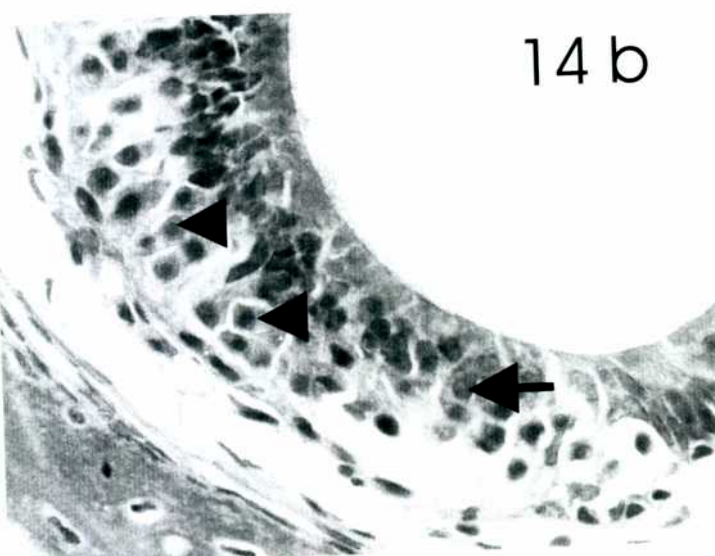
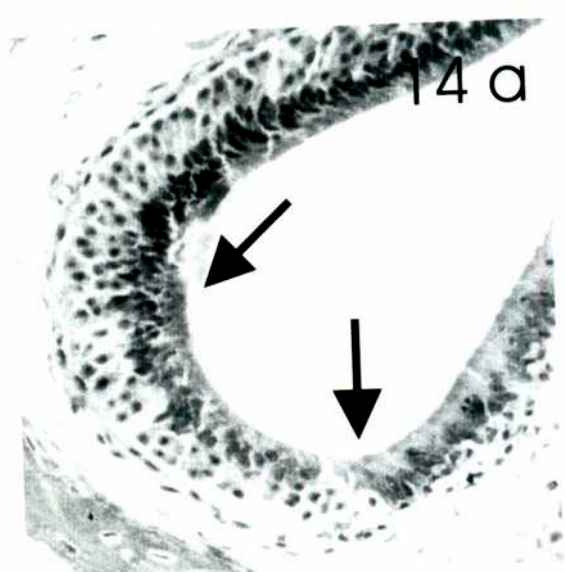


Figura 14: Epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los cuatro días de la inyección. (a) Las flechas indican los límites de la zona de unión que se presenta aumentada Tricrómico. A: 250X. (b) La flecha indica una célula con núcleo grande y claro presente en el epitelio. Las ► muestran la presencia de somas neuronales. Tricrómico. A: 400X.

Figura 15: Epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los cinco días de la inyección. La flecha indica alineación de neuronas en la región basal. También puede observarse una conspicua capa de células basales. Tricrómico. A: 1000X.

Figura 16: Epitelio sensorial del OVN de un animal tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los seis días de la inyección. En esta fotografía se pueden observar la alineación neuronal en la región basal y además otro estrato con neuronas dispuestas irregularmente. Nótese el aumento en el número de neuronas presentes en el epitelio. Hematoxilina-eosina. A: 1000X.

Capítulo 12: Dinámica celular en el Organo Vomeronasal de *Chaetophractus villosus*.

12.1 Introducción

Tanto en el Sistema Olfatorio Principal como en el Accesorio o Vomeronasal existe una continua formación de neuronas receptoras aún durante la vida adulta (Barber y Raisman, 1978). Es decir, estas neuronas receptoras pueden ser reemplazadas si se pierden como resultado de un daño directo de la mucosa, o secundariamente, como respuesta a una intensa acción retrógrada degenerativa causada por la axotomía o la destrucción de los bulbos olfatorios (Barber y Raisman, 1978). La formación de nuevas neuronas receptoras vomeronasales en animales adultos normales fue demostrada por medio de estudios realizados con [^3H]timidina (Moulton et al, 1970). En este estudio se encontró que en ratones adultos, el número de células en división en el epitelio sensorial del OVN es extremadamente bajo y que las pocas células marcadas estaban distribuidas difusamente en el epitelio y no presentaban una localización específica. En un estudio posterior, se identifica una población de células en división localizada en las áreas de unión entre los dos epitelios (Wilson y Raisman, 1980). Estos estudios llevaron a proponer que las nuevas neuronas en el epitelio sensorial vomeronasal de los mamíferos, se generaban en los márgenes y luego migraban a una región más central del epitelio.

La proliferación neuronal en el OVN a partir de la zona de unión de epitelios, no sería un mecanismo común a todos los vertebrados ya que en serpientes, las neuronas sensoriales indiferenciadas (células basales) han sido localizadas en la capa basal del epitelio sensorial más que en sus márgenes. Estas células indiferenciadas se dividen y generan neuronas receptoras jóvenes que luego migran a capas más superficiales (Wang y Halpern, 1980; 1988). Datos recientes obtenidos de una especie de comadreja (Jia and Halpern, 1998) informan sobre la existencia de una población de células en proliferación en la región basal del epitelio sensorial, cerca de la membrana basal. Estas diferencias encontradas sobre el sitio de proliferación son atribuidas a dos razones:

- 1- que el ratón y la comadreja son especies no muy relacionadas y por lo tanto, podrían tener sitios diferentes de proliferación,

- 2- estas diferencias pueden deberse a la edad de los animales estudiados o bien, a la región del OVN examinada, ya que podría darse el caso de que células marcadas en la región caudal del OVN de animales jóvenes, represente el crecimiento del mismo y no la neurogénesis (Jia and Halpern, 1998).

La mayoría de las células eucariotas tienen la habilidad de autodestruirse por activación de un programa de “suicidio” celular intrínseco. Este proceso fisiológico normal se denomina apoptosis. El término apoptosis originalmente fue definido para incluir ciertas características morfológicas, incluyendo el blebbing de la membrana (se forman como burbujas), contracción nuclear y citoplasmática y condensación cromatinica. Las células que mueren por apoptosis a menudo se fragmentan en cuerpos apoptóticos adheridos a membranas que luego son fagocitados y digeridos por macrófagos o por sus células vecinas sin generar una respuesta inflamatoria. Esta es una diferencia fundamental de lo que ocurre con la muerte celular por necrosis, la que se caracteriza por la hinchazón celular, floculación cromatinica, pérdida de la integridad de la membrana, lisis celular y generación de una reacción inflamatoria local (Duke et al, 1997).

Los procesos apoptóticos, de diferenciación y la proliferación celular son importantes agentes moduladores de tejidos y órganos (Cappello et al, 1999). Sin embargo son escasos los estudios realizados que describan en condiciones normales, la incidencia de la apoptosis sobre el funcionamiento del OVN.

El proceso de diferenciación neuronal en el OVN, solamente fue estudiado por algunos autores desde el punto de vista ontogénico (Cappello et al, 1998; Tarozzo et al, 1998). En estos trabajos se demuestra que durante estadios fetales, el epitelio sensorial presenta neuronas quimiosensoriales con distintos grados de diferenciación, mientras que el epitelio no sensorial contiene células que expresan varios marcadores específicos de receptores inmaduros y maduros, tales como GAP 43 (proteína asociada a la diferenciación y crecimiento neuronal), PGP 9.5 (proteína producto del gen 9.5) y OMP (proteína marcadora de neuronas olfatorias maduras). Estas células neuronales, en el epitelio no sensorial, desaparecen rápidamente después del nacimiento (Tarozzo et al, 1998).

Hasta donde sabemos, no hay bibliografía que describa la dinámica celular (en sus tres etapas: muerte, regeneración y diferenciación) del OVN de animales adultos luego de un daño reversible del epitelio sensorial vomeronasal.

Como fue demostrado en el capítulo 11, el herbicida diclobenil es un agente tóxico que induce la muerte celular en el epitelio sensorial del OVN del armadillo. Como mencionábamos al final del capítulo anterior, el diclobenil se presenta como una poderosa herramienta para estudiar la dinámica celular, ya que su acción produce una destrucción total del epitelio sensorial pero de manera transitoria y con una rápida recuperación.

En este capítulo se estudiará la dinámica celular (muerte, regeneración y diferenciación) del ES del OVN, utilizando como agente químico destructor al herbicida diclobenil.

12.2 Metodología

Animales y tratamiento

Para los estudios de dinámica celular se utilizaron ejemplares machos y hembras de *Chaetophractus villosus* inyectados con una única dosis de 80 mg/kg de diclobenil y sacrificados a 6 h, 12 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 53 días después de la administración (ver metodología del capítulo 11).

Obtención de las muestras

Los animales fueron anestesiados y perfundidos con líquido fijador de Bouin o con formol 10%. Las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina. El tiempo de inclusión en estufa fue reducido para evitar una posible disminución de antígenos específicos. Luego las muestras se cortaron en secciones de 5 μ m, se montaron en portaobjetos embebidos en gelatina y fueron sometidos a las distintas técnicas.

Métodos inmunohistoquímicos:

Apoptosis: Para la determinación de células en proceso apoptótico se utilizó un kit comercial denominado Apoptosis Detection System, Fluorescein (Promega Corporation). Este es un sistema no radiactivo y provee, de manera sencilla, una rápida detección de células apoptóticas en secciones de tejidos incluidas en parafina. Este sistema detecta el ADN fragmentado de células apoptóticas por incorporación del 12-dUTP* fluoresceinado a las

terminaciones 3'-OH del ADN usando la enzima Terminal deoxinucleotidil Transferasa (TdT), la cual forma colas poliméricas usando el principio del ensayo de TUNEL (Cohen y Duke, 1992). Luego de varios ensayos de prueba y error, hemos modificado el protocolo de trabajo sugerido en el boletín técnico (Promega, product G3250, 1996), para obtener mejores resultados.

Protocolo de trabajo

1. Desparafrinar e hidratar
2. Lavar en Buffer Fosfato Salino 0,05 M (PBS), 2 cambios de 5 min.
3. Lavar en ClNa 0,85%, 5 min.
4. Lavar en PBS, 2 cambios de 5 min.
5. Lavar en Formol 4% en PBS, 15 min.
6. Lavar en PBS, 2 cambios de 5 min.
7. Tratar con Proteinasa K (20 µg/ml), 30 min. a 37°C.
8. Lavar en PBS, 2 cambios de 5 min.
9. Lavar en Formol 4% en PBS, 15 min.
10. Sin lavar, remover el exceso y colocar:
 - a- La muestra control en: DNAasa (1µg/ml) a 37 °C durante 1 hora (Control positivo).
 - b- El resto de los preparados en Buffer de Equilibrio durante 1 hora.
11. Pasar los preparados que estaban en Buffer de Equilibrio al Buffer de Reacción y mantenerlos a 37°C durante 1 hora.
12. Lavar la muestra control en PBS, luego colocarla en Buffer de Equilibrio durante 10 minutos y finalmente pasarla al Buffer de Reacción a 37°C durante una hora.
13. Detener la reacción de todos los cortes con Buffer SSC (2x) durante 30 minutos en oscuridad.
14. Lavar en Buffer Fosfato Salino 0,05 M (PBS).
15. Montar los preparados en PBS-Glicerina.

Proliferación celular: Para detectar células en proceso de división celular se utilizaron técnicas especiales de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal contra PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Coltrera y Gown, 1991). Se utilizó el procedimiento inmunohistoquímico descrito por Ortego et al, (1994), sin embargo, se tuvo que implementar ciertas modificaciones para adaptar la técnica a nuestro material de estudio. Una de estas modificaciones fue el uso de la recuperación antigénica. Se probaron dos metodologías diferentes: el tratamiento con enzimas digestivas y el uso de microondas. Con la primera, no se obtuvo un buen resultado ya que el tejido presentaba signos de una alta degradación, se intentó bajar la concentración de la enzima y el tiempo de tratamiento, pero también se reducía la inmunomarca. Con el uso del microondas el tejido se mantenía en mejor estado y aumentaba la inmunomarca.

Protocolo de trabajo:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Lavar en Buffer Fosfato Salino 0,05 M (PBS), 2 cambios de 5 min.
3. Bloquear las peroxidasas con agua oxigenada al 3% en metanol durante 15 minutos.
4. Lavar en agua bidestilada y luego en PBS.
5. Recuperación antigénica*:
Se calienta agua en una olla a presión plástica en horno a microondas durante 4 minutos. Luego, se colocan los cortes en un coplin con Buffer Citrato pH 6 dentro de una olla a presión, evitando que el agua entre en el coplin. Se les aplican tres sesiones de microondas de 2 minutos a 750 W con un minuto de reposo entre las mismas.
6. Lavar en agua destilada seguido de PBS.
7. Bloquear con suero normal de caballo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Sin lavar, incubar con anti-PCNA (Novocastra Labs.) (1:50) levantado en ratón, durante 24 horas a 4° en cámara húmeda.
9. Lavar en PBS.
10. Bloquear con suero normal durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Incubar con el segundo anticuerpo biotinilado (antiratón) durante 45 minutos a temperatura ambiente.
12. Lavar en PBS.

13. Incubar con el Complejo Avidina-Biotina (Vectastain "ABC" technique; Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente.
14. Lavar en PBS.
15. Revelar con Diaminobencidina (Peroxidase Substrate Kit DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA).
16. Deshidratar y montar.

* NOTA: La estructura de las proteínas es alterada durante la fijación con formol y la inclusión en parafina. Esto provoca la pérdida de inmunorreactividad de los tejidos luego del procesamiento por enmascaramiento de los epítopes. El pretratamiento con enzimas proteolíticas, microondas, baños de agua caliente, ultrasonido, autoclave, etc. produce que los epítopes se desenmascaren y por lo tanto, mejora la inmunomarca.

Diferenciación neuronal: Para detectar neuronas en diferenciación se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas utilizando como primer anticuerpo al Growth Associated phosphoprotein 43 (GAP 43). Esta es la principal proteína del cono de crecimiento neuronal y ciertas terminales presinápticas. La expresión de GAP 43 es alta en neuronas que están extendiendo axones, tanto durante el desarrollo como en la regeneración de axones dañados (Milosevic et al, 1995).

Protocolo de trabajo (modificado de Verhaagen et al, 1993).

1. Desparaafinar e hidratar.
2. Lavar en Buffer Fosfato Salino 0,05 M (PBS).
3. Tratar con Borohidruro de sodio al 1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar en PBS. Pasar por alcohol 50° durante 10 minutos y volver a lavar en PBS.
5. Bloquear las peroxidasas con agua oxigenada al 3% en metanol durante 45 minutos.
6. Lavar con agua destilada.
7. Lavar en PBS, 2 cambios de 5 min.
8. Hacer recuperación antigénica con Buffer Citrato pH = 6 (como se describió anteriormente).

9. Lavar con agua destilada
10. Lavar en PBS.
11. Bloquear con suero normal caballo durante 1 hora a temperatura ambiente.
12. Sin lavar, incubar en cámara húmeda, con anti-GAP 43 (Novocastra Labs.) (1:20) durante 48 horas, con un cambio a las 24 hs. a 4 °C.
13. Lavar en PBS.
14. Bloquear con suero normal.
15. Incubar con el segundo anticuerpo biotinilado (antiratón) (1:100) a temperatura ambiente durante 45 minutos.
16. Lavar en PBS.
17. Incubar con el Complejo Avidina-Biotina durante 1 hora.
18. Lavar en PBS.
19. Revelar con Diaminobencidina.
20. Deshidratar y montar.

Para la demostración inmunohistoquímica de GAP 43 y PCNA se realizaron controles que constaban de:

- 1- Omisión del primer anticuerpo.
- 2- Omisión del segundo anticuerpo.
- 3- Realización de la técnica sobre un tejido del cual se conocía su reacción positiva frente al anticuerpo utilizado (control positivo).

12.3 RESULTADOS

Como se mencionó en la metodología, los animales fueron sacrificados a distintos tiempos luego de una única inyección del herbicida diclobenil.

En ejemplares sacrificados 6 horas después del tratamiento con diclobenil, se pudo observar la presencia de escasa cantidad de células con signos característicos de apoptosis como así también resultó escaso el número de células en proliferación. En los pocos casos en que la inmunomarcación de PCNA puso en evidencia células en división, éstas sólo se observaron en el epitelio sensorial cerca de las áreas de unión. Por otro lado, no se pusieron en evidencia neuronas en proceso de diferenciación mediante el uso de anticuerpos contra GAP 43 (Tabla 1).

En animales sacrificados 12 horas después del tratamiento con diclobenil, la técnica de TUNEL mostró una alta cantidad de células apoptóticas en el epitelio sensorial. Estas células apoptóticas estaban distribuidas principalmente en la parte central del epitelio sensorial, siendo su número escaso en las zonas de unión (Figuras 1 y 2).

El análisis de los OVN de ejemplares sacrificados durante uno y dos días después del tratamiento con diclobenil no mostró inmunomarca con las técnicas para determinar células apoptóticas, en proliferación o en diferenciación (GAP 43).

En los ejemplares sacrificados a los 3 días post-tratamiento, comenzaba a ser evidente un aumento en el número de células positivas a PCNA, indicando el comienzo de la proliferación de neuronas nuevas.

En los días 4to. y 5to. día post-tratamiento, se tornaba evidente el aumento en el número de neuronas en proliferación que se ponían en evidencia por el aumento en el número de imágenes inmunopositivas a PCNA que se ubicaban mayoritariamente en el área de unión entre el ES y el ENS (Figuras 3 y 4).

En animales tratados con diclobenil y sacrificados 6 días después del tratamiento, no se había modificado el número de células inmunomarcadas para PCNA (Figura 5), pero sí se apreciaba un fuerte aumento de células inmunorreactivas a GAP 43 (Figura 6), indicando que continuaba el proceso de proliferación y comenzaba el de diferenciación neuronal en el epitelio sensorial.

Los controles con tejidos no tratados con diclobenil, sólo expresaban, en una escasa cantidad de células, coloración para el marcador de proliferación celular.

Tabla 1: Inmunohistoquímica del OVN de *Chaetophractus villosus* a distintos tiempos después de la acción del Diclorobenzonitrilo (DCB).

Tiempo de	Apoptosis	Proliferación	Diferenciación
Acción del DCB		(PCNA)	(GAP-43)
6 horas	+	+	-
12 horas	+++	+	-
1 día	-	-	-
2 días	-	-	-
3 días	-	+	-
4 días	-	+++	-
5 días	-	+++	-
6 días	-	+++	+++
Control sin DCB	-	+	-

+++ Intensa marcación.

++ Moderada marcación.

+ Débil marcación.

- Sin marca

DISCUSION

Los estudios sobre la dinámica celular (proliferación, diferenciación y muerte) en el ES del OVN, son escasos. En mamíferos, solamente se realizó el análisis de la neurogénesis en el ratón (Moulton et al, 1970; Barber y Raisman, 1978) y en la comadreja *Monodelphis domestica* (Jia y Halpern, 1998).

En animales controles, es decir, en aquellos tratados solamente con el diluyente del diclobenil, el número de imágenes apoptóticas puestas en evidencia mediante el método TUNEL, es muy bajo. De la misma forma, el número de neuronas en proliferación

(evidenciadas por la inmunomarcación con anti-PCNA) y de neuronas en diferenciación (que reaccionan con anti-GAP 43) fue igualmente bajo.

Este resultado está en concordancia con lo observado en ratones, donde se demuestra que la tasa de recambio neuronal en el ES normal es extremadamente baja (Moulton et al, 1970). En condiciones normales, la tasa de regeneración celular está directamente relacionada con la tasa de muerte inducida en un proceso apoptótico. Por lo tanto, una tasa baja de proliferación sugiere una tasa baja de apoptosis (Wang y Halpern, 1982). Otro factor a tener en cuenta, es la rapidez a la cual se desarrolla el proceso apoptótico. Por lo tanto, observar unas pocas células en apoptosis en un corte histológico significa que todo el órgano en el momento de la fijación presentaba una alta cantidad de células en este proceso.

Observaciones preliminares realizadas con microscopía convencional en *Chaetophractus villosus* (ver capítulo 11) han puesto de manifiesto una morfología normal del epitelio sensorial luego de las 6 horas de la administración de Diclobenil. Sin embargo, mediante el uso de herramientas inmunohistoquímicas precisas, hemos podido evidenciar una activa dinámica del ciclo celular en las neuronas sensoriales del OVN. Principalmente el método TUNEL evidenció una moderada cantidad de células en apoptosis en estas muestras. Paralelamente, el número de células en proliferación y/o diferenciación es bajo.

A las 12 horas se pudo verificar un máximo de células en proceso apoptótico. Esto se correlaciona con la presencia de núcleos picnóticos presentes en los cortes histológicos como pudo observarse en el capítulo anterior.

En el primer y segundo día el número de células apoptóticas disminuye marcadamente y aún no se observa un aumento en el número de células en proliferación. Esto coincide, según las observaciones histológicas, con el tiempo de máxima destrucción del epitelio sensorial (desorganización celular y desprendimiento del epitelio de la zona basal).

En el cuarto, quinto y sexto día se observa la máxima cantidad de células en proliferación. Esto se corresponde con aumento en el volumen de las áreas de unión entre epitelio sensorial y no sensorial y presencia de células de núcleo grande y alineación neuronal en la región basal, observadas en los preparados histológicos.

Al sexto día también se pudo observar la moderada presencia de células inmunorreactivas al marcador de diferenciación neuronal.

Los resultados obtenidos presentan una secuencia lógica de eventos producidos durante la acción del Diclobenil. A las 12 horas se observa un pico de apoptosis, entre las 24 – 48 horas se produce la destrucción del epitelio y debido a ello no se observa marca, luego entre el tercer

y el sexto día comienza la proliferación celular, teniendo su máxima expresión entre el quinto y el sexto día, y por último, a partir del sexto día comienza la diferenciación neuronal.

Son muy pocos los estudios que analizan la tasa de muerte celular del epitelio sensorial del OVN (ver introducción). Los pocos existentes están basados no en el efecto directo de una agente químico como en nuestro modelo, sino en modelos experimentales de ablación del BOA o axotomía del nervio vomeronasal. Por lo tanto resulta dificultoso establecer algunas pautas comparativas del “time course” de muerte y recuperación neuronal.

En nuestros experimentos, la tasa de células en apoptosis en el epitelio sensorial del OVN después del tratamiento con diclobenil alcanzó su pico máximo dentro del primer día después del tratamiento (ver Tabla 1). Si bien no existen muchos estudios de apoptosis, algunos resultados muestran que en ratones el pico máximo de muerte de neuronas receptoras del OVN después del corte del nervio vomeronasal, se alcanza a los 2 días, pero la recuperación total del epitelio se alcanza alrededor de 60 días después de la operación (Ichikawa, 1996).

Resultados obtenidos en la comadreja, analizando la proliferación neuronal en el epitelio sensorial del OVN utilizando Bromodeoxiuridine (BrdU) como marcador de células en división luego de la extirpación quirúrgica del BOA, han puesto en evidencia una máxima tasa de proliferación en el día 7 posterior a la operación (Jia and Halpern, 1998). El contraste entre los tiempos de máxima proliferación entre éstos resultados y los nuestros, pueden ser debidos a varios factores, entre ellos a la metodología utilizada para producir la destrucción del OVN. En nuestro modelo experimental, el efecto del diclobenil es directo sobre el epitelio sensorial del OVN lo que justifica que nuestro modelo muestre la máxima tasa de proliferación celular 24 o 48 hs antes que los obtenidos por Jia y Halpern (1998) en comadreja.

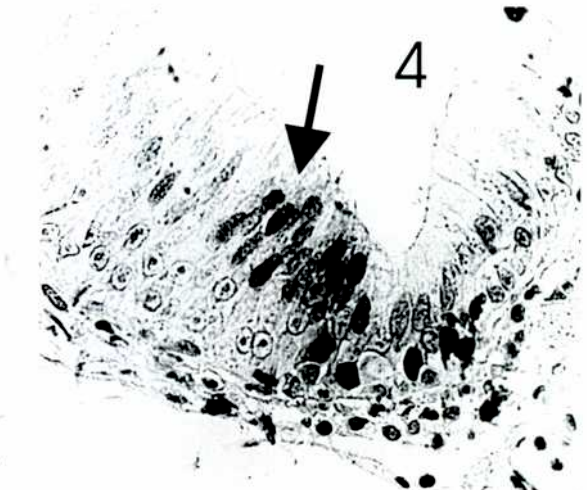
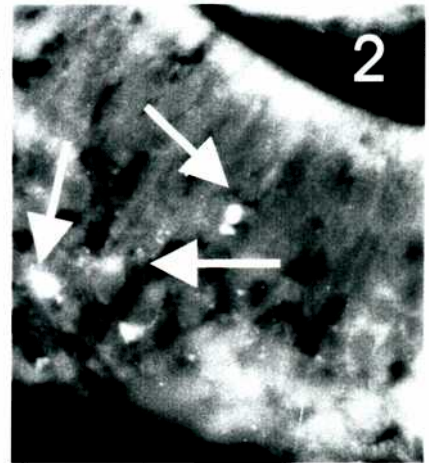
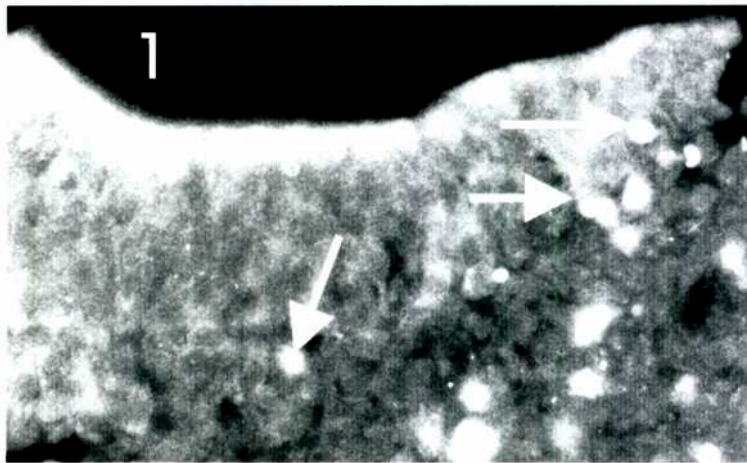


Figura 1: Area de unión del epitelio sensorial del OVN tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a las 12 hs. de la inyección. Técnica de TUNEL para la determinación de células en apoptosis. Las flechas indican la presencia de células apoptóticas en esta región del epitelio. A: 400X

Figura 2: Epitelio sensorial del OVN tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a las 12 hs. de la inyección. Técnica de TUNEL para la determinación de células en apoptosis. Las flechas indican la presencia de células apoptóticas en esta región del epitelio. A: 1000X

Figura 3: Area de unión del epitelio sensorial del OVN tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los cuatro días de la inyección. Determinación inmunohistoquímicas de células en proliferación. Las flechas indican un gran número de células marcadas en las áreas de unión. A: 400X.

Figura 4: Area de unión del epitelio sensorial del OVN tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los 5 días de la inyección. Determinación inmunohistoquímicas de células en proliferación. La flecha indica un gran número de células fuertemente marcadas por medio de esta técnica. A: 1000X.

Figura 5: Area de unión del epitelio sensorial del OVN tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los 6 días de la inyección. Determinación inmunohistoquímicas de células en proliferación. Las flechas marcan células inmunorreactivas a PCNA. A: 400X.

Figura 6: Area de unión del epitelio sensorial del OVN tratado con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificado a los 6 días de la inyección. Determinación inmunohistoquímicas de células en diferenciación. Las flechas indican un gran número de células localizadas basalmente, fuertemente reactivas a GAP 43. A: 1000X.

Capítulo 13: Estudio de las subpoblaciones de neuronas receptoras vomeronasales en el armadillo *Chaetophractus villosus*.

13.1 Introducción

Las proteínas G son proteínas heterotriméricas compuestas por tres subunidades: α , β y γ . Estas proteínas están asociadas a la cara interna de la membrana plasmática con la única e importantísima función de ser el nexo entre receptores específicos transmembrana y enzimas localizadas en el interior de la célula. Las proteínas G, en su forma trimérica, están acopladas a una molécula de GDP mediante la subunidad α , cuando el receptor transmembrana es activado por la unión de un ligando específico en el dominio extracelular del receptor, la molécula de GDP se intercambia por GTP (debido a este proceso se debe el nombre de Proteína G) y las tres subunidades se disocian. La subunidad α es, generalmente, la señal activa e interactúa con varias proteínas intermediarias del mensaje, entre ellas fosfolipasa C, adenilato ciclasa, canales iónicos, etc. En metazoos, existe una gran variedad de Proteínas G unidas a receptores transmembrana (Gerhart & Kirschner, 1997).

Se sabe que proteínas G que presentan una subunidad de tipo $G_{s\alpha}$, estimulan a la adenilato ciclasa, mientras que aquellas que comparten una subunidad del tipo $G_{i\alpha}$ la inhiben. Una tercera clase de Proteína G caracterizada por poseer una unidad $G_{o\alpha}$ tiene la propiedad de activar a la fosfolipasa C.

Por lo expuesto, se concluye que la distribución diferencial de las distintas variantes de proteína G, podría estar directamente relacionada con diferencias regionales en la función celular.

La presencia de proteína G en neuronas del órgano vomeronasal de algunos vertebrados, ha sido recientemente demostrada con el empleo de metodologías inmunocitoquímicas y anticuerpos específicos. En ratas, la presencia de la subunidad $G_{i2\alpha}$ de proteína G ha sido identificada en el nervio vomeronasal y en las capas glomerulares de la región anterior del bulbo olfatorio accesorio (BOA). En contraste, anticuerpos específicos para la subunidad $G_{0\alpha}$ inmunomarcaban específicamente la región posterior del BOA pero no se expresan en el nervio vomeronasal (Shinohara et al., 1992). De este modo, se puso en

evidencia una clara compartimentalización del BOA, con la expresión de Gi2 α en la región anterior y G0 α en la región posterior. Resultados más recientes han puesto en evidencia que esta distribución de subunidades de proteína G se manifiesta también en otros roedores como el ratón (Jia and Halpern, 1996) y el cobayo (Sugai et al., 1997) y en el marsupial, *Monodelphis domestica* (Halpern et al., 1995).

En lo referente al epitelio sensorial vomeronasal, también ha sido demostrada una distribución diferencial de las subunidades de proteína G. En el marsupial *M. domestica* y en ratones las neuronas receptoras del órgano vomeronasal ubicadas en la mitad apical del epitelio sensitivo, reaccionan intensamente a anticuerpos contra proteína G i2 α , mientras que un segundo grupo de neuronas receptoras, ubicado en el área más basal del epitelio cercano a la lámina basal, expresan preferentemente proteína G0 α (Halpern et al, 1995; Jia y Halpern, 1996). Esta distribución diferencial de subunidades de proteína G en el epitelio sensitivo del órgano vomeronasal, ha sido confirmada mediante metodologías de hibridación *in situ* marcando los mRNA específicos (Berghard and Buck, 1996).

Se propuso que esta distribución diferencial de las proteínas G determinando dos subpoblaciones neuronales en el OVN podría representar:

- 1- Dos subclases paralelas con diferentes propiedades bioquímicas y probablemente fisiológicas (Jía y Halpern, 1996).
- 2- Dos grupos de neuronas en diferente estado de desarrollo. Sin embargo, en el ratón esta hipótesis fue descartada, primero porque tanto las neuronas G0 α inmunorreactivas como las Gi2 α inmunorreactivas presentan la misma morfología y expresan OMP que es un marcador de neuronas olfatorias maduras. Segundo, se observó que en ratones adultos, las neuronas receptoras vomeronasales se originan en las áreas de unión de los epitelios sensorial con el no sensorial (Barber y Raisman, 1978). Esto no se corresponde con la observación de dos capas, una más basal inmunorreactiva a G0 y otra más apical que reacciona con Gi (Jía y Halpern, 1996).

Sin embargo, los estudios al respecto han sido realizados sólo en representantes de dos grupos de mamíferos: roedores y un marsupial. No se han realizado estudios al respecto en otros grupos que bien podrían presentar otro patrón de distribución de neuronas receptoras vomeronasales.

En base a lo expuesto ha sido nuestra intención analizar en *Chaetophractus villosus* la presencia de neuronas vomeronasales inmunoreactivas a distintas variantes de Proteína G, su distribución en el epitelio sensorial y las posibles conexiones de éstas neuronas con el BOA. Además, y para determinar si en el armadillo, esta distribución de proteínas G está o no relacionada con neuronas en diferente estado de desarrollo, se realizó inmunohistoquímica en cortes histológicos de órganos vomeronasales de animales tratados con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificados a los 6 días. A este tiempo, el epitelio sensorial está recientemente generado y, por lo tanto, debería expresar en su totalidad, el tipo de proteína G que marcara neuronas jóvenes.

13.2 Metodología

Para este estudio se utilizaron muestras fijadas en Bouin e incluidas en parafina. Luego, fueron cortadas a 5 μ m y montadas en portaobjetos embebidos en gelatina. Se utilizaron dos anticuerpos policlonales generados en conejo contra: 1- la subunidad alfa de la Proteína $G_{i\alpha 2}$ (Santa Cruz Biotechnology) bovina. Este anticuerpo no presenta una reacción cruzada con $G_{i\alpha 1}$ o $G_{i\alpha 3}$ o con otras proteínas G. 2- la subunidad alfa de la Proteína $G_{0\alpha}$ (Santa Cruz Biotechnology) bovina. Este anticuerpo no reacciona en forma cruzada con G_i o con otros tipos de Proteínas G. La técnica de inmunomarcación utilizada fue la siguiente:

Protocolo de trabajo:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Lavar en Buffer Fosfato Salino 0,05 M (PBS), 2 cambios de 5 min.
3. Bloquear las peroxidasas con agua oxigenada al 3% en metanol durante 15 minutos.
4. Lavar en agua bidestilada y luego en PBS.
5. Recuperación antigénica según capítulo 12
6. Lavar en agua destilada seguido de PBS.
7. Bloquear con suero normal de caballo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Sin lavar, incubar con anticuerpos contra la Proteína G (1:100) levantado en conejo, durante 24 horas a 4° en cámara húmeda.
9. Dejar 1 hora a temperatura ambiente.
10. Lavar en PBS.

11. Bloquear con suero normal durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Incubar con el segundo anticuerpo biotinilado (anticonejo, 1:100) durante 45 minutos a temperatura ambiente.
13. Lavar en PBS.
14. Incubar con el Complejo Avidina-Biotina durante 1 hora a temperatura ambiente.
15. Lavar en PBS.
16. Revelar con Diaminobencidina
17. Deshidratar y montar.

Este protocolo fue utilizado sobre cortes de OVN y BOA normales y cortes de OVN de armadillos tratados con Diclorobenzonitrilo (80 mg/kg) y sacrificados a los 6 días de la administración.

13.3 Resultados

El anticuerpo para G_o inmunomarcó, principalmente las neuronas que presentan sus cuerpos celulares distribuidos en toda la capa neuronal del epitelio, sin diferenciar entre un estrato superior e inferior dentro del mismo epitelio (Figura 1). Unas pocas neuronas pudieron ser observadas en el área de unión de los epitelios (Tabla 1). Este anticuerpo marcó las microvellosidades superficiales, la dendrita y el cuerpo celular de las neuronas receptoras, como así también, paquetes de fibras del nervio vomeronasal en la lámina propia (Figura 2).

Por otro lado, el anticuerpo contra G_i marcó principalmente las células basales del epitelio sensorial y células localizadas en el epitelio sensorial muy cerca de las áreas de unión (Tabla 1). No se pudo observar inmunomarca en la capa neuronal del epitelio ni en el nervio vomeronasal (Figuras 3 a y b).

En el borde posterior del bulbo olfatorio accesorio se pudo observar una moderada inmunomarcación con proteína G_o , mientras que con los anticuerpos para la Proteína G_i no se observó marcación (Tabla 1) (Figura 4).

Tabla 1: Inmunorreactividad del órgano vomeronasal y el bulbo olfatorio accesorio frente a los dos tipos de proteína G.

Anticuerpo	Organo Vomeronasal	Bulbo Olfatorio Accesorio
------------	--------------------	---------------------------

	Células basales	Capa neuronal	Area de unión	Anterior	Posterior
Proteína Go		+++	+		++
Proteína Gi	+++		+++		

+++ Intensa inmunomarca.

++ Moderada inmunomarca.

+ Débil inmunomarca.

Sin inmunomarca

Para determinar la relación entre la expresión de las distintas proteínas G y el estado de madurez de las neuronas, se utilizaron OVN de animales tratados con diclobenil. En estos cortes se pudo observar una abundante cantidad de células inmunomarcadas con Gi en la capa basal, la capa neuronal y en menor grado, en las áreas de unión (Figuras 5, 6 y 7). No se pudo observar marca en ninguna región del epitelio sensorial del OVN utilizando G₀ (Tabla 2).

Tabla 2: Inmunomarcación contra los dos tipos de proteínas G en OVN tratados con diclobenil.

Anticuerpo	Organo Vomeronasal + Diclobenil		
	Células basales	Capa neuronal	Area de unión
Proteína Go			
Proteína Gi	+++	+++	++

+++ Intensa inmunomarca.

++ Moderada inmunomarca.

+ Débil inmunomarca.

Sin inmunomarca

Los resultados muestran claramente que en el epitelio sensorial del OVN del armadillo existe una distribución diferencial de los dos tipos de proteínas G. A diferencia de lo que ocurre en ratones y en el marsupial *Monodelphis doméstica* (Halpern et al, 1995; Jia y Halpern, 1996), los dos tipos proteínas G no se distribuyen formando un estrato superior y otro inferior dentro de la misma capa neuronal, sino que en el armadillo, la proteína G0 marca la capa neuronal y la Gi la capa de células basales y las áreas de unión. Este resultado sugirió la posibilidad de que en el armadillo, la proteína G0 esté relacionada con neuronas maduras mientras que Gi esté en relación con neuronas recientemente formadas. Esta hipótesis se apoya además, en:

- 1- que los fascículos nerviosos vomeronasales se marcaban positivamente con G0 y no con Gi,
- 2- que solamente se veía inmunomarca con G0 en la región posterior del BOA y no se observaba marca con Gi, por lo tanto, los axones de neuronas Gi positivas inmaduras todavía no llegaban a formar la conexión con el BOA.

A raíz de esto, y para confirmar la hipótesis, utilizamos a OVN de animales tratados con diclobenil. Como se mencionó en los capítulos 11 y 12, a los seis días de la inyección con diclobenil, el epitelio sensorial presentaba un aspecto normal con una alta reactividad a marcadores inmunohistoquímicos de proliferación celular y diferenciación neuronal. Estos resultados sugieren que el epitelio sensorial en estas circunstancias, está totalmente formado por neuronas jóvenes. Si se cumpliera que Gi se expresa en neuronas recientemente formadas y G0 en neuronas maduras, se debería verificar una gran cantidad de neuronas Gi positivas en el epitelio y una muy baja cantidad de neuronas G0. Los resultados obtenidos indican una muy alta proporción de células Gi inmunorreactivas y una muy baja cantidad de células G0. Por lo tanto, no podríamos rechazar la hipótesis propuesta en este capítulo.

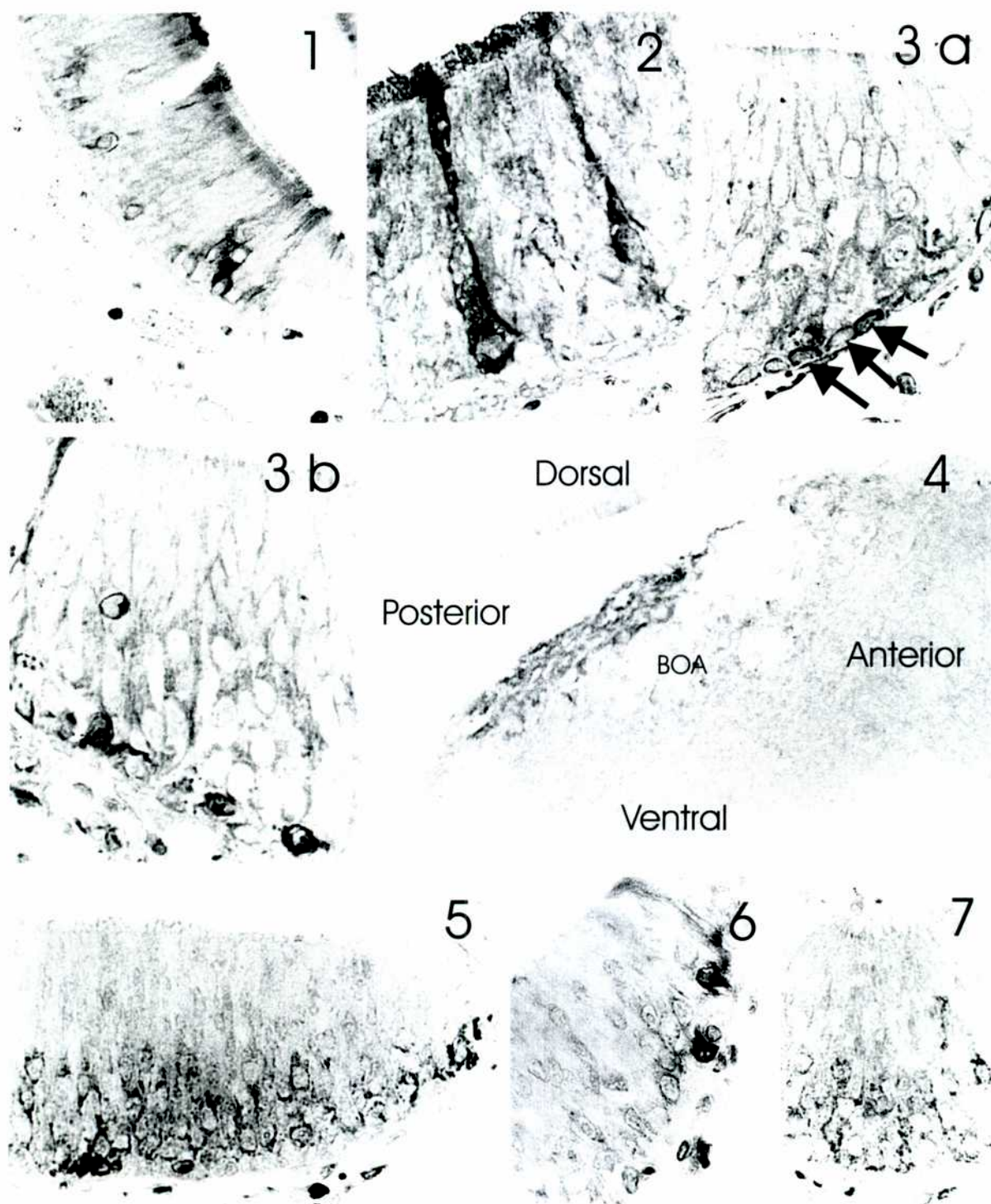


Figura 1: La fotografía muestra la presencia de células inmunoreactivas para la proteína G0 en el área de unión del epitelio sensorial. A: 400X.

Figura 2: Neurona con reacción positiva contra la proteína G0. A: 1000X.

Figura 3: (a) y (b). Las flechas indican células basales localizadas en el área de unión inmunomarcadas con el anticuerpo contra la proteína Gi. A: 1000X.

Figura 4: Inmunorreacción positiva contra la proteína G0 de la región posterior del bulbo olfatorio accesorio (BOA). A: 1000X.

Figura 5: Inmunomarca positiva contra la proteína Gi en el epitelio sensorial del OVN de animales tratados con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificados a los 6 días de la inyección. A: 400X

Figura 6: Inmunomarca positiva contra la proteína Gi en el área de unión del epitelio sensorial del OVN de animales tratados con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificados a los 6 días de la inyección. A: 400X.

Figura 7: Inmunomarca positiva contra la proteína Gi en el epitelio sensorial del OVN de animales tratados con diclobenil (80 mg/kg) y sacrificados a los 6 días de la inyección. A: 400X.

Capítulo 14: Influencia de la aferencia vomeronasal sobre la actividad bioeléctrica de los Bulbos Olfatorios y del Neocortex frontal de *Chaetophractus villosus*. Exploración de una posible nueva función del Organo vomeronasal.

14.1 Introducción

Una reflexión sobre las conexiones aferentes y eferentes del Organo Vomeronasal, nos obliga a prestar atención a toda la posible gama de funciones que podrían postularse.

Las conexiones ya han sido tratadas en detalle en capítulos anteriores, deseamos destacar la influencia del OVN sobre la Amígdala y distintas regiones del Hipotálamo. Ahora bien, es sabido que la Amígdala es una estructura muy importante en la expresión emocional y el hipotálamo está involucrado en un grupo numeroso de funciones (control hipofisiario, termorregulación, sueño lento, sueño paradójico, hambre, saciedad, etc.). Los estudios realizados hasta el momento se han referido únicamente al papel del OVN sobre la cópula y la reproducción. Sin embargo, pensamos que las conexiones hipotalámicas en regiones involucradas en los mecanismos fisiológicos del sueño, nos ha sugerido la posibilidad de que este órgano desempeñe algún papel en la regulación del mismo. Por este motivo, hemos decidido estudiar los efectos de la ablación del OVN sobre la actividad bioeléctrica cerebral desplegada durante la vigilia, sueño lento y sueño paradójico.

Por otra parte, cabe recordar que el OVN está fuertemente innervado por el 5º par craneal. Es probable que la ablación de ese órgano implique una modificación de la eferencia trigeminal al tronco cerebral.

Características neurofisiológicas de *Chaetophractus villosus*

a- Actividad Bioeléctrica de los Bulbos Olfatorios y del Neocortex Frontal durante la Vigilia.

En los Bulbos Olfatorios (BO) fue descripta la presencia de un nuevo tipo de actividad bioeléctrica, en el rango de las frecuencias α (8-12 Hz) denominada *actividad Rino-Centrífuga-Génica (RCG)* (García Samartino y Affanni, 1976). Las características y propiedades de dicha actividad son: aparece en la vigilia relajada, su aparición requiere tanto de la aferencia periférica como de la central y la ausencia de alguna de estas, impide su

aparición y este ritmo también desaparece durante el sueño (Affanni y García Samartino, 1984).

En los Tubérculos Olfatorios (TO), la actividad bioeléctrica posee las siguientes características: durante la vigilia relajada se registra un ritmo muy conspicuo de 8-12 Hz. Durante la vigilia alerta y olfateo, este ritmo se hace menos marcado y puede observarse una actividad sinusoidal olfatoria, aunque menos conspicua que en el BO. Las variaciones del TO están en relación con la del BO. Si en el BO el ritmo *RCG* es marcado, lo mismo ocurre en el TO. En cambio, cuando el animal se excita o cae en sueño, este ritmo desaparece simultáneamente en ambas estructuras (García Samartino et al, 1987).

En la Corteza Piriforme, durante la vigilia activa, se observó una actividad de base relativamente baja e irregular (28-32 Hz, 15-20 μ V) interrumpida por salvas de Actividad Sinusoidal Inducida (32-36 Hz, 130-170 μ V), semejantes a las descritas en el BO. Las salvas variaron de amplitud y duración de acuerdo a las características del olfateo. La actividad bioeléctrica de los BO y de la Corteza Piriforme no era exactamente simétrica. Durante la vigilia tranquila se registro un ritmo conspicuo de 8-12 Hz y de 25-50 μ V (García Samartino, 1983).

b- Características del Ciclo Vigilia-Sueño.

Las características cuantitativas de la duración de las fases del *Ciclo Vigilia-Sueño* (CVS) en *Chaetophractus villosus* fueron las siguientes: Los animales estudiados permanecieron, en promedio, en vigilia el 14,6 % del día; el 59,4 % correspondió a sueño lento, el 18,7 % al sueño rápido y el restante 7,3 % a períodos de transición (García Samartino et al, 1974).

Si la temperatura es menor de 28 °C, la fase de sueño lento se caracteriza por la aparición de un temblor que abarca todo el cuerpo y desaparece durante el sueño paradójico (Affanni et al, 1972).

c- Actividad Bioeléctrica de los Bulbos Olfatorios y del Neocortex Frontal durante el Sueño

Durante las fases de sueño y en ausencia de aferencia olfatoria periférica se descubrió experimentalmente la presencia de un tipo peculiar de actividad eléctrica sinusoidal en las áreas rinencefálicas. Este ritmo fue llamado *actividad hipócnica Reo-Privo-Génica* (RPG) debido a que aparece durante el sueño lento y el rápido en animales con destrucción de la

mucosa olfatoria o con supresión de la corriente aérea nasal (Affanni et al, 1977b; Affanni y García Samartino, 1984).

La actividad bioeléctrica de los tubérculos olfatorios durante el sueño, posee las siguientes características: durante el sueño lento no se observa el ritmo α característico de la vigilia tranquila y el tubérculo olfatorio muestra ondas lentas, especialmente en la banda θ , y actividad rápida tipo β . Durante el sueño rápido tampoco se observa el ritmo α y ondas sinusoidales de alrededor de 30 Hz dominan el trazado (García Samartino et al, 1987).

Durante el sueño lento, la Corteza Piriforme tiene una actividad bioeléctrica sinusoidal semejante a la de vigilia. Las salvas sinusoidales fueron de menor amplitud y de forma más regular. No se registro el ritmo α característico de la vigilia tranquila. Mientras el peludo estaba en sueño rápido, la actividad de la Corteza Piriforme fue semejante a la registrada durante la fase de vigilia. Se registraron salvas sinusoidales inducidas de baja amplitud García Samartino (1983).

Origen e importancia del ritmo RCG y de la actividad RPG

Cervino (1997) estudia las características bioeléctricas del ritmo RCG y de la actividad RPG de *C. villosus*. En dicho trabajo se analiza como las aferencias periféricas y centrales a los BO influyen y/o determinan el origen de ambas actividades electroencefalográficas. Además estudia los efectos de distintas dosis de clorhidrato de ketamina, etanol y melatonina sobre dichos ritmos.

También en dicho trabajo, se hipotetiza acerca del posible origen de ambos ritmos. Este autor considera que el ritmo RCG *“podría ser la representación bioeléctrica de la inhibición que ejercen los centros nerviosos superiores, a través de fibras centrífugas, para disminuir la excitación producida por el ingreso de información periférica desde la mucosa olfatoria, representada por la ASI. Durante el sueño los mecanismos responsables para su generación son contrarrestados o no operan. Para que se ejerza dicha acción, intervendrían receptores NMDA”*.

Con respecto a la actividad RPG, también denominada **actividad hipócnica**, Cervino (1997) propone que *“hay varios centros desde donde parten influencias inhibitoras y facilitadoras sobre el bulbo olfatorio, predominando las primeras. Durante la fase de sueño, la inhibición centrífuga bloquea la aparición de ASI provocada por la estimulación cíclica de la mucosa olfatoria. Además las aferencias olfatorias compensarían o inhibirían la*

actividad facilitadora que proviene de otras regiones del SNC. Cuando la estimulación cíclica está ausente debido a la desaferentación periférica, al faltar la actividad moderadora, se libera la acción facilitadora que se debe ejercer durante el sueño sobre el bulbo olfatorio, provocando la actividad sinusoidal RPG.

En estos últimos años se ha prestado especial importancia a las **ondas gamma**. Estas ondas poseen una banda frecuencial con un rango que va desde los 30-40 Hz hasta los 100-120 Hz, según los distintos autores. En un principio fueron descritas en el sistema olfatorio, pero rápidamente fueron también estudiadas en el sistema visual y auditivo. Su función no está aún totalmente dilucidada, pero en general se está de acuerdo en que estarían implicadas en la transferencia de información entre una región de la corteza a otra, y también se las han relacionado con la conciencia y/o captación de conocimientos.

En *C. villosus* pueden identificarse dos tipos de actividades dentro de la frecuencia gamma en el sistema olfatorio (Cervino, 1999), que estarían implicadas funcionalmente en la transmisión de información entre una región y otra:

- la actividad sinusoidal inducida (ASI), ya estudiada por otros autores (Adrian, 1942 y 1950; Eeckman and Freeman, 1990; Ketchum and Haberly, 1991), íntimamente relacionada con la función olfatoria y con la integración y transferencia desde los **BO** de información odorante hacia el resto del sistema olfatorio;
- la actividad reo-privo-génica (RPG), descrita inicialmente por Affanni y García Samartino (1984) y cuyo estudio se profundizó en Cervino (1997). Hasta el presente es la primera vez que se describe este tipo de actividad gamma en animales durante el sueño, en este caso con desaferentación olfatoria periférica.

En esta parte de la Tesis nos proponemos:

Investigar los efectos de la desaferentación vomeronasal producida mediante la ablación de los OVN sobre la actividad bioeléctrica de los bulbos olfatorios y neocortex frontal durante el sueño y la vigilia.

Dichos efectos serán estudiados a lo largo de los tres estados cerebrales fundamentales: la Vigilia (V), el Sueño Lento(SL) y el Sueño Paradójico (SP).

Justificación de las zonas elegidas:

La razón de la elección de las estructuras mencionadas para este estudio, se fundamenta en la necesidad de averiguar si existe algún tipo de relación funcional entre el sistema olfatorio y el vomeronasal. Esta necesidad se basa en:

- 1- El OVN comparte junto con el epitelio olfatorio buena parte de la cavidad nasal.
- 2- Ambos sistemas son fuertemente influidos por sustancias transportadas por el aire en cada movimiento respiratorio o de olfateo. Ambos son sistemas quimiorreceptores de la cavidad nasal.
- 3- En la mayoría de los animales el BOA está en estrecha relación de contigüidad con el BOP.
- 4- El neocortex frontal es fuertemente influido por la aferencia olfatoria, hasta tal punto que la actividad sinusoidal inducida se propaga hasta esa área cortical.

Justificación de la extensión de este estudio a los estados de Vigilia, Sueño Lento y Sueño Paradójico:

Este estudio puede contribuir notablemente a consolidar nuestros conocimientos sobre el papel de la aferencia sensorial en la regulación de esos tres estados cerebrales. Cabe señalar que ha sido investigada la acción de la privación sensorial por ablación en: Sistema auditivo, Sistema visual, Sistema somatosensorial y Sistema olfatorio (Velluti, 1998). No existen, hasta donde sabemos, estudios de los efectos de la desaferentación vomeronasal por ablación sobre dichos estados.

14.2 Metodología

Este estudio de la actividad bioeléctrica cerebral de *C. villosus* durante la vigilia y sueño se realizó sobre 5 animales hembras, adultas, y con pesos comprendidos entre 3,220 y 4,300 kg. Los registros abarcaron los distintos meses entre junio y diciembre de 1999.

El implante de electrodos y mantenimiento postoperatorio se realizó siguiendo a Cervino (1997).

Técnicas quirúrgicas utilizadas.

1- Implante de electrodos.

Confección de electrodos: Para los experimentos realizados para esta Tesis, se utilizó un tipo especial de electrodos. Estos consistían en alfileres entomológicos de acero inoxidable Nro. 0 (diámetro 0,4 mm) al cual se le soldaba a modo de tope una cánula de acero inoxidable de 2 mm de largo, confeccionada con agujas hipodérmicas 21GX1, de tal modo que quedara libre 3 mm de alfiler. En el otro extremo se le suelda un cable para su conexión a la ficha. Luego se sueldan todos los electrodos a implantar a una ficha hembra DB15 (15 pines).

Técnica quirúrgica:

- 1.- Bajo anestesia profunda se procede a envolver el cuerpo del animal con una bolsa plástica, para ayudar a su termorregulación. Se lo coloca decúbito-ventral sobre la mesa de operaciones.
- 2.- Con povidona iodada se desinfecta el escudete cefálico óseo y se procede a marcar en su superficie la zona a incidir, que resulta de una figura trapezoidal (Fig. 1).
- 3.- Con un torno colgante de 15.000 RMP y una sierra circular (diámetro 22 mm) se realiza un corte sobre los lados de la figura trapezoidal. Con ayuda de una legra se levanta esta porción del escudete y con un bisturí se separan los tejidos blandos subcutáneos.
- 4.- Con bisturí y legra se extrae el panículo adiposo que cubre esta región del cráneo y se procede a la hemostasia de los vasos sangrantes.
- 5.- Una vez expuesta la aponeurosis temporal que llega a la línea media del cráneo, con legra se van separando gradualmente los músculos epicraneos que se insertan en los huesos parietales y frontales. Con gasa se limpian bien los huesos del cráneo, librando al hueso de restos de tejido blando, para poder implantar correctamente los electrodos y lograr una buena fijación del implante.
- 6.- Con una fresa de cabeza redonda (diámetro 2,20 mm) se realiza una perforación sobre el cráneo para colocar un tornillo de acero inoxidable, el cual sirve de anclaje del implante, cerca del extremo anterior del arco zigomático.
- 7.- Con la misma fresa se realizan dos perforaciones en la parte posterior del escudete cefálico para fijar con tornillos de acero inoxidable la ficha de conexión. Uno de estos tornillos tiene un cable soldado para luego ser utilizado como referencia a tierra en los registros.
- 8.- En base a la morfología del cráneo y la neuroanatomía del SNC del peludo se procede a señalar la ubicación de los electrodos para registro del EEG. El implante de rutina consistió en un 1 ó 2 pares de electrodos sobre cada BO (hueso frontal) y un par de electrodos sobre la NC

frontal (hueso parietal rostral) y un par más caudales (hueso parietal caudal). Estos implantes son simétricos en los Hemisferios Cerebrales derecho e izquierdo (Figura 1).

9.- Para colocar los electrodos se perfora el cráneo con una aguja entomológica Nro. 00 y con una pinza, a presión, se colocan los electrodos que ya están soldados a la ficha de conexión.

10.- Con alambre se fija la ficha de conexión a los tornillos sobre la región caudal del escudete cefálico. Luego con acrílico dental (Súbiton®)¹ se fijan los electrodos al cráneo, incluyendo el tornillo de anclaje. También con acrílico se fija la ficha de conexión a los tornillos y al escudete cefálico. Finalmente con resina se cubre la región del implante y de la ficha de conexión, quedando todo el conjunto aislado eléctricamente y de la humedad ambiente.

11.- Los tejidos expuestos se cubren con sacarosa (azúcar común) para inhibir la proliferación de microorganismos y para ayudar a la rápida cicatrización (granulación).

La duración de esta intervención quirúrgica es de aproximadamente 2 hs.

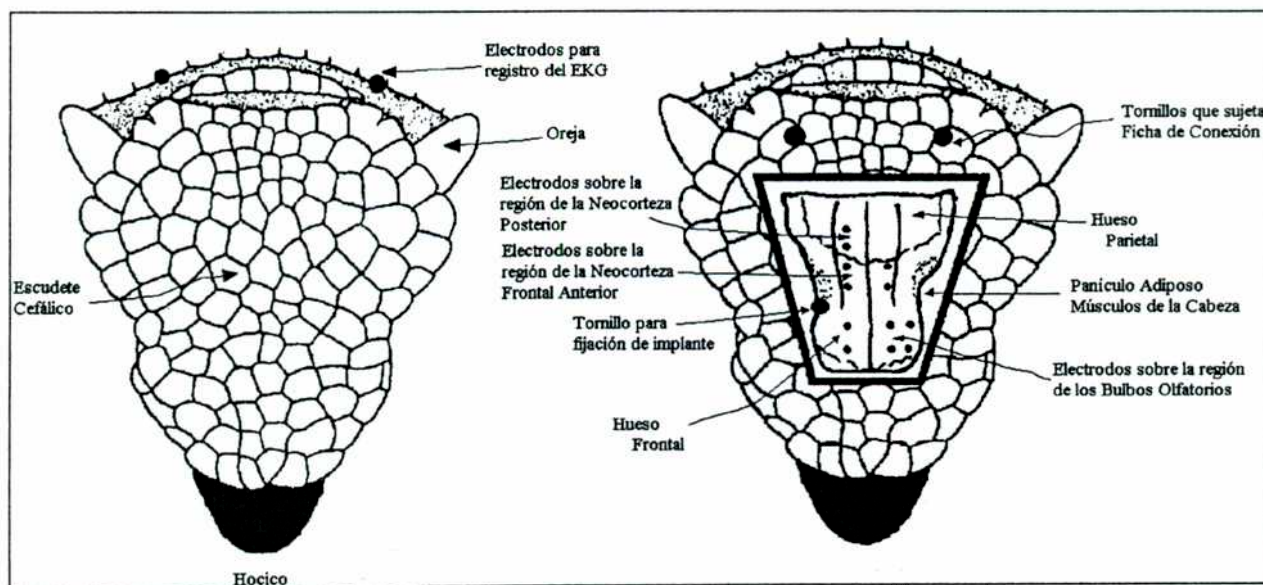


Figura 1: Ubicación de los electrodos para el registro de actividad bioeléctrica de bulbos olfatorios y neocorteza en el peludo *Chaetophractus villosus*. A la derecha se observa la región de implante luego de remover parte del escudete cefálico óseo y los tejidos subyacentes.

¹ Este acrílico al fraguar fija fuertemente el implante al cráneo y a la vez hace las veces de aislante eléctrico.

2- Técnica de destrucción del Organo Vomeronasal de *Chaetophractus villosus*

Los armadillos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de Ketamina (50 mg/ml) en una dosis de 40 mg/kg., seguida de una inyección intraperitoneal de un barbitúrico (Tiopental sódico 1g/10 ml) en una dosis de 50 mg/kg. El animal anestesiado fue colocado en un aparato estereotáxico con el objeto de inmovilizar completamente la cabeza. La boca es abierta con un lazo tenso que sujeta la mandíbula inferior (Figura 2). Se realiza una incisión longitudinal en la mucosa que recubre al paladar de aproximadamente 2 cm y se lo separa cuidadosamente del paladar óseo. Mediante el uso de una fresa pequeña de cabeza redonda incorporada a un torno eléctrico se realiza la abertura del paladar óseo (Figura 3). Para destruir el órgano vomeronasal se cambia la fresa del torno por una de menor tamaño y se procede a la destrucción mediante el fresamiento del mismo. Concluida la destrucción, se cierra la abertura del paladar óseo con una placa de acetato y una capa delgada de acrílico líquido (Figura 4). Una vez solidificado el acrílico se sutura la mucosa del paladar (Figura 5). El animal es alimentado con una dieta líquida durante un período de tres días para facilitar la cicatrización de la incisura.

Luego, mediante la examinación de cortes histológicos seriados de la cavidad nasal se pudo comprobar una eficaz destrucción del órgano vomeronasal.

Esta técnica ofrece enormes ventajas frente a las tradicionales las cuales accedían al órgano vomeronasal mediante una incisión dorsal en el hocico del animal. Dichas ventajas son la destrucción selectiva del órgano vomeronasal sin lesionar la mucosa olfatoria y una rápida recuperación del animal.

3- Técnica de desaferentación olfatoria periférica con Sulfato de Zinc (SZ)

- 1.- Bajo anestesia se coloca al animal decúbito-dorsal, sobre un plano inclinado de 45°.
- 2.- Se mantiene abierta la boca y se estira la lengua para que no interfiera en la instilación de SZ por el extremo posterior de cada cavidad nasal, a través del meato nasofaríngeo.
- 3.- Con una cánula metálica de 10 cm de largo y un extremo curvado (Figura 6) se pasan 10 ml de una solución de SZ al 10 % por cada cavidad nasal. Esto se realiza deslizando por el paladar a la cánula hasta que su porción curva penetre en cada coana. Se instila la solución con una jeringa. El líquido viaja en sentido postero-anterior a través de la cavidad nasal, desagotando por las narinas.

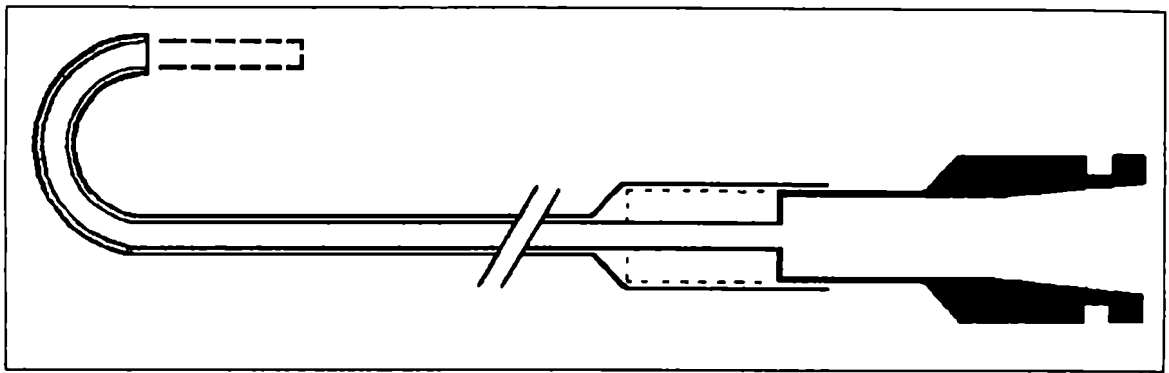


Figura 6: Esquema del modelo de cánula utilizada para la instilación del sulfato de zinc por la mucosa olfatoria

4.- Se enjuaga la cavidad bucal con agua corriente, se lo deja unos minutos en la posición indicada, y luego se lo mantiene suspendido cabeza abajo para que todo el SZ salga por las narinas y no alcance luego los pulmones.

4- Sección bilateral de los pedúnculos olfatorios

Esta intervención se realizaba en animales con electrodos para EEG ya implantados. Por ello, durante el implante, se dejaba un surco en el acrílico entre el grupo de electrodos sobre el BO y el grupo sobre NC.

1- Bajo anestesia profunda se procede con un torno a perforar el hueso hasta llegar a la duramadre, teniendo cuidado de no mover el implante ya realizado.

2- Luego con una tijera para oftalmología se realiza un corte en las meninges.

3- Se introduce por la ranura una espátula de acero inoxidable de punta redondeada y roma con una inclinación antero-posterior de 60° con respecto al plano de la cabeza. Se hunde el instrumento hasta sentir el piso del cráneo y con movimientos laterales se secciona el pedúnculo olfatorio, teniendo cuidado de seccionar el tracto olfatorio lateral, bien lateral-externo, y de no cortar los vasos mayores que irrigan al BO.

4- Finalmente se rellena la ranura con esponja hemostática de gelatina (Spongostán®) y se sella el espacio con acrílico dental.

5- Implante de electrodos para EKG.

Bajo anestesia se implantaron electrodos de acero inoxidable. Se utilizó una derivación bipolar, con ambos electrodos fijados en la región escapular.

Postoperatorio

Al finalizar todas las intervenciones quirúrgicas, se les administró antibiótico: Gentasur Retard® (Lab. BIOSUR S.A.) inyectable (*i.m.*) en una dosis de 10 mg/kg. Se prosiguió esta rutina día por medio durante una semana. Al finalizar una bulbectomía o una sección de PO, se aplicó un antiinflamatorio no esteroideo (Bencidamina 0,2 ml/kg).

Los animales eran trasladados del quirófano a la cámara de registro (25 °C) para su recuperación, la cual se prolongaba de 2 a 3 días según la intervención realizada sobre el animal.

A los 3-4 días del implante de electrodos se realizaba una limpieza de la región del implante bajo anestesia superficial. Con agua oxigenada 10 vol. y gasa se removía el tejido muerto, colocándose luego crema cicatrizante para acelerar el proceso de granulación.

Registro, procesamiento y análisis de las señales del EEG y EKG.

1- Sala de registro

La sala de registro se encuentra en el Laboratorio de Electrofisiología del Instituto de Neurociencia (CONICET-UBA). Consta de una sala con los equipos de registro y procesamiento de las señales y una cámara de registro.

Cámara de registro: Los animales eran mantenidos durante el período de registro dentro de una cámara aislada térmicamente, confeccionada con paneles de chapa de zinc y telgopor. Las medidas son: 2 m x 2 m x 2 m. Esta cámara estaba aislada del ruido externo (cámara silenciosa). Por estar conectada a tierra por medio de una jabalina, la cámara actúa de Caja de Faraday (Figura 7).

Dentro de la cámara se ubicó una cuba de fibra de cemento de 1,50 m de diámetro y 0,80 m de altura, con aserrín de madera en el fondo, en donde era mantenido el animal para el registro de variables fisiológicas. La viruta se recambia periódicamente y la alimentación seguía el ritmo que mantenían previamente.

El fotoperíodo se regula por medio de un timer y una línea de 12 V con una lámpara de 45 W. Durante las experiencias el período luz-oscuridad fue de 12:12, encendiéndose la lámpara a las 07:00 hs.

Acoplado a la cámara hay un sistema de ventilación forzada, calefacción y refrigeración que permite manejar la temperatura del interior entre los 2° y 40°C. Además si es preciso, se puede diagramar un ritmo diario de temperaturas altas y bajas, acoplado o no al fotoperíodo.

Para observar y estudiar el comportamiento del animal durante los distintos experimentos, se acopló a la cámara de registro un circuito cerrado de televisión, cuyo monitor se encuentra al lado de la pantalla de registro. Esto fue importante pues permitió mantener al animal aislado del ambiente exterior y se pudo seguir su actividad de vigilia, fases del sueño, olfateo, movimientos, etc..

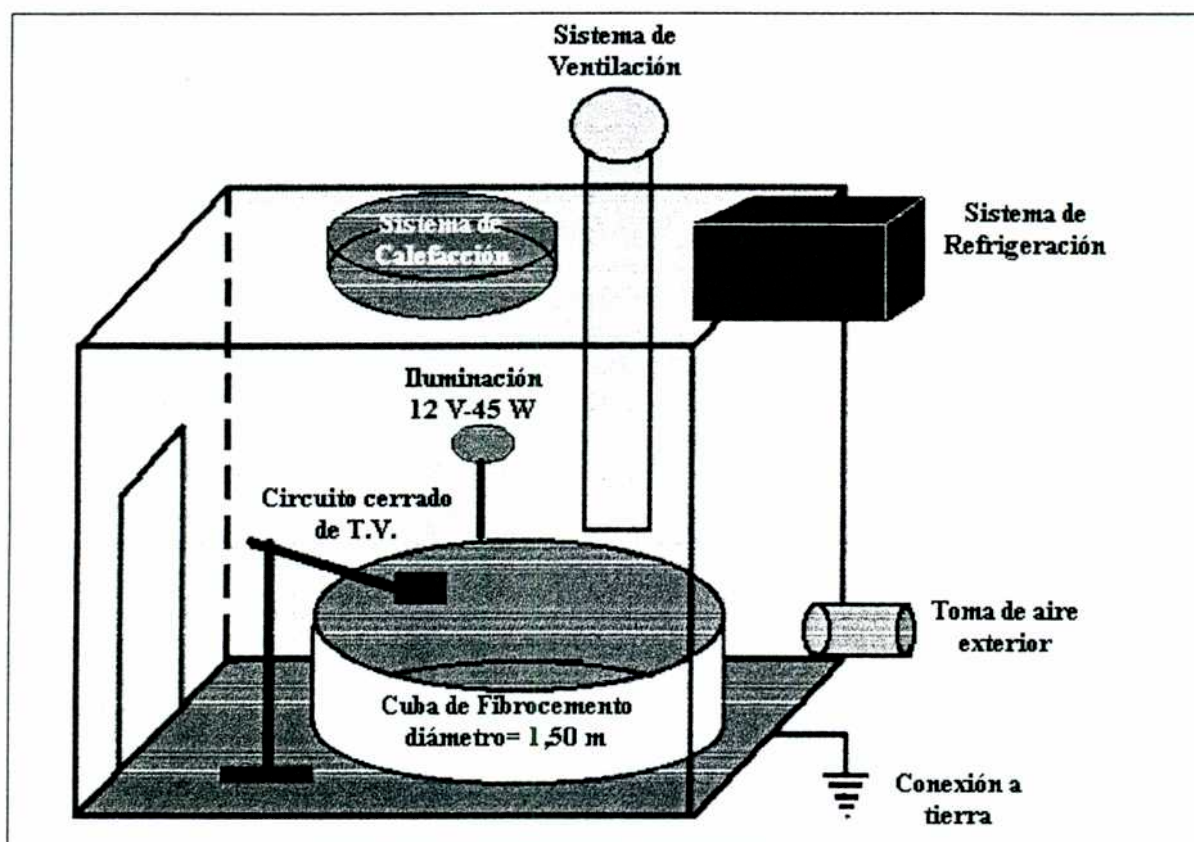


Figura 7: Esquema de la cámara de registro utilizada para el registro de la actividad bioeléctrica cerebral de *Chaetophractus villosus*. El animal se ubicaba dentro de la cuba de fibrocemento con un colchón de viruta de madera.

2- Técnica de Registro y Metodología.

Las señales del EEG ya amplificadas fueron filtradas con un Filtro Pasa Bajos (FPB) $CT = 0,3$ seg (frecuencia de corte 0,53 Hz). El FPB fue utilizado en 55 Hz. Siempre se registró con filtro eliminabanda en 50 Hz.

Para los registros realizados durante el trabajo de investigación de la presente Tesis se utilizó un equipo amplificador EXXER de 8 canales diferenciales, acoplamiento AC. Ganancias: 625 hasta 120.000 veces. FPA: constante de tiempo (CT) = 1,0; 0,3; 0,1 y 0,03 seg

ó 2 polos de 0,5 a 30 Hz. FPB: 40 a 8.800 Hz. Filtro NOTCH 50 Hz. Con sistema de calibración.

Una vez acondicionada y monitoreada la señal, se procedió a calibrar² al sistema de registro con una señal de 100 μV_{pp} . Además de esta *calibración absoluta*, el sistema de adquisición utilizado en la presente Tesis realiza una *calibración relativa*: cuando se realizan registros multicanales o múltiples registros de un mismo individuo, cualquier diferencia en la ganancia de los distintos canales puede representar, al analizar luego los resultados, diferencias que no se corresponden a la propia actividad cerebral. Al calibrar todos los canales con la misma señal, el programa de registro puede automáticamente corregir las diferencias de ganancia entre todos los canales.

Las señales son digitalizadas por medio de un conversor analógico/digital (C A/D), presente en la placa adquisidora. La frecuencia de muestreo (f_M) más utilizada fue de 256 Hz. Los pasos para el proceso de adquisición son controlados desde programas instalados en ordenadores. A su vez el sistema de acondicionamiento-adquisición de la señal provee filtros antialiasing (ver luego) que se programan automáticamente según la f_M seleccionada. En el presente trabajo de investigación se utilizó una computadora 486DX2 (16 Mb de memoria RAM), monitor color e impresora láser.

Esta computadora tiene montada una placa adquisidora Burr-Brown, PCI 20098C (Intelligent Instrumentation) de 32 canales y resolución de 12 bits (1 parte en 4095). También tiene acoplado un periférico con discos rígidos removibles de 100 Mb (Zip Iomega) para el almacenamiento del registro.

Sobre esta computadora corre el programa de computación Rhythm 10.0d (Stellate Systems, 1995), el cual permite adquirir y procesar registros electrofisiológicos.

3- Métodos de procesamiento y análisis de la señal

Una vez que las señales fueron registradas y almacenadas, con posterioridad se realizó una inspección visual de los trazados, analizando su forma, frecuencia y amplitud. En porciones seleccionadas se aplica la Transformada Rápida de Fourier: permite la separación de varios ritmos y estima su frecuencia independientemente unas de otras, una tarea dificultosa de realizar visualmente si varios ritmos ocurren simultáneamente. Luego se obtenía un espectro de potencia (EP) y sus parámetros asociados.

² Cuando se registran distintas magnitudes físicas, por ejemplo potenciales bioeléctricos, es fundamental conocer el valor de amplitud que va tomando la variable que se mide en el tiempo, para saber su valor

El procesamiento y análisis de registros neurofisiológicos con ordenador tiene varias ventajas sobre el método tradicional de registrar e interpretar dichas señales (Gotman, 1990):

- 1.- la interpretación visual es a menudo cualitativa y subjetiva;
- 2.- el registro e interpretación de largos registros de EEG sobre papel son tediosos y demandan un gran esfuerzo por parte del operador;
- 3.- la interpretación de los resultados del estudio de la actividad bioeléctrica cerebral por parte de una persona no familiarizada con dichos estudios se ve enormemente facilitada;
- 4.- permite realizar filtrado digital de una señal original, permitiendo seguir en el tiempo una determinada componente de la señal;
- 5.- al obtener parámetros de la señal, el procesamiento digital de las señales permiten realizar procesos estadísticos.

Análisis Frecuencial de la Señal Registrada:

Visualmente se pueden reconocer ondas complejas, en las que trata de ubicar ondas completas, es decir, desde que cruzan la línea de base hasta que vuelven a cruzar, o cuando, por encima o por debajo de la línea de base, cambian de sentido. Un análisis frecuencial muestra la totalidad de los componentes frecuenciales de dicha señal compleja, así como también su grado de incidencia.

La enorme cantidad de cálculos necesarios hizo que sólo la llegada de la moderna computación permitiera su aplicación corriente en el análisis de ondas de diverso tipo: fluidos, ondas sonoras, ondas del EEG, etc.. El Teorema de Fourier sostiene que una serie temporal como el EEG puede ser considerada como la suma de un conjunto de ondas sinusoidales de diferentes frecuencias, amplitudes y fases. En el caso del EEG, como la señal está limitada a un rango frecuencial finito, puede ser representada por un conjunto finito de ondas sinusoidales, a partir de las cuales puede reconstruirse la señal original.

En electrofisiología se utiliza una variante que se llama “Fast Fourier Transformation” = FFT (Cooley y Tuckey, 1965), es decir, “Transformada Rápida de Fourier”: es un algoritmo matemático que computa la Transformada de Fourier en forma rápida aún en una computadora personal. Han surgido algunas mejoras, pero sigue siendo la concepción básica del análisis. El resultado al computar la FFT es un coeficiente de Fourier (amplitud y fase de

*absoluto, para estudios descriptivos o para comparar dicho valor antes y después de un tratamiento Para ello será necesario **CALIBRAR** al sistema de registro por medio de una señal de voltaje conocido.*

la onda sinusoidal) asociado a cada frecuencia. El proceso por el cual se reconstruye la señal original a partir de la serie de coeficientes se denomina Transformada Inversa de Fourier.

De esta forma, gracias a la aplicación de la FFT se puede lograr la *cuantificación* de la señal periódica que se está registrando, la cual consiste en descomponer una señal que varía en el tiempo, por ejemplo el EEG convencional, en sus componentes frecuenciales, en lugar de enviarla directamente al papel. Es decir, en lugar de ver la variación de voltaje a lo largo de un período de tiempo, se obtendrá *cuánto hay de cada frecuencia en dicho período, para uno o más canales*.

Una vez que la señal fue acondicionada y digitalizada, esta será procesada como sigue (Gotman, 1990; Murer y Riquelme, 1995):

- 1.- selección o edición de las muestras: aquí se eliminan los segmentos de señal digitalizada que resultan contaminados por artificios o ruidos (a criterio visual del investigador entrenado).
- 2.- estimación espectral: se aplica algún método que incluya FFT. El análisis no se realiza sobre la totalidad del registro seleccionado, sino sobre tramos de 1 a 5 segundos, que se denominan muestras o épocas. Esto es así porque la aplicación del algoritmo del FFT requiere que el número de puntos, ó muestras del EEG, sea una potencia de 2; el valor más común es 512, correspondientes a una época de 2 seg para una $f_M = 256$ Hz. Dado que la actividad fisiológica que se está registrando puede presentar variaciones permanentes, se adopta como criterio promediar un número elevado de muestras, para disminuir la variabilidad del resultado. En el EEG este número no debería ser menor al equivalente de medio a un minuto.
- 3.- Espectros de Potencia (EP): es el resultado alcanzado para cada canal, en los cuales están representadas cada componente frecuencial (abscisas = frecuencias), con sus respectivas potencias (ordenadas). El EP se obtiene elevando al cuadrado y sumando los dos componentes de cada coeficiente de Fourier (pares amplitud-fase). La potencia se expresa en $\mu V^2/Hz$. También se puede trabajar con espectros de amplitudes, que se obtienen al aplicar la función raíz cuadrada a la potencia de cada componente frecuencial. El EP para largas secciones -por ejemplo, 30 seg) es obtenido por la promediación, a cada frecuencia, de los valores de cada espectro desde cada época. Esta promediación no cambia la resolución frecuencial del espectro, pero sí incrementa la estabilidad de la estimación (disminuye su varianza).

De esta forma se deja atrás la familiar onda del EEG en función del tiempo, para obtener un gráfico, el espectro, en el cual visualmente se pueden advertir zonas predominantes, para cada canal, en función de la frecuencia.

Parametrización: Consiste en definir un conjunto de variables o parámetros que caracterizan a una sección del EEG ó al EP resultante. Estos parámetros no representan con precisión cada punto del segmento seleccionado del EEG, pero sí representan características estadísticas del EEG. Si una sección del EEG tiene propiedades estables (por ejemplo, es estacionaria), entonces una representación paramétrica permite una considerable reducción de datos³. Esta reducción es importante cuando se realizan comparaciones estadísticas entre distintos EEG en diferentes condiciones, porque sólo un pequeño número de parámetros serán comparados.

Se pueden extraer una cantidad de parámetros de un análisis espectral. Se las podría separar en (Ferrero y Riquelme, 1995):

- *Potencias:* a) total (área total del espectro bajo la curva); b) por bandas (área contenida dentro de un rango frecuencial, sea convencional o a criterio del investigador); c) cocientes entre bandas (da valores relativos, perdiendo la unidad de medida).
- *Frecuencias:* a) frecuencia dominante (la componente de más potencia); b) frecuencias accesorias (la segunda componente frecuencial en orden a su potencia).

Bandas Frecuenciales: El análisis espectral es a menudo utilizado para determinar la actividad de las bandas frecuenciales tradicionales. Es por ello que se las debe definir con anterioridad para poder obtener valores del espectro entre los límites de las bandas consideradas.

Para el análisis espectral de los resultados obtenidos durante los trabajos de investigación realizados en esta Tesis, se optaron los límites frecuenciales propuestos por Cervino (1997):

- *Bulbo Olfatorio:* $\delta = 1,5 - 3,5$ Hz; $\theta = 4,0 - 7,5$ Hz; $\alpha = 8,0 - 13,0$ Hz; $\beta_1 = 13,5 - 28,0$ Hz; $\beta_2 = 28,5 - 45$ Hz.
- *Neocorteza:* $\delta = 1,5 - 3,5$ Hz; $\theta = 4,0 - 7,5$ Hz; $\alpha = 8,0 - 13,0$ Hz; $\beta = 13,5 - 45$ Hz.

En ambos casos la potencia total fue considerada entre los 1,5 Hz y 45,0 Hz. Debido a las características del programa utilizado para la adquisición y análisis computado del EEG, para una f_M de 256 Hz, el EP obtenido tiene un ancho de banda de 1,5 hasta 64,0 Hz.

En el caso del registro sobre los BO, la actividad β se la subdividió para poder separar la ASI, comprendida en *C. villosus* entre los 28 y 36 Hz. De esta manera en el EP y en sus parámetros relacionados, dicha actividad aparece separada del resto, permitiendo un estudio individualizado de la ASI.

³ Diez segundos de EEG digitalizado a 128 Hz producen 1.280 números; si 12 parámetros pueden representar sus principales características, los datos se reducen por un factor que excede a 100.

Etapas seguidas en la ejecución de los experimentos.

1.- En esta tesis, solamente se experimentó con hembras. Como mencionamos en capítulos anteriores, existe un dimorfismo sexual morfológico en el Sistema Vomeronasal. Nosotros entendemos que dicho dimorfismo podría estar representado en una actividad bioeléctrica cerebral diferente en machos y hembras. Debido a esto, se utilizaron únicamente hembras para este estudio. Una etapa posterior sería investigar los efectos sobre los machos para poder, luego, compararlos.

2.- División de los animales en los siguientes grupos:

- a) animales sometidos a la desaferentación por destrucción del vomeronasal (OVNX) bilateral total;
- b) animales de experimentación sometidos a una operación simulada (sham).

3.- Los animales fueron alojados en las jaulas de Faraday donde permanecieron durante todo el estudio. Permanecieron una semana en estas condiciones para su adaptación, antes de cualquier procedimiento experimental. Durante todo ese tiempo portaron un cable de conexión sobre su dorso con el objeto de habituarlos.

4.- Se realizó el implante crónico de electrodos para registros bipolares en bulbos olfatorios y neocorteza frontal.

5.- A partir de las 72 hs posteriores a la implantación se realizaron registros controles de actividad bioeléctrica de las estructuras nerviosas a estudiar.

6.- Pasado el período de registros destinados a establecer los parámetros basales se realizó la OVNX bilateral y la operación simulada (sham).

7.- Se realizó el análisis visual de los registros y se estudió los cambios de amplitud, frecuencia y morfología del electroencefalograma (EEG). Posteriormente, porciones seleccionadas de los registros se sometieron al análisis espectral de potencia mediante el software correspondiente.

8.- Luego dos animales fueron sometidos a la sección bilateral de los pedúnculos olfatorios y tres animales fueron sometidos a desaferentación bilateral de la mucosa olfatoria, mediante las técnicas descriptas más arriba.

Las condiciones de registro fueron las siguientes: temperatura ambiente de 25 °C, con renovación forzada del aire dentro de la cámara de registro; fotoperíodo L:O 12:12, encendiéndose la iluminación a las 07:30 hs; alimentación y agua *ad libitum*. Los registros

comenzaban alrededor de las 10:00 hs. La cámara de registro estaba totalmente aislada de los ruidos exteriores. Simultáneamente a la visualización del **EEG** y del **EKG**, se realizó un monitoreo del comportamiento del animal (desplazamientos, olfateo, etc.) por medio de un circuito cerrado de T.V., cuya pantalla se encontraba junto al monitor de la computadora de registro.

14.3 Resultados

1- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA CEREBRAL ANTES DE LA ABLACIÓN BILATERAL DEL OVN.

1- De los BO

- a- **En la Vigilia:** la fase de vigilia, en base al comportamiento y EEG, fue dividida en dos subfases: vigilia activa (VA) y vigilia tranquila (VT).

Características Comportamentales:

Durante la VA los animales se mostraron atentos a las variaciones del ambiente, realizaban movimientos de olfateo, se desplazaban por la cuba de registro ó permanecían quietos, parados sobre las patas posteriores y cola, olfateando el ambiente.

Durante la VT, los animales permanecieron acostados, con aspecto tranquilo, sin realizar movimientos de olfateo activos y con movimientos ventilatorios regulares e iguales.

Actividad Bioelectrica de los Bulbos Olfatorios:

Vigilia Activa

Predominan sobre el trazado la presencia de ASI (34-40 Hz, 30 μ V) y OLO de 2-3 Hz y 60-80 μ V (Figura 8). También se observa una actividad bioeléctrica de base rápida, irregular y de bajo voltaje (14-26 Hz, 5-10 μ V). La OLO fue simétrica en ambos BO y se comprobó que dicha onda coincide con la entrada de aire por la nariz.

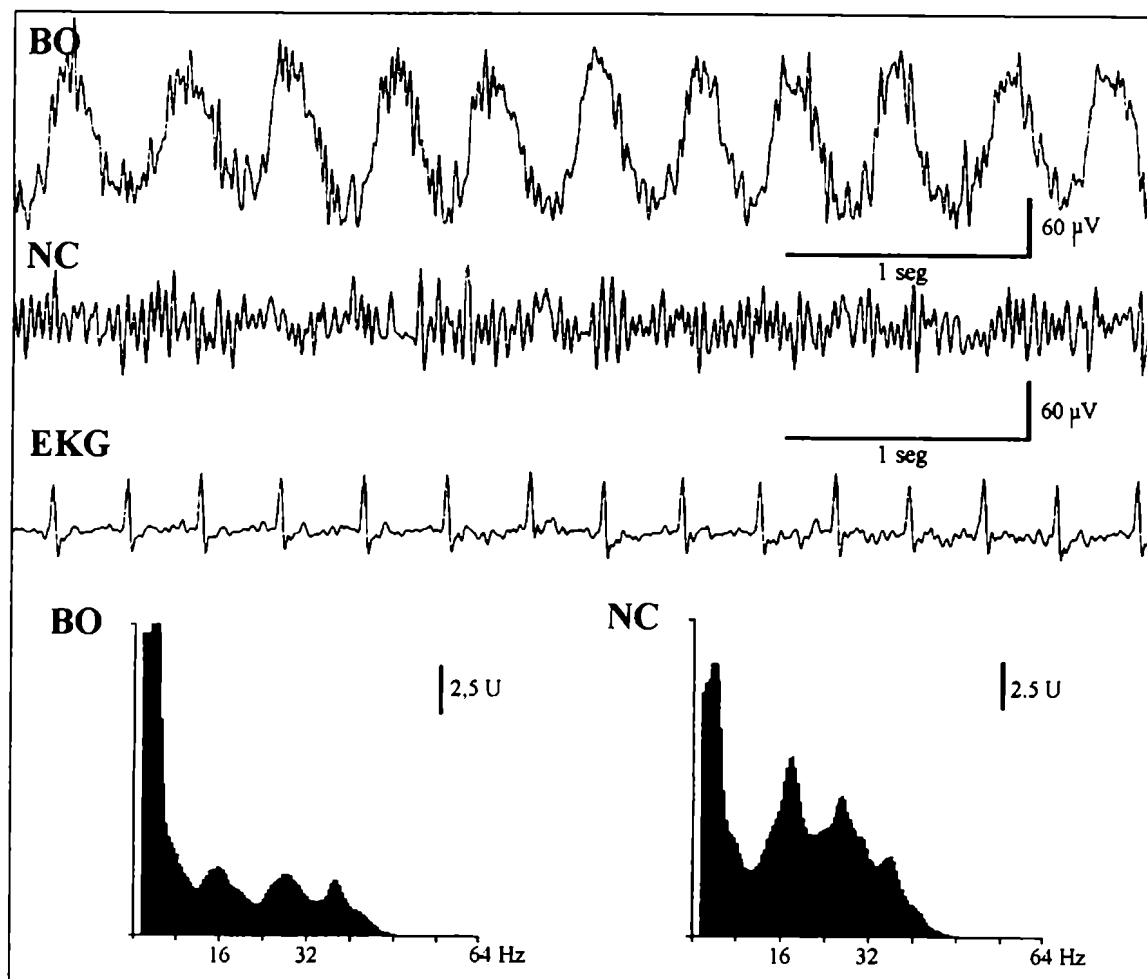


FIGURA 8: Registros de la actividad bioeléctrica cerebral y cardíaca de *Chaetophractus villosus* durante la vigilia activa. BO= bulbo olfatorio izquierdo; NC= neocorteza frontal izquierda; EKG= electrocardiograma. En los gráficos inferiores se muestran espectros de potencia correspondiente a la actividad registrada en el EEG.

Vigilia Tranquila

Durante esta fase se registra una actividad de base de bajo voltaje (aproximadamente 10 μ V) y una frecuencia entre 15 y 60 Hz. También se pueden observar ondas lentas de gran amplitud (hasta 150 μ V), con una duración de 0,5 seg, cuya frecuencia depende de los ciclos ventilatorios del animal. En relación con las OLO se registra ASI. Como se puede observar en la Figura 9, las ondas sinusoidales, en general, aparecieron montadas en la parte superior y/o sobre la fase descendente de la onda lenta. La frecuencia de las ondas que forman los husos de ASI fluctuó entre 35 y 40 Hz, pero en general la salva comenzó con componentes de alta frecuencia, por ejemplo 40 Hz, y terminó con componentes de 30 Hz. La amplitud de la ASI fluctúa entre los 30 y 80 μ V.

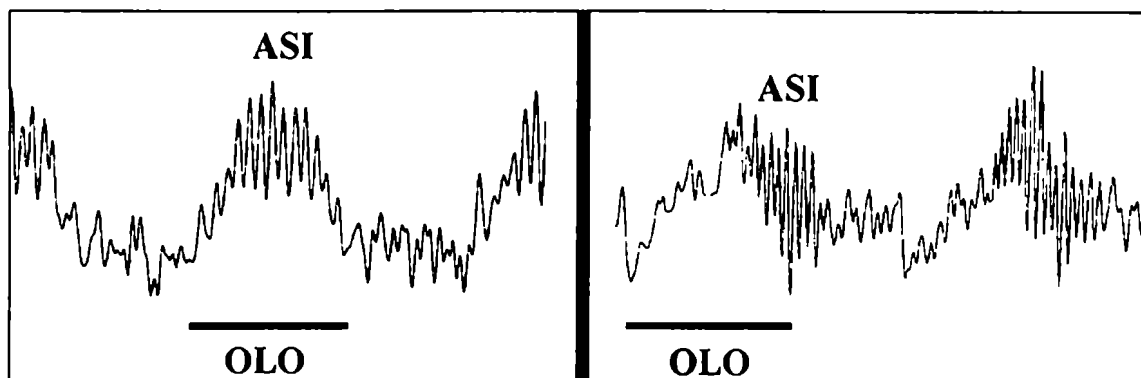


FIGURA 9: Actividad bioeléctrica de los bulbos olfatorios de *Chaetophractus villosus*. OLO= onda lenta de Ottoson; ASI= actividad sinusoidal inducida o de Adrian.

El Ritmo RinoCentrífugoGénico

Junto con las mencionadas actividades, comunes a otros mamíferos, sobre los BO de *C. villosus* se registra un ritmo de 9 a 14 Hz y de 30 a 50 μ V. Es el denominado *ritmo rino-centrífugo-génico* (RCG), ya comentado en la Introducción. La intensidad del ritmo RCG fue variable según el animal registrado, pudiéndose distinguir las siguientes características:

- la aparición del ritmo RCG coincidió con los movimientos ventilatorios, ya que siempre de lo observó relacionado a ella, siguiendo a la onda lenta y ondas sinusoidales (Figura 10):

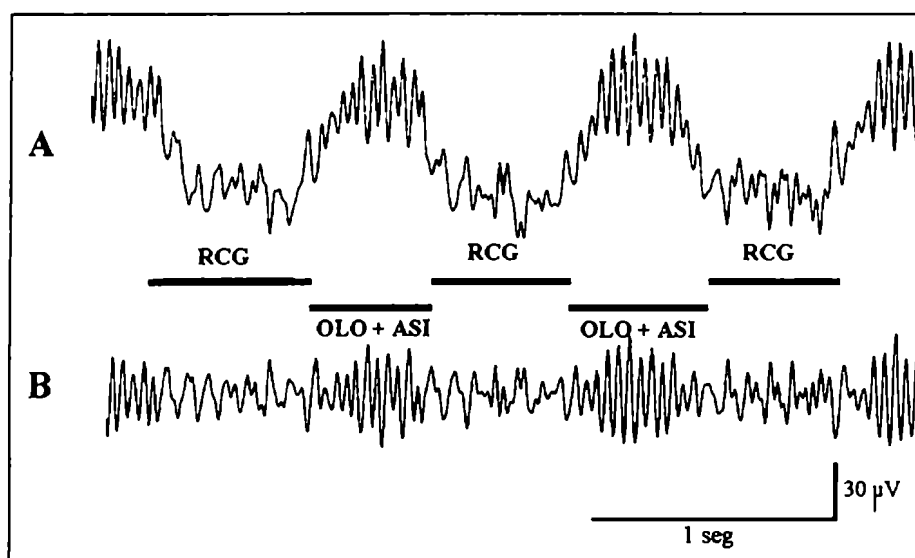


FIGURA 10: Registros de la actividad de bulbo olfatorio durante la vigilia. Se procesó al mismo registro con filtrado digital. A: FPA= 1,3 Hz; FPB= 55 Hz. B: FPA= 8 Hz; FPB= 55 Hz. ASI= actividad sinusoidal inducida; OLO= onda lenta de Ottoson; RCG= ritmo rino-centrífugo-génico.

- las ondas que componen a este ritmo tienen una morfología característica, y a diferencia del ritmo alfa registrado en la corteza visual de primates y perros, no tiene forma de huso: sus ondas poseen un perfil de onda cuadrada o triangular (Figura 10);
- se observó que existe una relación inversa entre el ritmo RCG y la ASI, de tal forma que cuando dicho ritmo es muy notable, estas últimas son escasas. Sin embargo pueden coexistir en grado variable;
- en algunos animales el ritmo RCG es muy conspicuo y en otros escaso. En general fue más abundante en aquellos peludos que se caracterizaron por presentar un comportamiento más tranquilo, predominando la VT sobre la VA mientras el animal estaba despierto, no ofreciendo casi resistencia cuando se los manipulaba -para conectarlos a los sistemas de registro, pesarlos o inyectarles una droga-. En cambio, hubo otros, que respondieron a la manipulación con continuos y bruscos movimientos, tratando de huir; estos animales se caracterizaron por permanecer en un estado de VA casi continuamente, caminando por la cuba de registro y era común que respondiesen, a la menor perturbación, con movimientos de intenso olfateo que se traducían en registros semejantes a los de la Figura 11.

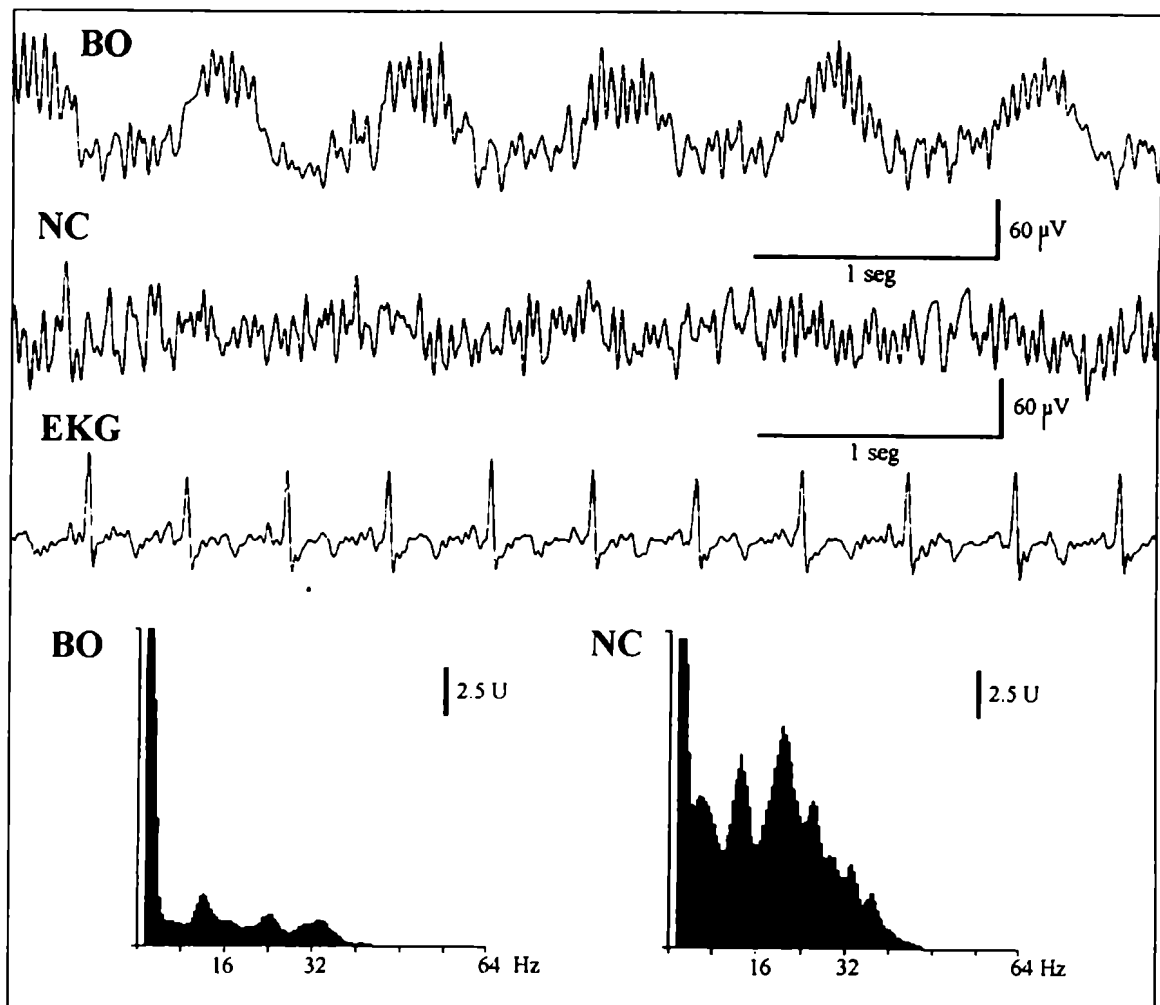


FIGURA 11: Registros de la actividad bioeléctrica cerebral y cardíaca de *Chaetophractus villosus* durante la vigilia tranquila. Este registro presenta escasa presencia de ritmo rino-centrífugo-génico y abundante actividad sinusoidal inducida. BO= bulbo olfatorio izquierdo; NC= neocorteza frontal izquierda. En los gráficos inferiores se muestran espectros de potencia correspondiente a la actividad registrada de dichos EEG.

b- En el Sueño Lento

Predominan ondas lentas dentro de las bandas θ y α , con una amplitud entre 40-50 μV (Figura 13). Nunca se observó ritmo RCG. A medida que el SL ganaba en profundidad se podían observar ondas δ , pero siempre en menor incidencia comparada con la NC. No se observaron salvas de ASI durante esta fase del sueño en relación al ciclo ventilatorio, a excepción de cuando el animal cambiaba de posición, donde el registro volvía a parecerse a la VT.

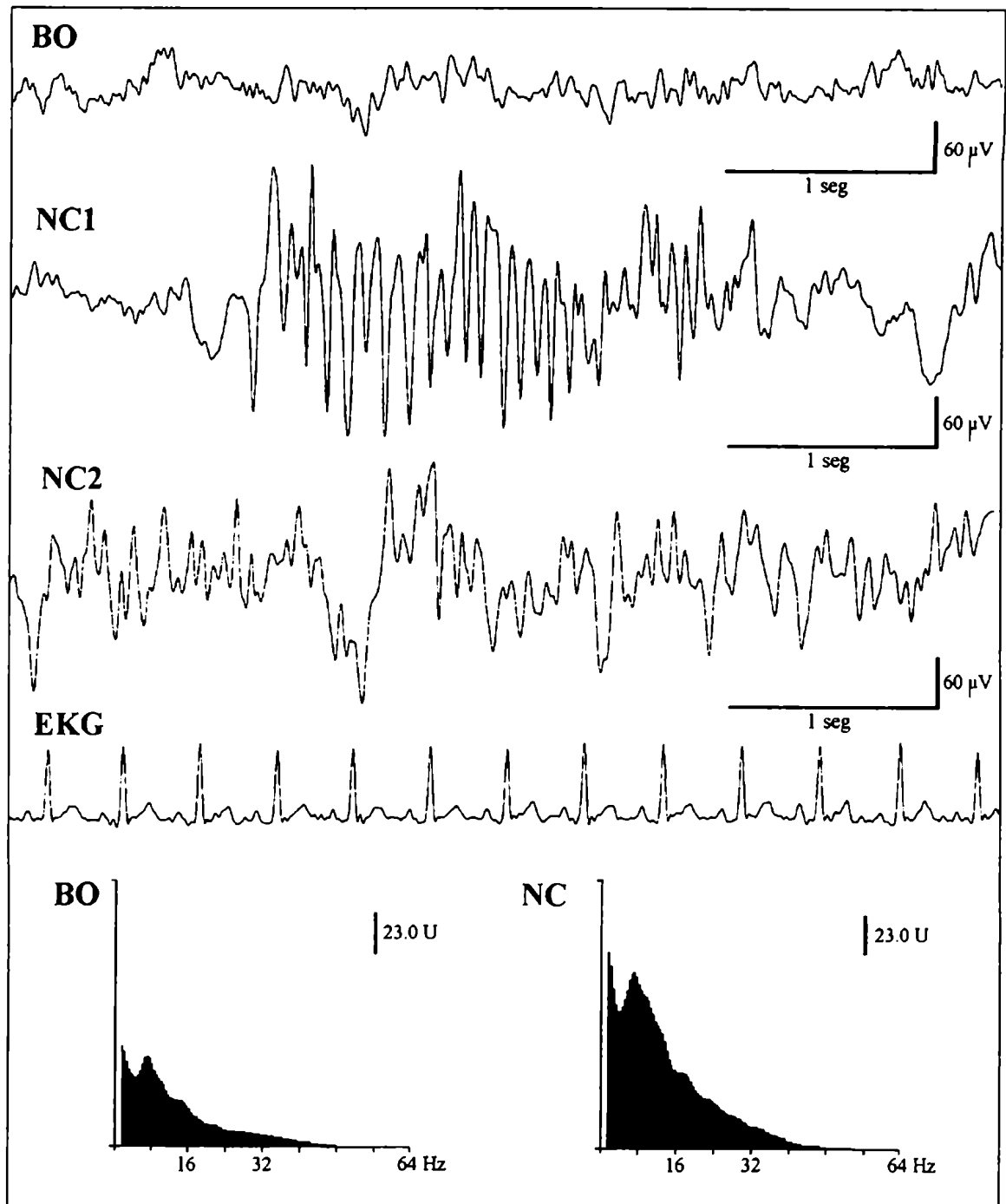


FIGURA 13: Registro y procesamiento de la actividad bioeléctrica cerebral y electrocardiograma de *Chaetophractus villosus* durante el sueño lento profundo. BO= bulbo olfatorio izquierdo; NC= neocorteza frontal izquierda (1 y 2 distintos patrones durante el sueño lento en la NC).

c- En el Sueño Paradójico

El pasaje al SP se detecta inmediatamente por una brusca desincronización del trazado bioeléctrico, con disminución de la amplitud del registro (20-30 μ V) y un aumento de la

frecuencia (Figura 14). Hubo salvas sinusoidales semejantes a las observadas durante la VT, más o menos frecuentes, pero sin relación aparente con la ventilación de los pulmones. Nunca se observó la presencia de ritmo RCG.

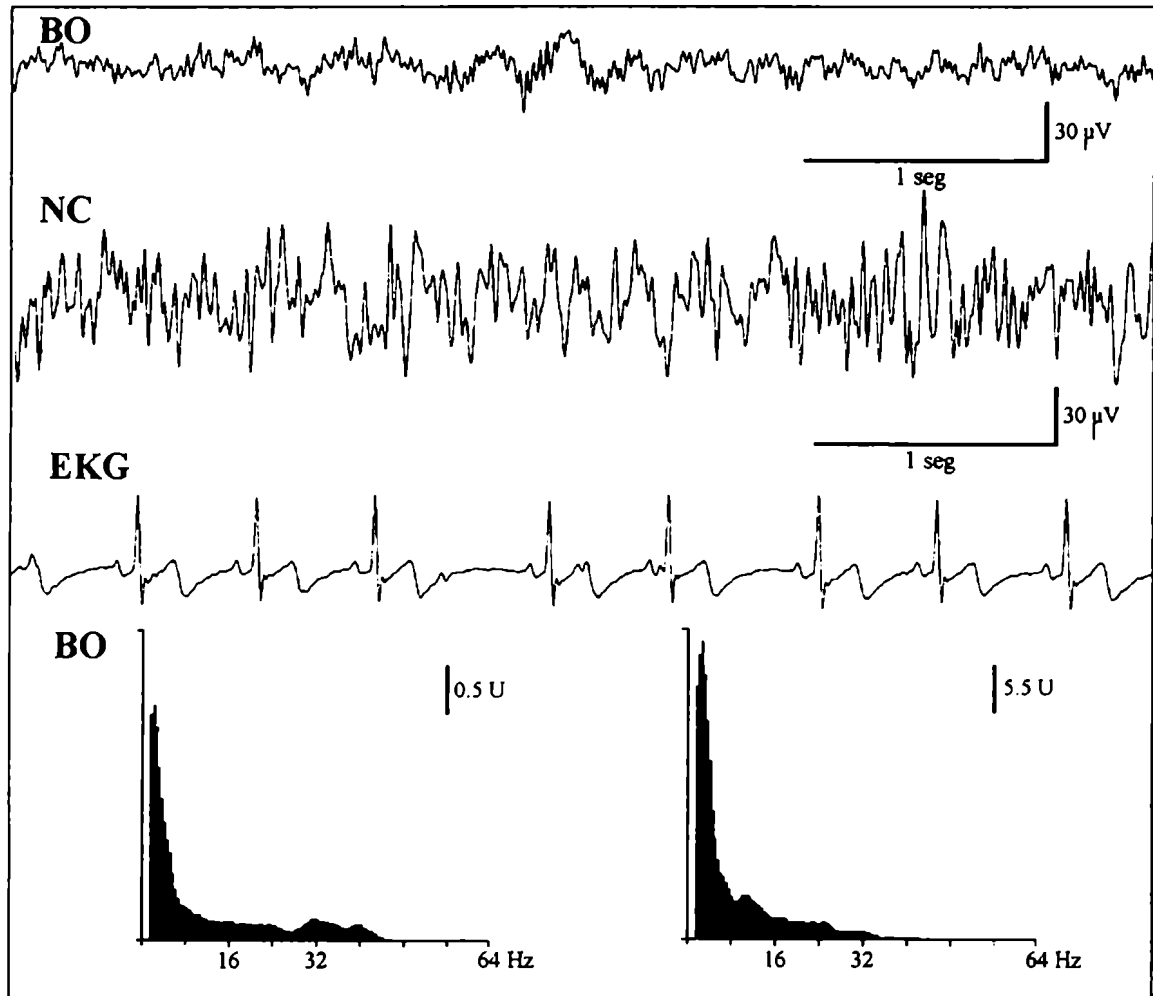


FIGURA 14: Registro y procesamiento de la actividad bioeléctrica cerebral y electrocardiograma de *Chaetophractus villosus* durante el sueño rápido ó paradójico. BO= bulbo olfatorio izquierdo; NC= neocorteza frontal izquierda.

2- De la Neocorteza frontal

a- En la Vigilia

Vigilia Activa

Se observó una actividad predominante dentro de las banda beta (14-40 Hz) y de bajo voltaje (25-40 μ V) (Figura 8).

Vigilia Tranquila

Los peludos, en general, poseen una actividad neocortical regular, de baja amplitud ($\sim 30\text{--}40\ \mu\text{V}$) y una frecuencia entre los 12 y 26 Hz, predominando siempre un rango frecuencial, el cual se manifiesta como un pico en los EP (Figura 11). En algunos peludos se podía registrar un ritmo muy conspicuo, de $\sim 12\text{--}14$ Hz, con ondas bien definidas, semejantes al ritmo RCG del BO, que dominaban el trazado durante la VT. Debido a que ambos ritmos son semejantes, se trató de probar si el origen del ritmo es genuino en la NC o es propagado desde los BO.

b- En el Sueño Lento

Se reconoce por la presencia de grandes ondas lentas, dentro de la banda δ y con una amplitud hasta $150\ \mu\text{V}$ (Figura 13). En *C. villosus* el SL se caracteriza por la presencia de husos de sueño durante toda esta subfase. A medida que el SL se profundiza, la frecuencia de las ondas que forman los husos se va enlenteciendo, pudiendo llegar a 7,5 Hz. y una amplitud hasta los $200\ \mu\text{V}$. También estos husos se vuelven más esporádicos

c- En el Sueño Paradójico

Al igual que en el BO, se observa una activación del trazado, con una disminución de la amplitud ($\sim 40\ \mu\text{V}$) (Figura 14).

II- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA DEL BO Y LA NEOCORTEZA FRONTAL DESPUÉS DE LA ABLACIÓN BILATERAL DEL OVN.

1- De los BO

a- En la Vigilia

No se observan cambios apreciables en la actividad bioeléctrica de estas estructuras.

b- En el Sueño Lento

Durante esta etapa del sueño no se registraron modificaciones de los patrones electroencefalográficos con respecto a los animales antes de la ablación bilateral del OVN.

c- En el Sueño Paradójico

Durante esta etapa se observó un cambio importante de la actividad bioeléctrica de los bulbos olfatorios. Como se observa en la Figura 15 aparece una actividad casi continua con una frecuencia entre 24 y 29 Hz. La amplitud de dicha actividad se muestra modulada, con un mínimo de $20\ \mu\text{V}$ y picos de hasta $80\ \mu\text{V}$.

Esta actividad ya podía ser registrada a partir de las 24 hs de la OVNX y perduró durante todo el período de observación que fue de 7 días.

d- Efecto de la sección de los pedúnculos olfatorios

En dos animales que desplegaban la actividad arriba descrita, la sección de los pedúnculos olfatorios, realizada dos días después de la ablación vomeronasal, determinó la desaparición de la misma en los BO. Este hecho demuestra que la generación de la actividad de marras requiere la integridad de las conexiones entre BO y el resto del cerebro.

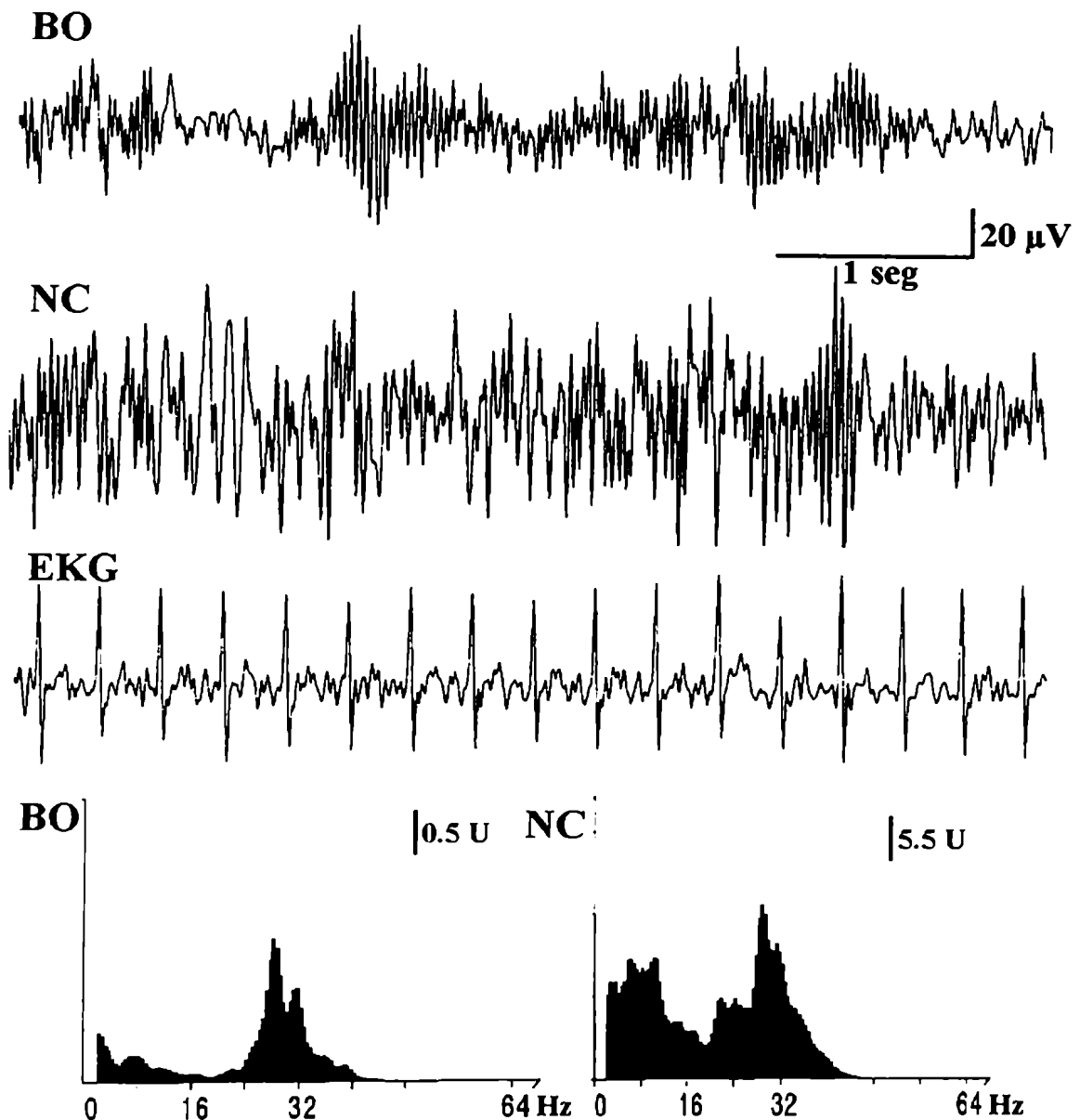


FIGURA 15: EEG y espectros de potencias (EP) de bulbo olfatorio (BO) y neocorteza frontal (NC) de *Chaetophractus villosus*, durante el sueño rápido, con 2 días de la extirpación bilateral del órgano vomeronasal. En el BO se observa una actividad rápida (pico de 29,0 Hz en el EP).

2- De la Neocorteza frontal

a- En la Vigilia

No se observan cambios apreciables en la actividad bioeléctrica de la neocorteza.

b- En el Sueño Lento

Durante esta etapa del sueño no se registraron modificaron los patrones electroencefalográficos, predominando los husos de sueño y las ondas delta.

c- En el Sueño Paradójico

También se observó actividad rápida, con una frecuencia apenas mayor que la registrada en los BO. Es de destacar la mayor amplitud de las salvas, llegando a los 120 μ V.

d- Efecto de la sección de los pedúnculos olfatorios

En dos animales que desplegaban la actividad arriba descrita, la sección de los pedúnculos olfatorios, realizada dos días después de la ablación vomeronasal, determinó la desaparición de la misma en el neocortex frontal.

III- EFECTO DE LA DESAFERENTACIÓN OLFATORIA POSTERIOR A LA DESAFERENTACIÓN VOMERONASAL

1- De los BO

a- En la Vigilia

Se observó la desaparición sobre los BO de las OLO, la ASI y el ritmo RCG (Figura 16). Hasta las 24-36 hs desde el pasaje de SZ por la MO se registra una actividad irregular, rápida y de bajo voltaje ($\sim 20 \mu$ V). A partir de las 36 hs comienza a registrarse un ritmo θ entre 4,5 y 5,5 Hz y 20-30 μ V el cual se acentúa con el paso de los días. Este ritmo fue denominado *ritmo theta de desafrentación* (Cervino, 1997).

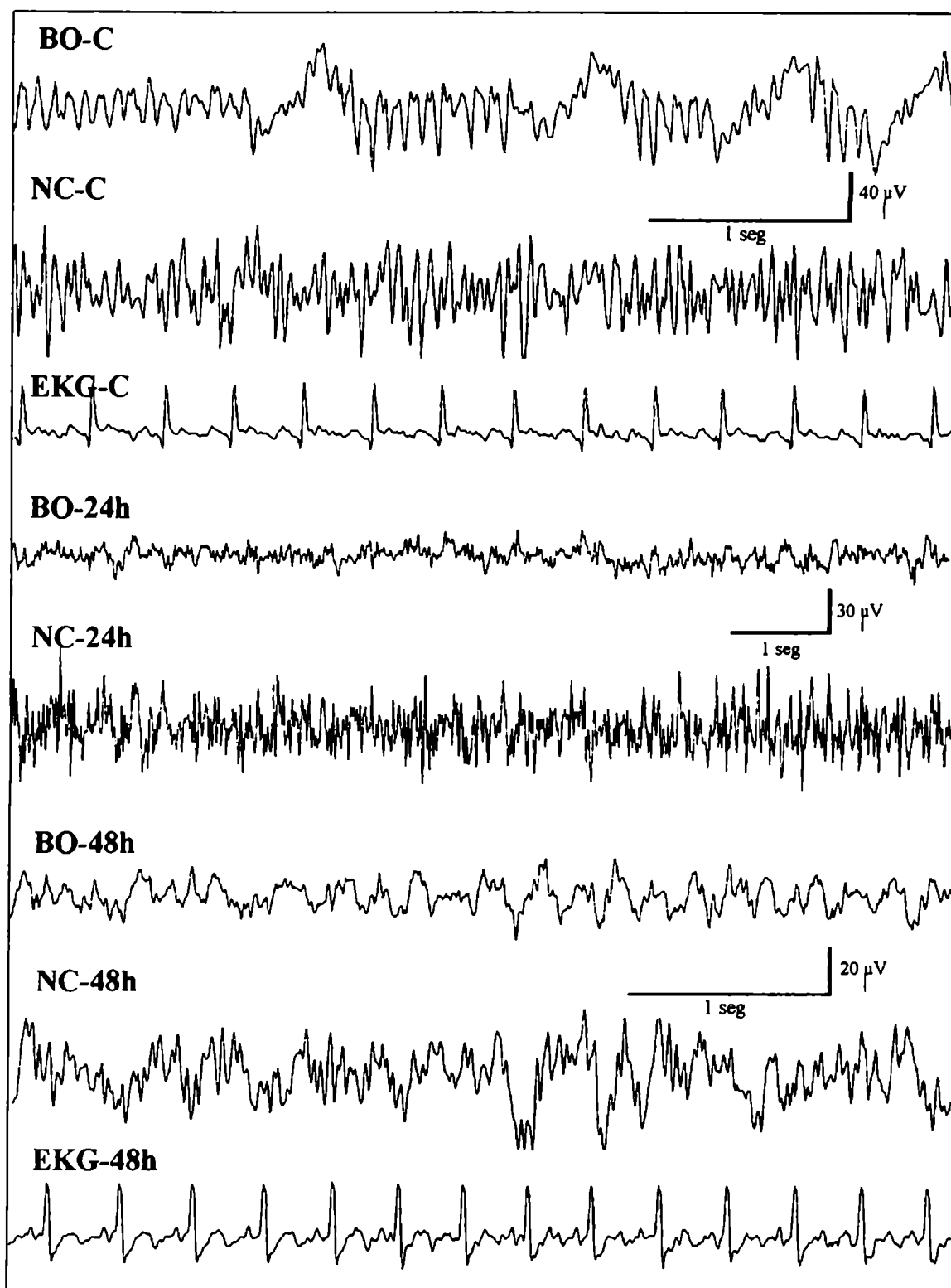


FIGURA 16: Registros electroencefalográficos del bulbo olfatorio (BO) y neocorteza frontal (NC) de *Chaetophractus villosus*, durante la vigilia tranquila. C= control; 24h= 1 día después de la destrucción de la mucosa olfatoria con sulfato de zinc; 48h= 2 días después. Nótese la presencia de un ritmo theta en el BO-48h.

b- En el Sueño Lento

La destrucción de la MO provocó la aparición de una actividad sinusoidal rápida, dentro de la banda β_2 (28 a 36 Hz), de gran amplitud (20 a 60 μ V) y con una fuerte modulación de amplitud (Figura 17). Este ritmo aparece desde que comienza cada período de SL, y se fue acentuando con el transcurso de los días. Esta actividad es la denominada *ritmo Reo-Privo-Génico* (RPG) ó *actividad hipócnica* (Affanni y García Samartino, 1984, Cervino, 1997).

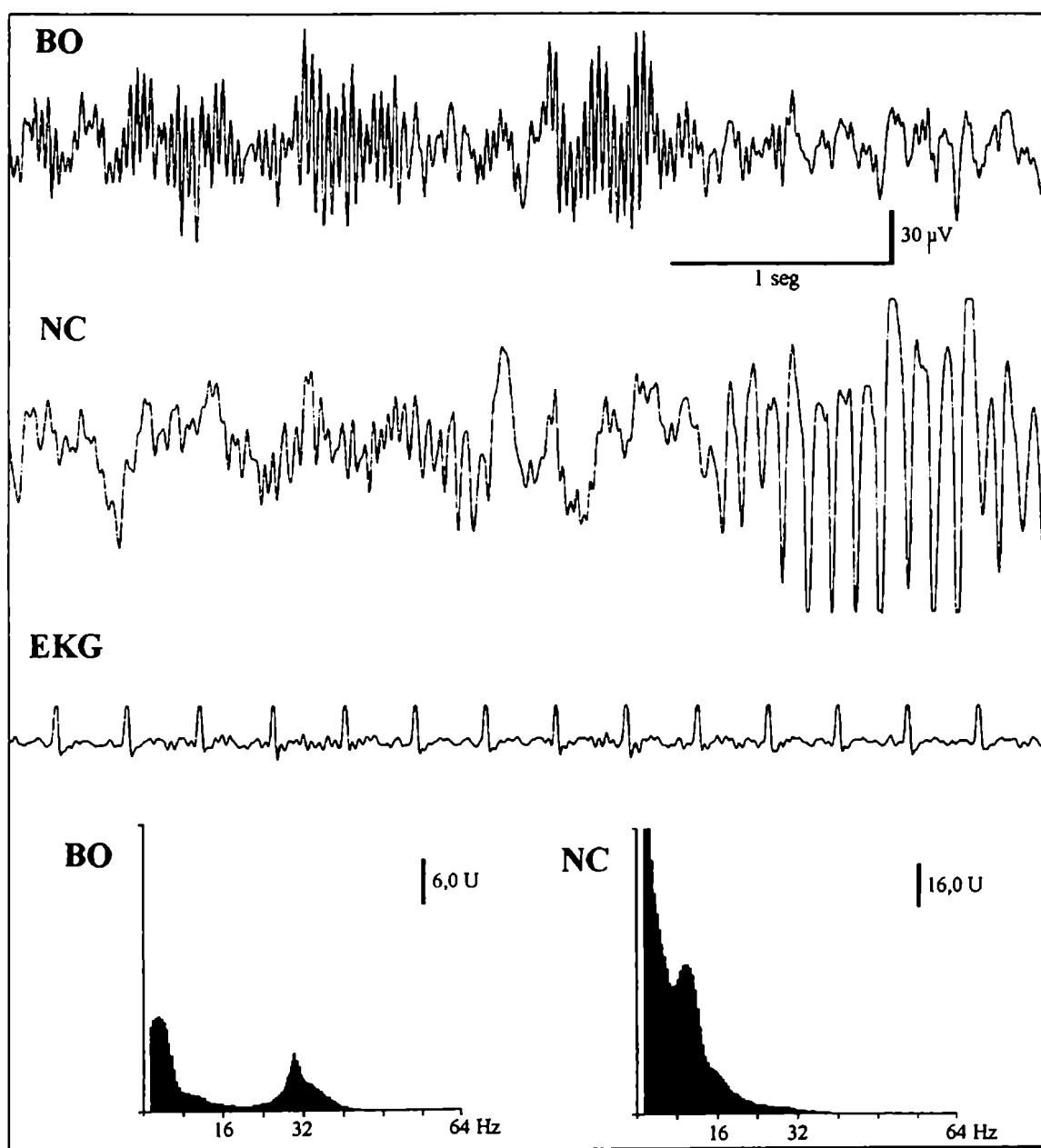


FIGURA 17: EEG y espectros de potencias (EP) de bulbo olfactorio (BO) y neocorteza frontal (NC) de *Chaetophractus villosus*, durante el sueño lento, con bidesaferentación olfatoria por destrucción de la mucosa olfatoria con sulfato de zinc. En el BO se observa una actividad rápida (pico de 30,0 Hz en el EP) correspondiente al ritmo reo-privo-génico (RPG) ó actividad hipócnica.

c- En el Sueño Paradójico

Durante esta fase del sueño las salvas son mucho más continuas ocupando una mayor proporción del trazado (Figura 18).

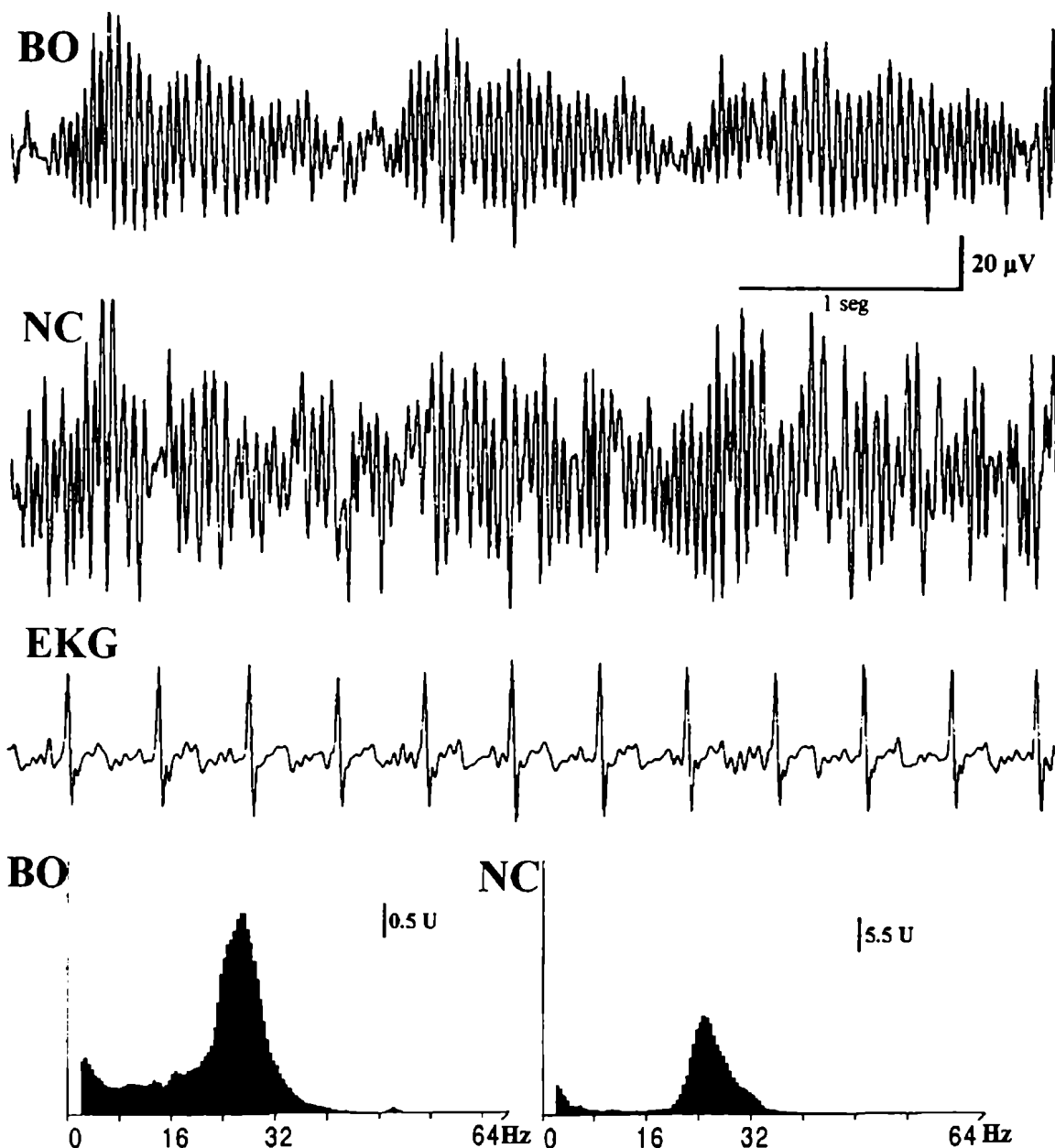


FIGURA 18: EEG y espectros de potencias (EP) de bulbo olfatorio (BO) y neocorteza frontal (NC) de *Chaetophractus villosus*, durante el sueño rápido. El registro de este animal se realizó a los 10 días de la extirpación bilateral del órgano vomeronasal y 3 días de la desafrentación olfatoria por destrucción de la mucosa olfatoria bilateral. En el BO se observa una actividad rápida (pico de 29,0 Hz en el EP).

2- De la Neocorteza frontal

a- En la Vigilia

En la NC se observa una disminución de la amplitud. Con respecto a la frecuencia, un aumento en la presencia de una actividad marcada dentro de la banda θ (6,5 Hz) puede ser observado (Figura 16), la cual también va en aumento a lo largo de los días.

b- En el Sueño Lento

Se aprecia en los registros de SL la aparición esporádica de husos de actividad rápida (Figura 17).

c- En el Sueño Paradójico

Como se observa en la Figura 18, la actividad rápida se vuelve casi continua.

14.4 Discusión

Los datos aquí presentados nos condujeron a un imprevisto e interesante resultado. De acuerdo a los mismos, aparece que el OVN juega un importante papel en la determinación de los patrones bioeléctricos del BO y del Neocortex frontal desplegados durante Sueño Paradójico. Hasta el momento no se había sospechado esta curiosa nueva función de los OVN.

La extirpación bilateral de los OVN determina la aparición de un conspicuo ritmo cerebral de gran amplitud, que aparece en salvas y con una frecuencia de entre 24 y 32 Hz. De acuerdo a la frecuencia, dicho ritmo puede ser calificado como comprendido dentro de la Banda Gamma. Una operación control con ejecución de todos los pasos previos a la ablación vomeronasal no produce la mencionada aparición. Lo extraordinariamente interesante de esa actividad es que la misma aparece solamente en el transcurso del Sueño Paradójico. Sin embargo, en algunos casos pudo observarse que esbozos de la misma podían aparecer al comienzo del Sueño Lento. No así cuando esta última etapa del sueño estaba consolidada.

Los hallazgos de la desaferentación vomeronasal contrastan notablemente con los de la desaferentación olfatoria. Esta última genera la aparición del mismo tipo de actividad pero ahora durante toda la duración del Sueño Lento y toda la duración del Sueño Paradójico.

Resulta evidente que la actividad Gamma aparecida durante el Sueño Paradójico en los animales con desaferentación vomeronasal es producida por la llegada de impulsos que viajan por las vías centrífugas bulbópetas. Esto quedó demostrado porque la sección transversal completa de los Pedúnculos Olfatorios determina la desaparición de la misma tanto a nivel de los BO como del Neocortex frontal.

Si la extirpación bilateral provoca la aparición de la actividad descripta más arriba es necesario admitir que la aferencia vomeronasal normal de algún modo impide la aparición de la misma. La nueva función del OVN, sería pues, la de frenar la aparición de este ritmo cuando el cerebro entra en la fase de Sueño Paradójico. La superficie cortical invadida por la actividad Gamma (BO, Neocorteza Frontal y Corteza Piriforme) es relativamente grande. Por otra parte, la gran amplitud y porcentaje de tiempo ocupado por la actividad durante el Sueño Paradójico, nos inducen a sospechar que la aparición de la misma puede tener importantes consecuencias sobre la energética cerebral. Su ausencia, mientras permanece intacta la función vomeronasal, también podría tener importantes consecuencias energéticas.

Resulta interesante notar que si se extirpa la Mucosa Olfatoria luego de la desaferentación vomeronasal, la conspicua actividad Gamma, aparece ahora también en el Sueño Lento además de en el Sueño Paradójico.

Como hemos visto, la desaferentación olfatoria es capaz de determinar la actividad centrífuga bulbópeta desencadenante de actividad Gamma, tanto durante el Sueño Lento como durante el Sueño Paradójico. En cambio, la desaferentación vomeronasal sólo lo hace en el Paradójico. Nuestros experimentos no nos permiten conocer el mecanismo de tales efectos diferenciales, pero indican claramente, un hecho muy interesante hasta ahora desconocido.

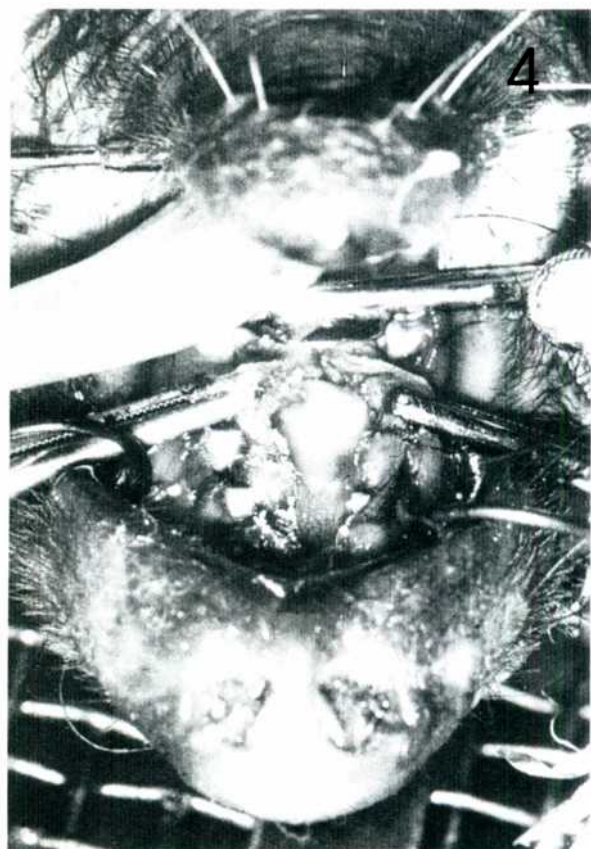
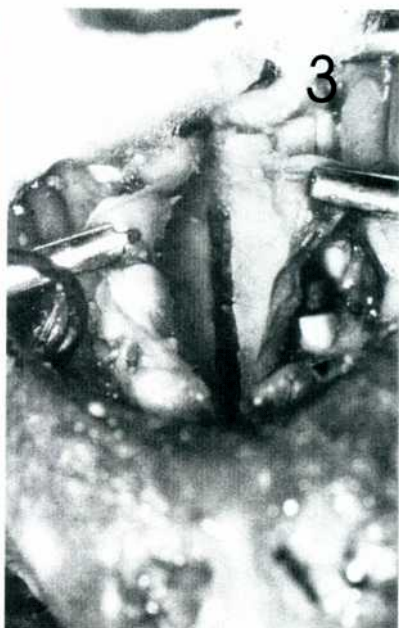
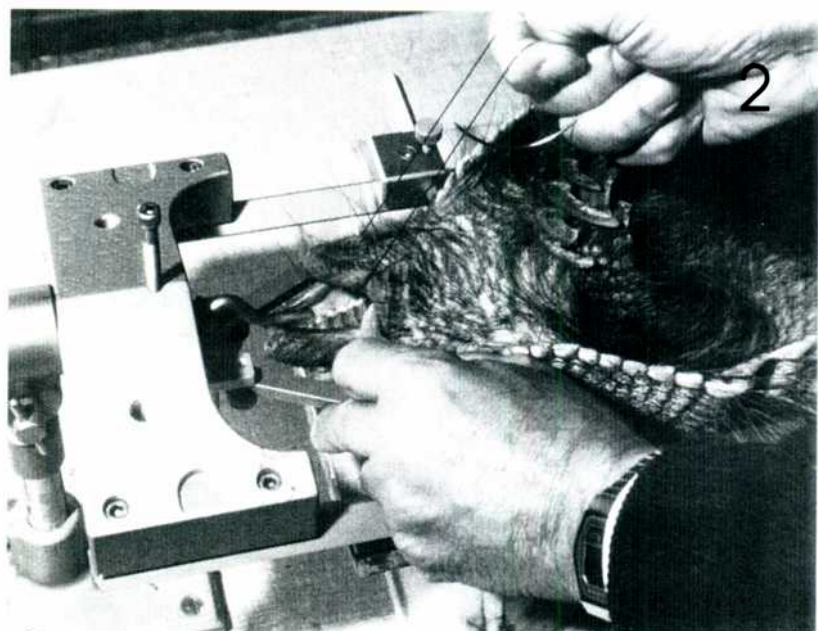


Figura 2: Fotografía que muestra la ubicación en el aparato estereotáxico del armadillo previa a comenzar la destrucción bilateral del OVN.

Figura 3: Fotografía que muestra el paladar óseo con una abertura longitudinal. Por esta ventana se procede a la destrucción del OVN con una fresa.

Figura 4: Luego de la destrucción, la abertura del paladar óseo es rellenada con acrílico líquido.

Figura 5: Finalmente se sutura la mucosa del paladar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACCILI D, MENGHI G, BONDI AM, SCOCCO P. 1992. Glycoconjugate composition of mammalian parotid glands elucidated in situ by lectins and glycosidases. *Acta Histochemical* 92, 196-206.
2. ADAMS D 1986. The bovine vomeronasal organ. *Archives of Histology of Japan* 49, 211-225.
3. ADAMS D 1992. Fine structure of the vomeronasal and septal olfactory epithelia and of glandular structures. *Microscopy Research and Technique* 23, 86-97.
4. ADAMS D, WIEKAMP M 1984. The canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy* 138, 771-787.
5. ADRIAN, E. 1955. Synchronised activity in the vomero-nasal nerves with a note on the function of the organ of jacobson. *Pflügers Archiv.*, 260: 188-192.
6. ADRIAN, E.. 1942. Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *J. Physiol.*, 100: 459-473.
7. ADRIAN, E.. 1950. The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *EEG clin. Neurophysiol.*, 2: 377-388.
8. AFFANNI JM, CARUSO RC, GARCIA SAMARTINO L, MASCITTI TA, PAVIA MA, BASSO HP, VACCAREZZA RR 1969. Interbulbar commissural olfactory pathway: an experimental study in the armadillo *Chaetophractus villosus*. *Acta Physiologica Latino Americana* XIX, 384-388.
9. AFFANNI JM, GARCIA SAMARTINO L 1984. Comparative study of electrophysiological phenomena in the olfactory bulb of some South American marsupials and edentates. In: *Comparative Physiology of Sensory Systems*. (ed. Bolis L, Keynes FD, Madrell SHP), pp. 315-331. New York: Cambridge University Press.
10. AFFANNI JM, GARCIA SAMARTINO L, CASANAVE EB, DEZI R 1987. Absence of apnea in armadillos covered by soil. *Respiration Physiology* 67,239-245.
11. AFFANNI, J.; E. LISOGORSKY y A. SCARAVILLI. 1972. Sleep in the giant South American armadillo *Priodontes giganteus* (Edentata, Mammalia). *Experientia*, 28(9): 1046-1047.

12. AFFANNI, J.; L. GARCIA SAMARTINO; A. GORI y L. ESPINOLA. 1977. Fenómenos centrales desencadenados en el sistema nervioso por la desaferentación olfatoria. *Rvta. Soc. argent. biol.* 72: 62.
13. ALDANA MARCOS, H; BENITEZ, I; AFFANNI, J. 1995. New and peculiar cytoplasmatic membranous bodies in the acinar cells of the Harderian gland of the armadillo *Chaetophractus villosus*. *Biocell* 19(2): 85-93.
14. AMEGHINO, FLORENTINO. 1913-1936 Obras completas y correspondencia científica. Impresiones Oficiales. La Plata.
15. ANDERSON, J. y K. BERNIRSCHKE. 1962. Tissue transplantation in the nine-band armadillo *Dasypus novemcinctus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 99(3): 399-414.
16. ANDERSON, J. y K. BERNIRSCHKE. 1966. The armadillo *Dasypus novemcinctus* in experimental biology. *Lab. Anim. Care*, 16 (3): 202-216.
17. ÄNGGÅRD, A, LUNDBERG, J y LUNDBLAD, L. 1983. Nasal autonomic innervation with special reference to peptidergic nerves. *Eur. J. Respir. Dis. (Suppl.)* 128: 143-149.
18. BAL RS, ANHOLT RR 1993 Formation of the extracellular mucous matrix of olfactory neuroepithelium identification of partially glycosylated and nonglycosylated precursors of olfactomedin. *Biochemistry* 32, 1047-1053.
19. BANCROFT, S. 1990. Theory and practice of Histological Techniques. 3rd. Ed. Churchill Livingstone.
20. BANNISTER L, DODSON H 1992. Endocytic pathways in the olfactory and vomeronasal epithelia in the mouse: ultrastructure and uptake of tracers. *Microscopic Research and Technique* 23, 128-141.
21. BARBER PC 1989. *Ulex europeus* agglutinin I binds exclusively to primary olfactory neurons in the rat nervous system. *Neuroscience* 30, 11-19.
22. BARBER PC, RAISMAN G 1978. Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. *Brain Research* 141, 57-66.
23. BARONE, R. 1966. Organe de Jacobson, nerf voméronasal et nerf terminal du chien. *Bull. Soc. Sci. Vét. et Med. comparée.* 68:258-270.
24. BEDDARD, F. 1909. *Mammalia*. MacMillan & Co. 160-186.
25. BENITEZ I, ALDANA MARCOS HJ, AFFANNI JM 1994 The encephalon of *Chaetophractus villosus*. A general view of its most salient features. *Comunicaciones Biológicas* 12, 57-73.

26. BERGHARD, A. y L.B. BUCK 1996. Sensory transduction in vomeronasal neurons: Evidence for $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha i2}$ and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signal cascade. *J. Neurosci.* 16: 909-918.
27. BERLINER D, MONTI-BLOCH L, JENNINGS-WHITE C, DIAZ-SANCHEZ, V. 1996. The functionality of the Human vomeronasal organ (VNO): Evidence for steroid receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 58(3): 259-265.
28. BERTMAR, G 1969. The vertebrate nose, remarks on its structure and functional adaptation and evolution. *Evolution* 23:131-152.
29. BERTMAR, G. 1981. Evolution of vomeronasal organ in vertebrates. *Evolution* 35(2):359-366.
30. BHATNAGAR KP, MATULIONIS DH, BREIPOHL W 1982 Fine structure of the vomeronasal neuroepithelium of bats: a comparative study. *Acta Anatomica* 112, 158-177.
31. BILLINGHAM, R. y W. NEAVES. 1980. Exchange of skin grafts among nonzygotic quadruplets in armadillos. *J. Expl. Zool. Philad.*, 213(2): 257-260.
32. BOCSKEY, Z. 1992. *Nature*. 360: 186-188.
33. BOJSEN-MOLLER, F. 1975. Demonstration of terminalis, olfactory, trigeminal and perivascular nerves in the rat nasal septum. *J. Neur.*, 159:245-256.
34. BRANDT, I, BRITTEBO, E, FEIL, V y BAKKE, J. 1990. Irreversible binding and toxicity of the herbicide dichlobenil in the olfactory mucosa of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103: 491-501.
35. BREER H 1991. Molecular reaction cascade in olfactory signal transduction. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 39, 621-625.
36. BREIPOHL W, BHATNAGAR KP, MENOZA A 1979. Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat. *Cell and Tissue Research* 200, 383-395.
37. BRINCK U, BOSBACH R, KORABIOWSKA M, SCHAUER A, GABIUS HJ 1995. Lectin-binding sites in the epithelium of normal humana appendix vermiformis and in acute appendicitis. *Histology and Histopathology* 10, 61-70.
38. BRITTON, S. 1938. Poikilothermism in the Sloth. *J. Mammal.*, 19(1):94-99.
39. BROMAN, J. 1920. Das organon vomeronasale Jacobsoni; ein Wassergeruchsorgan. *Anat. Hefte*, 58:137-192.
40. BROOM R 1897. A contribution to the comparative of the mammalian organ of Jacobson. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*. 39 (part I), 231-255.

41. BROWN, J. 1987. The nervus terminalis in insectivorous bat embryos and notes on its presence during human ontogeny. *Ann. NY.Acad. Sci.* 287: 184-200.
42. BRUCE ,H. 1960. *J. Reprod. Fertil.* 1: 96-103.
43. BUCK, L y AXEL, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
44. BURCHFIELD, H.; E. STORRS; G. WALSH and M. VIDRINE. 1976. Improved caging for nine-banded armadillo. *Lab. Anim. Sci.*, 26(2, part 1): 234-236.
45. CAJAL, R. 1890. Origen y terminación de las fibras nerviosas olfatorias. *Gaz. Sanit. de Barcelona*. Octubre.
46. CAMINERO, A. 1989. Efecto de los esteroides gonadales sobre las células mitrales del bulbo olfatorio accesorio de la rata. Tesis doctoral. UNED. Madrid.
47. CAMINERO, A. 1991. Sexual dimorphism in accessory olfactory bulb mitral cells: a quantitative Golgi study. *Neurosci.* 45:663-670.
48. CAMPION, R. 1959. Patogenicidad del *Bacillus anthracis* y del *Clostridium chavoei* para el *Chaetophractus villosus* . *Revta. Med. Veter.* 40: 23-27
49. CAMPION, R. 1950. Receptividad del *Chaetophractus villosus* (peludo) al virus de la fiebre aftosa. *Gaceta Veterinaria* 12(63): 3-14.
50. CAPPELLO, P, TAROZZO, G, BENEDETTO, A, FASOLO, A. 1999. Proliferation and apoptosis in the most vomeronasal organ during ontogeny. *Neuroscience Letters* 266: 37-40.
51. CARMANCHAHI PD, ALDANA MARCOS HJ, FERRARI CC, AFFANNI JM 1998. A simple method for taking photographs of histological sections without using neither photographic camera nor microscope. *Biocell* . 22(3), 207-210.
52. CARMANCHAHI PD, ALDANA MARCOS HJ, FERRARI CC, AFFANNI JM 1999. The vomeronasal organ of the South American armadillo *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): anatomy, histology and ultrastructure. *Journal of Anatomy*.195: 587-604.
53. CARMANCHAHI, P. 1996. Estudio del órgano vomeronasal (de Jacobson) en un mamífero de la fauna autóctona de Argentina: *Chaetophractus villosus* (peludo). Seminario de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 99 pp..

54. CASANAVE, E. 1989 Estudio sobre las reacciones fisiológicas de *Chaetophractus villosus* sometido a enterramiento experimental. Tesis Doctoral. INIMAYDE CONICET-FCEyN (UBA).
55. CERVINO, CLAUDIO. 1997 Estudio cuantitativo de dos nuevos ritmos bioeléctricos de los bulbos olfatorios registrados en el armadillo sudamericano *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae). Tesis Doctoral, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 529 pp.
56. CERVINO, CLAUDIO. 1999. Nuevo ritmo alfa y actividad gamma en los bulbos olfatorios de un armadillo sudamericano: cuantificación y perspectivas futuras. Premio "Prof. Dr. Eduardo De Robertis", II Congreso Argentino de Neurociencia y Salud Mental, II Encuentro Interinstitucional del Neurociencia Aplicada y II Simposio Argentino de Neurociencia. Asociación Argentina de Investigación en Neurociencia.
57. CIGES M, SANCHEZ G. 1977. Ultrastructure of the organ of Jacobson and comparative study with olfactory mucosa. *Acta Otolaryngologica* 83, 47-58.
58. CLANCY, A, SINGER, A, MACRIDES, F, BRONSON, F, y AGOSTA, W. 1988. Experimental and endocrine dependense of gonadotropin responses in male mice to conspecific urine. *Biol. Reprod.* 38: 183-191.
59. COHEN, J y DUKE, R. 1992. *Annu. Rev. Immunol* 10: 267.
60. COLBERT, E. 1969. Evolution of the vertebrates. Wiley International Ed. Chap. 8 pp. 116.
61. COLTRERA, M y GOWN, A. 1991. PCNA/ Cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 39: 23-30.
62. COLLADO, P. 1990. Sexual dimorphism in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the rat. *Dev. Brain Res.*, 56: 263-268.
63. COOLEY, W. y J. TUKEY. 1965. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Math. Comput.*, 19: 297-301.
64. COOPER JG, BHATNAGAR KP 1976. Comparative anatomy of the vomeronasal organ complex in bats. *Journal of Anatomy* 122, 571-601.
65. COPE, E. 1889. Edentata of North America. *Am. Nat.*, 23:657-664.
66. CROSBY, E. 1938. The accesory olfactory bulb in phylogeny. *Anat. Rec.* 70(4) suppl. 3:19.
67. CUBA-CAPARO, A. y D. MYERS 1978. Interstitial nephritis in the seven banded armadillo *Chaetophratus Villosus* and its association with infections caused by

several types of leptospiral serotypes. In: Armadillo as an experimental model for biomedical research Scientific Publication No. 366. Pan American Health Organization, Washington D.C. pp:110-114.

68. CHAPMAN, H.. 1901. Observations upon the placenta and young of *Dasypus novemcinctus*. Proc. Acad. Nat. Sci., 53: 366-369.
69. CHEDD, G.. 1968. Armadillos, inheritance and individuality. New Scient., 39: 478.
70. CHEN Z, PACE U, HELDEMAN J, SHAPIRA A, LANCET D 1986 Isolated frog olfactory cilia: a preparation of dendritic membrane from chemosensorial neurons. Journal of Neuroscience 6, 2146-2154.
71. DAGG, A. Y TAUB, A., 1970. Flehmen. Mammalia, 34 (4): 686-695.
72. DANGUY A, AFIK F, PAJAK B, GABIUS HJ (1994) Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. Histology and Histopathology 9, 155-171.
73. DANIEL, J. y R. KRISHMAN. 1969. Studies on the relationship between uterine fluid components and the diapausing state of blastocysts from mammals having delayed implantation. J. exp. Zool., 172: 267-282.
74. DEAMER, N, O'CALLAHAN, J y GENTER, M. 1994. Olfactory toxicity resulting from dermal application of dichlobenil in the mouse. Neurotoxicology. 15: 287-294.
75. DEL ABRIL, A. 1988. Efecto de los esteroides gonadales en el desarrollo y diferenciación del núcleo de la estria terminal en la rata. Tesis doctoral. UNED. Madrid.
76. DELALEU, J. y G. SICARD. 1995. Physiological and histological recovery of the olfactory mucosa of the frog after a dichlobenil injection. Chem. Senses, 20: 433-440.
77. DÖRNER, G. 1969. Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. Neuroendoc. 4:278-281.
78. DÖRNER, G. 1976. Hormones and Brain Differentiation. Amsterdam, Elsevier.
79. DØVING KB, TROTIER D 1998 Structure and function of the vomeronasal organ. The Journal of Experimental Biology 201, 2913-2925.
80. DUKE, R. OJCIUS y DING-E YOUNG. 1997. J. Suicidio celular en la salud y en la enfermedad. Investigación y Ciencia. Febrero: 44-52.
81. DULAC, C, AXEL, R. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. Cell 83: 195-206.
82. ECCLES, R. 1982. Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. Physiol. Behav. 28: 1011-1015.

83. EECKMAN, F.H. y W.J. FREEMAN. 1990. Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. *Brain Res.*, 528(2):238-44.
84. EISTHEN HL 1992. Phylogeny of the vomeronasal system and of receptor cells types in the olfactory and vomeronasal epithelia of vertebrates. *Microscopy Research and Technique* 23, 1-21.
85. ELLIOT-SMITH, G. 1898. The brain in the Edentata. *Trans. of the Linnean Soc of London*. 2nd series, part 7:277-394.
86. EMRY, R. 1970. A North America Oligocene pangolin and other addition to the Philidota. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, N. York. 142:455-570.
87. ENDERS, A. 1960. Development and structure of the villous haemochorial placenta of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *J. Anat.*, 94(1): 34-45.
88. ENDERS, R. y D. DAVIS. 1936. Body temperatures of some central American mammals. *J. Mammal.*, 17: 165-167.
89. ENGELMANN, G. 1985. The Phylogeny of Xenarthra. The evol. and ecol. of Armad. Sloth and Vermilinguas. (G.G. Montgomery edit.) *Smith. Inst.* pp 51-64.
90. ERIKSSON, C y BRITTEBO, E. 1991. Metabolic activation of the herbicide dichlobenil in the olfactory mucosa. *Chem. Biol. Interac.* 79: 165-177.
91. ERIKSSON, C, BUSK, L y BRITTEBO, E 1996. 3- Aminobenzamide: Effects on cytochrome P 450- dependent metabolism of chemicals and on the toxicity of dichlobenil in the olfactory mucosa. *Toxicology and Applied Pharmacology* 136: 324-331.
92. ERIKSSON, C, y BRITTEBO, E. 1995. Metabolic activation of the olfactory toxicant dichlobenil in rat olfactory microsomes: Comparative studies with p-nitrophenol. *Chem. Biol. Interac.* 94: 183-196.
93. ESTECONDO, S 1995. Presentación del grupo en estudio. En: Las glándulas pelvianas de los armadillos (Mammalia, Dasipodidae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
94. ESTES R 1972 The role of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Mammalia* 36(3), 315-341.
95. FARBMAN AI 1992b Structure of olfactory mucous membrane. In *Cell Biology of Olfaction*. pp. 24-74. Cambridge: Cambridge University Press.
96. FARBMAN AI 1992a Cell biology of olfaction. New York: Cambridge University Press. pp. 282.

97. FERNANDEZ, M.. 1939. Sobre el desarrollo de los órganos en los embriones rudimentarios de la mulita (*Tatusia hybrida* Frdm). *Physis*, 18: 1-13.
98. FERRARI CC 1997 Las estructuras olfatorias de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
99. FERRARI CC, ALDANA MARCOS HJ, CARMANCHAHI P, BENÍTEZ I, AFFANNI JM 1998a. The brain of the South American armadillo *Dasypus hybridus*. A general view of its most salient features. *Biocell* 22(2), 123-140.
100. FERRARI CC, ALDANA MARCOS HJ, CARMANCHAHI PD, AFFANNI JM 1998b The olfactory mucosa of the south American armadillo *Chaetophractus villosus*: An ultrastructural study. *Anatomical Record* 252, 325-339.
101. FERRARI CC, CARMANCHAHI PD, ALDANA MARCOS HJ, MUGNAINI MT, AFFANNI JM, PAZ DA 1999 Identification and localization of glycoconjugates in the olfactory mucosa of the armadillo *Chaetophractus villosus*. *Journal of Anatomy* 194: 395-406.
102. FERRARI CC, CARMANCHAHI PD, BOLKOVIC ML, AFFANNI JM 1997 Breeding in captivity of the Southern lesser long-nosed armadillo (*Dasypus hybridus*). *Zoocriaderos* 2(3):1-5
103. FERRERO, A. y L. RIQUELME. 1995. El procesamiento. En: Análisis computado del EEG. Ed.: R. Ferrero y A. Ferrero. Fundación Argentina de estudio del Cerebro. Buenos Aires. Argentina: 76-82.
104. FLOWER, D. 1993. *Protein Sci.* 2: 753-761.
105. FLOWER, W. 1868. On the development and succession of the teeth in the armadillos (*Dasypodidae*). *Proc. Zool. Soc. Lond.* 868:378-380.
106. FOSTER J, GETCHELL M, GETCHELL T 1992 Ultrastructural localization of sialylated glycoconjugates in cells of the salamander olfactory mucosa using lectin cytochemistry. *Cell and Tissue Research* 267, 113-124.
107. FOSTER JD, GETCHELL ML, GETCHELL TV 1991 Identification of sugar residues in secretory glycoconjugates of olfactory mucosae using the lectin histochemistry. *Anatomical Record* 229, 525-544.
108. FRANCESCHINI V, LAZZARI M, REVOLTELLA RP, CIANI F. 1994. Histochemical study by lectins binding of surface glycoconjugates in the developing olfactory system of the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience* 12(3), 197-206.

109. FRECHKOP, S. 1950. La locomotion et la structure des tatous et des pangolins. *Annls. Soc. Zool. Belg., Bruxelles*, 80:5-8.
110. FURHRMANN C, BEREITER-HAHN J 1984 Coincidence of endoplasmic reticulum pattern as visualised by FITC-Con A-fluorescence and electron microscopy. *Histochemistry* 80, 153-156.
111. GALBREATH, G. 1985. The evolution of monozygotic polyembryony in *Dasypus*. In: *The evolution and ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas*. G. Montgomery (ed.). *Smith. Inst.*: 243-246.
112. GALLI, F; O. IRUSTA; C. WASSERMANN y J. AFFANNI . 1972. Byosynthesis of steroid hormones by testes and ovaries of the peludo *Chaetophractus villosus* (Edentata Mammalia). *Acta Physiol. Latinoam.* 22: 22-27.
113. GARCIA SAMARTINO, L. y J. AFFANNI. 1976. A new electric rhythm in the mammalian pars basalis rhinencephalic. *Acta Physiol. Latinoam.* 26: 518.
114. GARCIA SAMARTINO, L.. 1983. La actividad eléctrica del bulbo olfatorio y la corteza prepiriforme en *Chaetophractus villosus*. Estudio experimental de algunos de sus mecanismos de control. Tesis doctoral., Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. 213 pp.
115. GARCIA SAMARTINO, L.; A. SCARAVILLI; J. AFFANNI y R. CINTO. 1974. Estudio cuantitativo de la vigilia y el sueño en *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae). *Physis* 33C(86): 145-150.
116. GARCIA SAMARTINO, L.; J. AFFANNI; E. CASANAVE; R. FERRARI y O. IODICE. 1987. On the presence of a peculiar alpha rhythm in the olfactory tubercle of waking armadillos. *Electroenceph. and clinical Neurophysiology* 66: 185-190.
117. GARCÍA-VELASCO, J. 1991. The incidence of the vomeronasal organ in 1000 humans subjects and its possible clinical significance. *J. Steriod Biochem. Mol. Biol.* 39:561-564.
118. GAUDIN, T. 1992. The functional morphology of xenarthrous vertebrae in the armadillo *Dasypus novencinctus* (Mammalia, Xenarthra). *J. of Morphol.* 214:63-81.
119. GERHART, J. y M. KIRSCHNER 1997. Cells, embryos, and evolution. Blackwell Sciences. Massachussets, USA. pp. 1-642.
120. GERVAIS, P. 1869. Memoire sur les formes cerebrales propes aux Edentes vivant et fossiles. *Nouvelles Archives du Mus. d'Hist. Nat. de Paris*. V:1-56.

121. GETCHELL M, KULKARNI A 1995 Identification of neutrophils in the nonsensory epithelium of the vomeronasal organ in virus-antibody-free rats. *Cell and Tissue Research* 280, 139-151.
122. GETCHELL ML, GETCHELL TV 1991 Immunohistochemical localization of components of the immune barrier in the olfactory mucosa of salamanders and rats. *Anatomical Record* 231, 358-374.
123. GHERI G, GHERI, BRYK S, BALBONI GC 1992. Identification of sugar residues in human fetal olfactory epithelium using lectin histochemistry. *Acta Anatomica* 145, 167-174.
124. GILBERT, B. y L. GIACOMETTI. 1972. An environmental caging system and maintenance program for the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Lab. anim. Sci.*, 22(5): 739-740.
125. GILL, T. 1872. Arrangement of the families of mammals and synoptic tables of characters of the suborders of mammals. *Smithsonians Misc. Coll.* 230:98.
126. GLASS, B. 1985 History of classification and nomenclature in Xenarthra (Edentata). The evol. and ecol. of Armad. Sloth and Vermilinguas. 1-3. (G.G. Montgomery edit.) *Smith. Inst.*
127. GONZALEZ AGUILAR, F. y DE ROBERTIS E., 1963. A formalin perfusion fixation method for histophysiological study of the central nervous system with electron microscopy. *Neurobiology* 13: 758-771.
128. GOTMAN, J. 1990. The use of computers in analysis and display of EEG and evoked potentials. In: *Current Practice of Clinical Electroencephalography*, Second Edition. Ed. by: D. Daly and T. Pedley. Raven Press. N.Y.: 51-83.
129. GRASSE, P. 1955. *Traité de Zoologie*. Tome XVII: Mamíferes. Masson et Cie Ed. 1182 pp.
130. GRATIOLET. 1845. *Recherches sur l'organe de Jacobson*. These medicine. Paris.
131. GRIFFITHS, M , MOSS, A, ROSE, A y HATHWAY, E. 1966. The comparative metabolism of 2, 6- dichlorothiobenzamide (Prefix), and 2, 6- dichlorobenzonitrile in the dog and rat. *Biochem. J.* 98: 770-781.
132. HALPERN M, SHAPIRO LS, JIA C 1995. Differential localisation of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Research* 677, 157-162.
133. HALPERN M. 1987. The organization and function of the vomeronasal system. *Annual Review of Neuroscience* 10, 325-362.

134. HERRADA, G, y DULAC, C. 1997. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*. 90: 763-773.
135. HERRICK, C. 1921. The connections of the vomeronasal nerve, accessory olfactory bulb and amygdala in amphibia. *J.Comp.Neurol.*, 33:213-280.
136. HERZFELD, P. 1888. Ueber das Jacobson'sche organ des menschen und der saugethiere. *Zoll. Jahrb.* 3(3):551-574.
137. HOFFSTETTER, R. 1958. Edentés xénarthres. *Traité de paléontologie*. (Dir. J. Piveteau), t.VII-2:535-636 Paris.
138. HUMPHREY, T. 1940. The development of the olfactory and the accessory olfactory formations in human embryos and fetuses. *J. Comp. Neurol.*, 73:431-468.
139. ICHIKAWA, M. 1996. Neuronal development, differentiation, and plasticity in the mammalian vomeronasal system. *Zool. Sci.* 13: 627-639.
140. IHIDA K, TSUYAMA N, KASHIO N, MURATA F 1991 Subcompartment sugar residues of gastric surface mucous cells studied with labelled lectins. *Histochemistry* 95, 329-335.
141. INAMURA, K, KASHIWAYANAGI, M y KURIHARA, K 1997. Blockage of urinary responses by inhibitors for IP3- mediated pathway in rat vomeronasal sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 233: 129-132.
142. IODICE, O. 1986. On the importance of marsupials and armadillos in biomedical research. Their maintenance and reproduction in laboratory conditions. *Proceeding of the Regional/International Scientific Meeting on Laboratory Animals*. ICLAS. De. 1987. Saõ Paulo, Brasil: 292-302.
143. IODICE, O. y J. AFFANNI. 1986. Successful procedures for obtaining reproduction of *Chaetophractus villosus* and *Chaetophractus vellerosus* in laboratory conditions. *Regional/International Meeting on Laboratory Animals*. ICLAS-CEMIB-FESBE. Saõ Paulo, Brasil. Comunicación: P-2.21
144. IODICE, O. y J. AFFANNI. 1988. Animales de laboratorio no tradicionales. Mantenimiento y reproducción en condiciones de bioterio del género *Chaetophractus* (Xenarthra = Edentata, Dasypodidae). VI Congr. Arg. de Cs. Veterinarias. Buenos Aires. Argentina.
145. IRVING, L. 1942. Experimental studies of the respiration of Sloths. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 20:189.

146. JIA C, HALPERN M 1998. Neurogenesis and migration of receptor neurons in the vomeronasal sensory epithelium in the opossum, *Monodelphis domestica*. The Journal of Comparative Neurology 400, 287-297.
147. JIA, C.P. y M. HALPERN 1996. Subclases of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (Gi and Go) and segregated projections to the accessory olfactory bulb Brain Res. 719: 117-128.
148. JOB, C.; R. SANCHEZ; W. KIRCHHEIMER and R. HASTINGS. 1984. Attempts to breed the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in captivity: a preliminary report. Internat. J. of Leprosy, 52(3): 362-363.
149. JOHNS, M. 1986. The role of the vomeronasal organ in behavioral control of reproduction. (Review). Ann. N. Y. Acad. Sci. 474: 148-157.
150. JOHNSON, A. 1985. Clinical and histological evidence for the presence of the Vomeronasal (Jacobson's) organ in adults humans. J. Otolaryngol. 14:71-79.
151. KERKHOFF, W. 1924. Beitrag zur kenntnis des baues und der funktion des Jacobsonschen organs. Zeitschr. Mikr. Anat. Furschung. 1:621-638.
152. KETCHUM, K. y L. HABERLY. 1991. Fast oscillations and dispersive propagation in olfactory cortex and other cortical areas: a functional hypothesis. In: Olfaction: A model system for computational neuroscience, ed. by J. Davis and H. Eichenbaum. The MIT Press. London: 69-100.
153. KEVETTER, G, y WINANS, S. 1981. J. Comp. Neurol. 197: 81-98.
154. KIRCHHEIMER, W.. 1976. Significance of nine-banded armadillo in biomedical leprosy research. Leprosy in India, 48(4): 419-427.
155. KOLNBERGER I, ALTNER, H 1971. Ciliary-structure precursor bodies as stable constituents in the sensory cells of the vomeronasal organ of reptiles and mammals. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 118, 254-262.
156. KRATZING J 1971. The structure of the vomeronasal organ in the sheep. Journal of Anatomy 108(2), 247-260.
157. KRATZING J, WOODALL PF 1988. The rostral nasal anatomy of two elephant shrews. Journal of Anatomy 157, 135-143.
158. KRONER, C, BREER, H, SINGER, A y R.J, O. 1996. Pheromone- induced second messenger signaling in the hamster vomeronasal organ. NeuroReport 7: 2989-2992.
159. LEMAIRE C, ORANGE N, SAGLIO P, SAINT N, GAGNON J, MOLLER G 1996. Characterisation and ion channel activities of novel antibacterial proteins

from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). European Journal of Biochemistry 240, 143-149.

160. LEWIS JL, DAHL AR 1995. Olfactory mucosa: Composition, enzymatic localization and metabolism. In Handbook of olfaction and gustation (ed. Doty R), pp. 33-52. New York: Marcel Dekker Inc.
161. LIMAN, E y COREY, D. 1996. Electrophysiological characterization of chemosensory neurons from the mouse vomeronasal organ. J.Neurosci. 16: 4625-4637.
162. LOO SK, KANAGASUNTHERAM R 1972. The vomeronasal organ in tree shrew and slow loris. Journal of Anatomy 112, 165-172.
163. LUCKHAUS VG 1969. Licht und elektronenmikroskopische befunder an der lamina epithialis des vomeronasalorgans vom kaninchen. Anatomischer Anzeiger 124, 477-489.
164. LUNDH B, BROCKSTEDT U, KRISTENSSON K 1989. Lectin binding pattern of neuroepithelial and respiratory epithelial cells in the mouse nasal cavity. Histochemical Journal 21, 33-43.
165. MAGALHAES, O. de y A. ROCHA. 1944. Contribucao para o conhecimento do tifo exantemático neotrópico no Brasil. Mem. Inst. Os. Cruz, 40: 1-8
166. MANN, G. 1961. Bulbus olfactorius accessorius in Chiroptera. J. Comp. Neurol. 116(2):135-144.
167. MARIN-PADILLA, M. y K. BERNIRSCHKE. 1963. Thalidomide induced alterations in the blastocyst and placenta of the armadillo *Dasypus novemcinctus mexicanus* including a choriocarcinoma. Am. J. Path., 43: 999-1016.
168. MARIN-PADILLA, M. y K. BERNIRSCHKE. 1965. Thalidomide injury to the myocardium of armadillo embryos. J. Embryol. Exp. Morph., 13(3): 235-241.
169. MARTINEZ –MARCOS, A y HALPERN, M. 1999. Differential centrifugal afferents to the anterior and posterior accessory olfactory bulb. NeuroReport 10: 2011-2015.
170. MASU, M, TANABE, Y, TSUCHIDA, K, SHIGEMOTO, R y NAKANISHI, SS. 1991. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. Nature 349: 760-765.
171. MATSUNAMI, H, y BUCK, L. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. Cell 90: 775-784.
172. MATTHEW, W. 1918. A revision of the lower Eocene Wasatch and Wind River fauna. Part 5 Insectivora (part), Glires, Edentata. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 38:565-657.

173. MATTHEW, W. 1937. Paleocene faunas of the San Juan basin, New Mexico. Trans. Amer. Phil. Soc., 30:1-150.
174. MATTHEWS, L. 1971. The life of mammals. The Weindelfeld and Nicholson Natural History. London, Vol. II:117-131.
175. MAZZA, S. y C. ROMANA. 1935. Ulceras y edema cutáneo del tatú naturalmente infectado por *T. cruzi*. Reunión Soc. Argent. Patol. Reg. 1: 526.
176. MC KENNA, M. 1975 Toward a phylogenetic classification of the mammalia. Phylogeny of the Primates. pp 21-46. Plenum Press, New York.
177. Mc NAB, B.. 1980. Energetics and the limits to a temperate distribution in armadillos. J. Mammal., 61: 606-627
178. MENDO B Ph M 1992. Lectins bind differentially to cilia and microvilli of mayor and minor cell populations in olfactory and nasal respiratory epithelia. Microscopy Research and Technique 23, 181-199.
179. MENDO BP, FARBMAN AI 1992. Ultrastructural evidence for multiple mucous domains in frog olfactory epithelium. Cell and Tissue Research 270, 47-56.
180. MENDOZA AS 1986. The mouse vomeronasal glands: a light and electron microscopic study. Chemical Senses 11, 541-555.
181. MENDOZA AS, KUHNEL W 1987. Morphological evidence for a direct innervation of the mouse vomeronasal glands. Cell and Tissue Research 247, 457-459.
182. MEREDITH, M. Y FERNANDEZ-FEWELL, G., 1993.- Vomeronasal sistem, LHRH, and sex behaviour. Psychoneuroendocrinology. 19(5-7):657-672.
183. MEREDITH, M.. 1986. Patterned response to odor in mammalian olfactory bulb: the influence of intensity. J. Neurophysiol., 56: 572-597.
184. MERITT, D.. 1973. Edentates diets. I. Armadillos. Lab. Anim. Sci., 23(4): 540-542.
185. MEYERS, W.; G. WALSH, C. BINFORD; E. STORRS and H. BROWN. 1978. Indigenous Leprosy in nine-banded armadillos. In: The armadillo as an experimental model for biomedical research. Scientific Publication Nro 366. Pan american Health Organization. Washington: 67-76.
186. MIHALKOVICS, V. 1898. Nasenhohle und Jacobsonsehes organ. Anat. Hefte, 11:3-107.

187. MILOSEVIC, A, KANAZIR, S y ZECEVIC, N. 1995. Immunocytochemical localization of growth-associated protein GAP-43 in early human development. *Developmental Brain Research*. 84: 282-286.
188. MILLAN, S. de; E. RESOAGLI; A. MARTINEZ y J. RESOAGLI. 1986. Patología del armadillo en cautividad. I. Afecciones de la piel y anexos. *Vet. Arg.* III(25).
189. MIRAGAL F, BREIPOHL W, BHATNAGAR K (1979) Ultrastructural investigation on the cell membranes of the vomeronasal organ in the rat: a freeze-etching study. *Cell and Tissue Research* 227, 519-534.
190. MONTGOMERY, G. 1985. Impact of Vermilinguas on arboreal ant populations. The evol. and ecol. of Armad. Sloth and Vermilinguas. (G.G. Montgomery edit.) *Smith. Inst.* pp 351-364.
191. MONTI-BLOCH, L y GROSSER, B. 1991. Effect of putative pheromones on the electrical activity of the human vomeronasal organ and olfactory epithelium. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39: 573-582.
192. MONTI-BLOCH, L, JENNINGS-WHITE, C, DOLBERG, D y BERLINER, D. 1994. The human vomeronasal system. *Psychoneuroendocrinology*. 19: 673-686.
193. MORAN D, MONTI-BLOCH L, STENSAAS L, BERLINER D 1995. Structure and function of the human vomeronasal organ. In *Handbook of olfaction and gustation* (ed. Doty R), pp. 793-820. New York: Marcel Dekker Inc.
194. MORAN, D. 1985. Ultrastructure of the Vomeronasal organ in man. *Chem. Senses* 10:420-421.
195. MORAN, D. 1991. The Vomeronasal (Jacobson's) organ in man: ultrastructure and frequency of occurrence. *J. Steriod Biochem. Mol. Biol.* 39:545-552.
196. MORI, K. 1987. Projections of two subclasses of vomeronasal nerve fibers to the accessory olfactory bulb in the rabbit". *Neuroscience* . 20(1):259-278.
197. MOULTON, D. 1967. Olfaction in mammals. *Am. Zool.* 7(3):421-429.
198. MUCIGNAT-CARETTA, C, CARETTA, A y CAVAGGIONI, A. 1995. *J. Physiol.* 486: 517-522.
199. MURER, G. y L. RIQUELME. 1995. Generalidades. En: *Análisis computado del EEG*. Ed.: R. Ferrero y A. Ferrero. Fundación Argentina de estudio del Cerebro. Buenos Aires. Argentina: 41-53.

200. NAKAJIMA T, SHIRATORI K, OGAWA K, TANIOKA Y, TANIGUCHI K 1998. Lectin-binding patterns in the olfactory epithelium and vomeronasal organ of the common marmoset. *Journal of Veterinary Medicine Science* 60(9), 1005-1011.
201. NEGUS V 1958. The comparative anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. pp. 402. London: Livingstone Ltd.
202. NEWMAN, C. 1942. Armadillo eats young rabbits. *J. of Mamm.* 23(4):450.
203. NIH (National Institute of Health - USA Department of Health and Human Services). 1985. Laboratory Animal Husbandry. In: Guide for the care and use of laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23. pp: 11-31
204. NOVACEK MJ 1994. The radiation of placental mammals. In Major features of vertebrate evolution. Short courses in Paleontology. (ed. Randall Spencer Series). pp. 220-237. London: Publication of the Paleontological Society.
205. OELSCHLÄGER, H. 1989. Early development of the olfactory and terminalis systems in baleen whales. *Brain Behav. Evol.*, 34:171-183.
206. OHNO K, KAWASAKI Y, KUBO T, TOHYAMA M 1996. Differential expression of odorant-binding protein genes in rat nasal glands: implication for odorant binding protein as a possible pheromone transporter. *Neuroscience* 71, 355-366.
207. OIKAWA T, SHIMAMURA K, SAITO T, TANIGUCHI K .1993. Fine structure of the vomeronasal organ in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Experimental Animal* 42 (3), 411-419.
208. ORTEGO, LS; HAWKINS, WE; WALKER, WW; KROL, RM y BENSON, WH. 1994. Detection of Proliferating Cell Nuclear Antigen in tissues of three small fish species. *Biotechnics and Histochemistry* 69(6): 317-323.
209. PAPPAS, W. 1971. *Stain Technology*, 46, (3):121-124.
210. PARSON, T. 1959. Nasal anatomy and the phylogeny of reptiles. *Evolution* 13:175-187.
211. PARSONS, T. 1967. Evolution of the nasal structures in the lower tetrapods. *Amer. Zool.* 7:397-413.
212. PARSONS, T. 1970. The nose and Jacobson's organ. C. Gans (Ed.), *Biology of the reptile 2: Morphology B* (2). pp 99-191. Academic Press. London.

213. PATTERSON, B. y PASCUAL, R. 1968 Evolution of mammals on Southern continents. V. The fossil mammal fauna of South America. *Quart. Rev. Biol.*, 43(4):409-451.
214. PEARSE, E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill Livingstone.
215. PLANEL, H. 1951. Etude anatomique et physiologique sur les fosses nasales des Rongeurs. These médecine. Toulouse.
216. POLYZONIS, B.M., P.M. KAFANDARIS, P.I. GIGIS, AND T. DEMETRIOU 1979. An electron microscopic study of human olfactory mucosa. *Journal of Anatomy*, 128(1), 77-83.
217. POWERS, B y WINANS, S., 1975.- Vomeronasal organ: Critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science* 187:961-963.
218. QUEVEDO, F.; J. LASTRA and B. MARTINEZ. 1978. The armadillo as a reservoir host of salmonella. In: *Armadillo as an experimental model for biomedical research*. Scientific Publication. Nro. 366. Pan American Health Organization, Washington. D.C. pp. 115-117.
219. RAISMAN, G. 1971. Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. *Science*. 173:731-733.
220. RALPH, CH. 1979. "The pineal complex and thermoregulation". *Biol. Rev.* 54:41-72.
221. RAMA KRISHNA NS, GETCHELL ML, GETCHELL TV 1994. Expression of the putative pheromone and odorant transporter vomeromodulin mRNA and protein in nasal chemosensory mucosae. *Journal of Neuroscience Research* 39, 243-259
222. REIG, O. 1981. Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. *Monographiae Naturae*, Public. Mus. Munic. de Cs. Nat. "Lorenzo Scaglia", 1, Mar del Plata.
223. RESOAGLI, E.; A. MARTINEZ; S. RESOAGLI; S. de MILLAN; M. de ROTT y M. MARTINEZ. 1982. Mycobacteriosis natural en armadillos similar a lepra humana. *Gac. Vet.*, 44: 674-676.
224. RESOAGLI, E.; S. de MILLAN; A. MARTINEZ; J. RESOAGLI; M. RAMIREZ y M. de ROTT. 1986. El armadillo en su etapa de adaptación al cautiverio. *Vet. Arg.* III(23): 258-264.
225. RESOAGLI, J.; E. RESOAGLI; M. de ROTT; S. de MILLAN y M. RAMIREZ. 1985. Patología del armadillo en cautividad. II. Etiología y diagnóstico de las afecciones respiratorias. *Vet. Arg.* II(20): 924-930.

226. RETZIUS, G. 1894. Die Riechzellen der Ophidier in der Rieschschleimhaut und im Jacobson'schen Organ. Biol. Untersuch. Neue Folge. 6: 48-51.
227. ROBERTSON, D, BEYNON, R. Y EVERSHED, R. 1993. J. Chem. Ecol. 19: 1405-1414.
228. ROIG, V.. 1971. Observaciones sobre la termorregulación en *Zaedyus pichiy*. Acta Zool. Lilloana, 28: 13-18.
229. ROMER, A. 1966. Vertebrate paleontology. 3rd Ed. Univ. of Chicago Press, Chicago, III. 468pp.
230. RUDEBECK, B. 1944. Does olfactory accessory bulb exist in Dipnoi ?. Acta Zool. 25:89-96.
231. RYBA, N y TIRINDELLI, R. 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. Neuron 19: 371-379.
232. SAITO H, OGAWA K, TANIGUCHI K 1994. Lectin-binding patterns of the olfactory receptors (Olfactory epithelium, Vomeronasal Organ and Septal Olfactory organ of Mase) on the rat. *Experimental Animal* 43(1), 51-60.
233. SAITO, T. 1986. Copulatory behavior in the female rat following removal of the vomeronasal organ. Physiol. Behav. 38:81-87.
234. SALAZAR I, SANCHEZ QUINTEIROS P 1998. Lectin binding pattern in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. *Anatomy and Embryology* 198, 331-339.
235. SARICH, V. M. 1985 Xenarthran Systematics: albumin immunological evidence. The evol. and ecol. of Armad. Sloths and Vermilinguas. pp. 77-81. (G.G. Montgomery edit.) Smith. Inst.
236. SCAGLIA, F. y WINANS, S. 1975.- The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *The journal of comparative neurology*. 161(1):31-56.
237. SCILLATO-YANE, G. 1982 Los Dasypodidae (Mammalia, Edentata) del Plioceno y Pleistoceno de Argentina. Tesis Doctoral. Fac. de Cs. Nat., UNLP.
238. SCOTT, W. 1937. A history of land mammals in the western hemisphere. Rev. ed. N. York. MacMillan & Co., pp 786.
239. SCHILLING, A. 1970. L'organe de Jacobson du lemurien malgache *Microcebus murinus* (Miller, 1777). Mem. Mus. d'Hist. Nat. Paris, 61(serie A):203-280.

240. SCHNEIDER, K. 1930. Das Flehmen. Part. 1. Zool. Garten, 3(4/8):183-198.
241. SCHOLANDER, P.; L. IRVING and S. GRINNELL. 1942. Respiration of the armadillo with possible implications as to its burrowing. J. Cell comp. Physiol., 21: 53-63
242. SCHWARTING, G, y CRANDALL, J. 1991. Subsets of olfactory and vomeronasal sensory epithelial cells and axons revealed by monoclonal antibodies to carbohydrate antigens. Brain research. 547: 239-248.
243. SEGOVIA, S. 1982. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. Dev. Brain Res., 5:209-212.
244. SEGOVIA, S. 1986. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal system in the rat. W. Breipohl (Ed.), Ontogeny of olfaction in vertebrates. Springer, Berlin. pp. 35-41.
245. SEGOVIA, S. y GUILLAMÓN, A., 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. Brain research reviews. 18:51-74.
246. SHACKELFORD, J. 1963. The salivary glands and salivary bladder of the nine-banded armadillo. Anat. Rec. 145(4):513-519.
247. SHAPIRO LS, EE PL, HALPERN M 1995. Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in Opossum chemosensory system during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. Journal of Morphology 224, 331-349.
248. SHEEHAN DC, HRAPCHAK BB 1980. Bone. In Theory and practice of Histotechnology. pp. 89-117. London: The C.V. Mosby Company,.
249. SHINOHARA, H.; T. ASANO y K. KATO 1992. Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. J. Neurosci. 12: 1275-1279.
250. SIMPSON, F. 1932. Enamel on the teeth of an Eocene Edentate. Am. Mus. Novit., N. York. 567:1-4.
251. SIMPSON, G. 1931. Metacheiromys and the relationships of the Edentata. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., N. York. 59(6):295-381.
252. SIMPSON, G. 1945 The principles of Classifications and a classification of mammals. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., N. York 85:1-350.
253. SIMPSON, G. 1978 Early mammals in South American: fact, controversy and mystery. Proc. Amer. Philos. Soc. 122:318-329.

254. SPICER SS, SCHULTE BA 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40, 1-38.
255. STAUDT, J. 1976. Structural changes in the medial and central amygdala of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Endocrinology*. 67:296-300.
256. STENSAAS, L. 1991. Ultrastructure of the human vomeronasal organ. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39:553-560.
257. STORRS, E. y W. GREER. 1973. Maintenance and husbandry of armadillo colonies. *Lab. Anim. Sci.*, 23(6): 823-829.
258. STORRS, E.. 1971. The nine-banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. *Inter. J. Leprosy*, 39: 703-714.
259. STORRS, E.; G. WALLS; H. BURCHFIELD y C. BINFORD. 1974. Leprosy in the armadillo: new model for biomedical research. *Science*, 183 (4127): 851-852
260. STORY, R. 1964. The olfactory bulbar formation and related nuclei of the paddlefish (*Polyodon Spathula*). *J. Comp. Neurol.* 123:285-298.
261. SUGAI, T.; M. SUGITANI y N. ONADA 1997. Subdivisions of the guinea pig accessory olfactory bulb revealed by the combined method with immunohistochemistry, electrophysiological and optical recordings. *Neuroscience* 79: 871-885.
262. SZABUNIEWICZ, M.; H. HOFF and J. Mc CRADY. 1970. Spontaneous ventricular defibrillation in the armadillo. *Cardiovascular Research Center Bull.*, 8(4): 135-147.
263. TAKAMI S, GETCHELL M, GETCHELL T 1994. Lectin histochemical localisation of galactose, N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine in glycoconjugates of the rat vomeronasal organ, with comparison to the olfactory and septal mucosae. *Cell and Tissue Research* 277, 211-230.
264. TAKAMI, S, GETCHELL, M, CHEN, Y, MONTI-BLOCH, L, BERLINER, D, STENSAAS, L y GETCHELL, T. 1993. Vomeronasal epithelial cells of the adult human express neuron-specific molecules. *NeuroReport* 4: 375-378.
265. TAKAMI, S. y GRAZIADEI, P., 1991. Light microscopic golgi study of mitral/tufted cells in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *The journal of comparative neurology*. 311:65-83.
266. TANDLER B 1993. Structure of mucous cells in salivary glands. *Microscopic Research and Techniques* 26, 49-56.

267. TANDLER B y PHILLIPS CJ 1993. Structure of serous cells in salivary glands. *Microscopic Research and Techniques* 26, 32-48.
268. TANIGUCHI K, MATSUSAKI Y, OGAWA K, SAITO T 1992. Fine structure of the vomeronasal organ in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Folia Primatologica* 59, 169-176.
269. TANIGUCHI K, MIKAMI S 1985. Fine structure of the epithelia of the vomeronasal organ of horse and cattle. A comparative study. *Cell and Tissue Research* 240, 41-48.
270. TANIGUCHI K, MOCHIZUKI K 1983. Comparative morphological studies on the vomeronasal organ in rats, mice and rabbits. *Japanese Journal of Veterinary Science* 45, 67-76.
271. TAROZZI, CAPPELLO, P, DE ANDREA, M, WALTERS, E, MARGOLIS, F, OESTREICHER, A y FASOLO, A. 1998. Prenatal differentiation of mouse vomeronasal neurones. *Eur. J. Neurosci.* 10: 392-396.
272. TIRINDELLI, R, MUCIGNAT-CARETTA, C y RYBA, N. 1998. Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* 21: 482-486.
273. VELLUTTI, R. 1997. Interactions between sleep and sensory physiology. *J. Sleep Res.* 6: 61-77
274. VACCAREZZA OL, SEPICH LN, TRAMEZZANI JH 1981. The vomeronasal organ of the rat. *Journal of Anatomy* 132, 167-185.
275. VAN DER LEE, S, y BOOT, L. 1955. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 4: 442-443.
276. VANDERBERGH, J. 1969. *Endocrinology.* 84: 658-660.
277. VON CAMPENHAUSEN, H, YOSHIIHARA, Y y MORI, K. 1997. OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *NeuroReport* 8: 2607-2612.
278. WAMPLER, S.. 1969. Husbandry and health problems of armadillos, *Dasypus novemcinctus*. *Lab. Anim. Sci.*, 19(3): 391-393.
279. WANG, R y HALPERN, N. 1980. Light and electron microscopic observation on the normal structure of the vomeronasal organ of garter snakes. *J. Morphol.* 164: 47-67.
280. WANG, R y HALPERN, N. 1988. Neurogenesis in the vomeronasal epithelium of adult garter snakes: 3. Use of H^3 thymidine autoradiography to trace the genesis and migration of bipolar neurons. *Am. J. Anat.* 183: 178-185.

281. WEISS, L. y G. WISLOCKI. 1956. Seasonal variations in hematopoiesis in the dermal bones of the nine-banded armadillo. *Anat. Rec.*, 126(2): 143-163.
282. WEKESA, K y ANHOLT, R. 1997. Pheromone regulated production of inositol- (1, 4, 5)- Triphosphate in the mammalian vomeronasal organ. *Endocrinology* 138: 3497-3504.
283. WETZEL, R. 1982. Systematics, distribution, ecology and conservation of South American Edentates in *Mammalian biology in South America*. Univ. Pittsburg, Special publication, Pymatuning lab of Ecology. Vol.6:345-375.
284. WETZEL, R. 1985a. The identification and distribution of recent Xenarthra (=Edentata). The evol. and ecol. of Armad. Sloth and Vermilinguas. (G.G. Montgomery edit.) *Smith. Inst.* pp 5-28.
285. WETZEL, R. 1985b. Taxonomy and distribution of armadillos, Dasypodidae. The evol. and ecol. of Armad. Sloth and Vermilinguas. (G.G. Montgomery edit.) *Smith. Inst.* pp 23-46.
286. WHITTEN, W. 1966. *Adv. Reprod. Physiol.* 1: 155-177.
287. WILHAMS, D. 1985. The somatic chromosomes of Xenarthra. The evol. and ecol. of Armad. Sloth and Vermilinguas. (G.G. Montgomery edit.) *Smith. Inst.* pp 121-129.
288. WILSON, K. y RAISMAN G., 1980. Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: extended period of postnasal growth in the size and evidence for rapid cell turn over in the adult. *Brain. Research.* 185 (1): 103-113.
289. WINANS, S. y SCAGLIA, F., 1970.- Amygdaloid nucleus: New afferent input from the vomeronasal organ. *Science*, 170(3955):330-332.
290. WINANS, S. y POWERS, B. 1977.- Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: Histological and behavioral analyses. *Brain research.* 126:325-344.
291. WISLOCKI, G. 1933. Location of the testes and body temperature in mammals. *The quarterly Review of Biology.* VIII(4):385- 396.
292. WISLOCKI, G. y R. ENDERS. 1935. Body temperature of Sloths anteaters and armadillos. *J. Mammal.*, 16(4): 328-329.
293. WIT, J, y GENDEREN, H. 1966. Metabolism of the herbicide 2, 6-dichorobenzonitrile in rabbits and rats. *Biochem. J.* 161: 698-706.
294. WYSOCKI CJ, NYBY J, WHITNEY G, BEAUCHAMP GK, KATZ Y 1982. The vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiological Behaviour* 29, 315-327.

295. WYSOCKI, C. 1987. The vomeronasal system. Finger & Silver (Ed.), Neurobiology of taste and Smell. J. Wiley, N. York, pp 125-150.
296. WYSOCKI, C.. 1979. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 3: 301-341.
297. YOUNG, J. 1962. The life of vertebrates. 2nd. ed., Oxford, pp 820.

