

Tesis Doctoral

# El sistema olfatorio y vomeronasal en larvas de anfibios anuros y su participación en la detección de estímulos químicos en el ambiente

Jungblut, Lucas David

2012

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Jungblut, Lucas David. (2012). El sistema olfatorio y vomeronasal en larvas de anfibios anuros y su participación en la detección de estímulos químicos en el ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Jungblut, Lucas David. "El sistema olfatorio y vomeronasal en larvas de anfibios anuros y su participación en la detección de estímulos químicos en el ambiente". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGIA EXPERIMENTAL

El sistema olfatorio y vomeronasal en larvas de  
anfibios anuros y su participación en la detección de  
estímulos químicos en el ambiente

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Autor:** Lic. Lucas David Jungblut

Director de tesis: Dr. Dante A. Paz

Directora asistente: Dra. Andrea G. Pozzi

Consejera de estudios: Dra. Paula Vissio

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología del Desarrollo – Dpto. de  
Biodiversidad y Biología Experimental - Instituto de Fisiología, Biología  
Molecular y Neurociencias - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA-  
CONICET.

Buenos Aires, 2012

# **El sistema olfatorio y vomeronasal en larvas de anfibios anuros y su participación en la detección de estímulos químicos en el ambiente**

## **Resumen**

La mayoría de los tetrápodos poseen dos órganos quimiosensoriales nasales: el epitelio olfatorio (EO) y el órgano vomeronasal (OVN). Ambos sistemas sensoriales, olfatorio (SO) y vomeronasal (SVN), presentan diferencias morfológicas, bioquímicas y moleculares lo que indica que participan en procesos fisiológicos diferentes. Usualmente se asocia al SVN con la detección de feromonas, mientras que el SO participaría en la detección de “olores comunes” no vinculados a la comunicación intraespecífica. Sin embargo, varias evidencias contradicen esta hipótesis y actualmente no está claro cuáles serían las funciones diferenciales de ambos sistemas sensoriales, o qué tipo de estímulos son detectados en cada uno de ellos. Más aún, inclusive el propio origen de este sistema “dual” de quimiodetección, durante la evolución de los vertebrados, presenta algunas controversias. Generalmente se interpreta que el SVN apareció en tetrápodos como consecuencia de la adaptación al ambiente terrestre. Sin embargo, las evidencias moleculares y morfológicas actuales sugieren que tanto el SO como el SVN aparecieron tempranamente en la filogenia de los vertebrados, probablemente en un ancestro común acuático de los tetrápodos; aunque nada se sabe de la funcionalidad del SVN en este ambiente.

En este contexto, los anfibios constituyen un grupo sumamente interesante para el estudio de los sistemas quimiosensoriales en tetrápodos ya que poseen una etapa larval acuática. Las pocas especies estudiadas hasta la actualidad sugieren que las larvas de anuros poseen tanto SO como SVN, pero nunca se ha realizado un análisis comparado abarcando un número considerable de especies. Por otra parte, los renacuajos presentan un repertorio muy variado de comportamientos mediados por detección de claves químicas, como: detección de comida, predadores, señales de alarma liberadas por coespecíficos, etc. Curiosamente, nada se sabe de la participación de los distintos sistemas quimiosensoriales en la detección de estos estímulos.

En la presente tesis se analizaron larvas de catorce especies de anuros, en las cuales se demuestra que, tanto el SO como el SVN, se desarrollan tempranamente y están presentes durante toda la etapa larval. Las características morfológicas, histológicas y bioquímicas observadas en varias de estas especies, sugieren que un grado importante de maduración, se alcanza en ambos sistemas sensoriales durante la etapa larval. Las neuronas del EO y el OVN expresan marcadores específicos descritos en neuronas quimiosensoriales de otros vertebrados. Además, sus axones proyectan a zonas específicas de telencéfalo: el bulbo olfatorio principal y accesorio, respectivamente, donde establecen conexiones sinápticas. Estas características nos hacen suponer que ambos sistemas sensoriales son funcionales en renacuajos.

Finalmente, se ha caracterizado, en larvas del sapo común *Rhinella arenarum*, las respuestas comportamentales a dos tipos de estímulos diferentes mediados por detección de claves químicas. Por un lado, la detección de estímulos que indican la presencia de una fuente de alimento, y por otro, la detección de señales de alarma liberadas por otros renacuajos, un fenómeno de comunicación social conocido en larvas de otras especies de anuros. Ambos estímulos parecen estar mediados por el SO en *R. arenarum*, ya que las larvas con OVN ablacionado responden igual que los controles, mientras que si se ablaiona el EO las respuestas comportamentales a ambos estímulos desaparecen. Además, los análisis cuantitativos de activación neuronal mostraron que el número de neuronas sensoriales activadas aumenta en el EO luego de la exposición a ambos estímulos, mientras que en el OVN no varía respecto a los controles.

Palabras clave: renacuajos, anfibios anuros, quimiodetección, sistema olfatorio, sistema vomeronasal.

# **The olfactory and vomeronasal system in anuran amphibian larvae and their involvement in the environmental chemical cues detection**

## **Abstract**

Most tetrapods have two nasal chemosensory organs: the olfactory epithelium (OE) and the vomeronasal organ (VNO). Both sensory systems, olfactory (OS) and vomeronasal (VNS), are morphologically, biochemically and molecularly different, indicating that they are involved in different physiological processes. The VNS is usually associated with pheromone detection, while the OS would detect “common odours”, which may not be involved in intraspecific communication. This hypothesis, however, has been contradicted by several data, and it is not clear, at this time, which would be the relative functions of the OS and the VNS or what kinds of stimuli are detected by each sensory system. Moreover, even the evolutionary origin of this “dual” chemosensory system during vertebrates’ evolution is still controversial. It is generally believed that the VNS arose in tetrapods as an adaptation to terrestrial environment. However, the current molecular and morphological evidence, suggest that both OS and VNS appeared early in vertebrate evolution, probably in a common aquatic ancestor of tetrapods, but nothing is known about the functionality of VNS in aquatic environment.

In this context, amphibians represent an extremely interesting group to study chemosensory systems among tetrapods, as they have an aquatic larval stage. The few species analysed to the present suggest that anuran larvae have both an OS and a VNS, but a comparative analysis involving a considerable number of species has never been carried out. By the other hand, tadpoles show a diverse repertoire of chemodetection mediated behaviors, such as food detection, predators’ recognition, alarm signals released by conspecifics, etc. Curiously, nothing is known about the involvement of the different chemosensory systems in detecting these stimuli.

In this thesis, the analysis of 14 different anuran larvae species demonstrates that both, the OS and the SVN, are early developed in anurans, and both sensory system are present throughout the entire larval stage. The morphological, histological and biochemical characteristics founded in many of these species, suggest that a significant level of maturity is reached in both sensory systems during the larval stage of anurans. Chemosensory neurons of the EO and the VNO express specific markers described in chemosensory neurons of other vertebrates. Moreover, axons from olfactory and vomeronasal chemosensory neurons project to specific areas in the telencephalon: the main and accessory olfactory bulb, respectively, where they establish synaptic connections. These features led us to speculate that both sensory systems are functional in tadpoles.

Finally, the behavioural responses to two different stimuli, mediated by chemical cues detection, has been characterized in larvae of the common toad *Rhinella arenarum*. First, the chemodetection of cues that indicate the presence

of a food source. And second, the chemodetection of alarm signals released by other tadpoles, a social communication phenomenon widely known in other anuran larvae species. Both stimuli appear to be mediated by the OS in *R. arenarum* as larvae without VNO responded equally to the control animals, while if the EO is removed the behavioural responses to both stimuli was not observed. In addition, the quantitative analyses of activated neurons shows that the number of chemosensory neurons activated increases in the EO after exposure to both stimuli, while there is no detectable variation in the VNO compared to control animals.

Keywords: tadpoles, anuran amphibian, chemodetection, olfactory system, vomeronasal system.

## **Agradecimientos**

A Dante y Andrea, por permitirme formar parte de su Laboratorio todos estos años, por transmitirme su experiencia y sus conocimientos, por preocuparse siempre de que nunca me faltara nada para trabajar, por darme la libertad de redireccionar este trabajo hacia donde la curiosidad te lleva y no hacia donde la necesidad obliga. Pero, fundamentalmente gracias por trascender lo académico y saber que cuento con Uds. en aquellas cosas que, en definitiva, son las únicas que importan.

Al resto de la gente del Labo, que está o estuvo: Caro, Caro, Eve, Jime, Kot, Mari, Mari, Mijal, Vicky y demás. Que siempre están dispuestos a dar una mano desinteresada y con quienes he compartido mesada, mate y todas esas cosas que, sin duda, hacen al día a día más llevadero.

A la gente del laboratorio de Embriología Animal. Particularmente: Fabi, Fer, Dani, Maxi, Matías y Paula, con quienes compartí experiencias docentes fantásticas en estos años.

A la gente de los demás laboratorios “cercanos”: Endócrino, Reproducción y el resto, por el intercambio de drogas y sustancias, recetas, charlas y demases.

A mi familia, que aunque todos están lejos y nos vemos poco, los encuentros siempre son algo especial.

A mi familia íntima: Vale y Vera. Gracias por el aguante, por el apoyo, la comprensión, por darme fuerzas. Gracias Vale por elegirme y por “hacer” a Vera, esa minipersonita que digita cada aspecto de lo cotidiano, yo diría casi desde su concepción, y quien ha hecho que todo pase a un segundo plano.

A los amigos, los de ahora, los de siempre, los de la facu, y a los que por cuestiones circunstanciales hace tiempo que no veo... volveré... y seré Dr.

A Julián Faivovich, cuyos consejos y puntos de vista hicieron que finalmente tomara la senda temática que derivó en este trabajo de tesis.

A toda la gente de la división de Herpetología del MACN “Bernardino Rivadavia”:  
Boris, Carlos, Andrés, Sebastián, Martín, Daiana y demás, que siempre  
tuvieron un mate caliente cada vez que he pasado por la colección.

A Carlos Taboada y fundamentalmente a Andrés Bruneti por su desinteresada  
colaboración en las salidas de recolección de animales al campo.

A la Dra. Sara Sanchez y toda su gente del INSIBIO Tucumán, que me trataron  
maravillosamente bien cuando estuve por allí y compartieron conmigo todos  
sus conocimientos de cría y reproducción en cautiverio de *Xenopus laevis*.

A la Dra. Lidia Szczyrak por abrirme las puertas de su laboratorio, donde realicé  
mis primeras pruebas de marcado de trazos neuronales junto a la Dra. María  
Ana Calvigno.

A Martín Verón de Astrada, por las innumerables consultas respecto al  
microscopio confocal, Dyes, trazadores neuronales y demases.

A Maxi Cánepa y Mariano Soiza Reilly por los momentos compartidos cuando  
habitaban por aquí y por enseñarme casi todo lo que sé sobre la cocina de la  
biología molecular, que aunque finalmente el fruto de ese trabajo no fue  
incluido en esta tesis, son cosas que quedan.

Al Dr. Francisco Urbano y su gente, que generosamente me ofrecieron equipos y  
reactivos para mis experimentos de movilización de calcio, que, aunque esto  
tampoco entró para esta tesis, no dudo que dará buenos resultados.

Finalmente, quisiera agradecer a las instituciones que también hicieron posible  
mi formación doctoral.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

A la Universidad de Buenos Aires

Y al CONICET, por financiar mí doctorado con sus becas todos estos años.



### **Publicaciones surgidas de esta Tesis Doctoral:**

- Heterogeneous distribution of G protein alpha subunits in the main olfactory and vomeronasal system of *Rhinella (Bufo) arenarum* tadpoles (2009).

*Zoological science* **26**: 722-728

Autores: **Jungblut LD**, Paz DA, López-Costas JJ, Pozzi AG.

- Larval Development and Metamorphosis of the Olfactory and Vomeronasal Organs in the Toad *Rhinella (Bufo) Arenarum* (Hensel 1867) (2011).

*Acta Zoologica* **92**: 305-315

Autores: **Jungblut LD**, Pozzi AG, Paz DA.

- A putative functional vomeronasal system in anuran tadpoles (2012).

*Journal of Anatomy* **221(4)**: 364-372

Autores: **Jungblut LD**, Pozzi AG, Paz DA.

- El sistema vomeronasal y su posible funcionalidad en larvas de anuros (2012). *Cuadernos de Herpetología* (En prensa)

Autores: **Jungblut LD**, Pozzi AG, Paz DA.

- Morphometric changes in the nasal chemosensory organs during larval development and metamorphosis in tree anuran amphibians: *Hypsiboas pulchellus*, *Rhinella arenarum* and *Xenopus laevis*. (En preparación)

- Olfactory epithelium but not vomeronasal organ integrity is required for food and alarm cues detection in tadpoles of the common toad *Rhinella arenarum* (En preparación)

### **Otras publicaciones relacionadas surgidas durante el transcurso de esta Tesis Doctoral:**

- Amphibian Larvae And Zinc Sulphate: A Suitable Model To Study The Role Of Brain-Derived Neurotrophic Factor In The Neuronal Turnover of The Olfactory Epithelium (2009). *Cell and Tissue Research* 336: 1-9

Autores: Yovanovich CA, **Jungblut LD**, Heer T, Pozzi AG, Paz DA.

- Disruptive Effect of Epigallocatechin-3-Gallate on the Proliferation/Apoptosis Balance in the Olfactory Epithelium (2010). *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology* **3**: 20-25

Autores: **Jungblut LD**, Paz DA, Pozzi AG.

- A curious case of herbivory in the common toad *Rhinella arenarum arenarum* during hibernation in captivity conditions (2012). *Cuadernos de Herpetología* (En prensa).

Autores: **Jungblut LD**, Pozzi AG, Paz DA.

## Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Agradecimientos.....	v
Publicaciones surgidas de esta Tesis Doctoral .....	vii
Índice .....	ix
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
Diferencias y algunas semejanzas entre el SO y el SVN.....	5
Sobre la aparición de un sistema dual de quimiodetección en la evolución de vertebrados. ¿La tierra o el agua? .....	8
Sobre la funcionalidad del SVN y el SO .....	11
El modelo de estudio: los renacuajos .....	13
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO I</b>	
Aspectos morfológicos e histológicos del sistema olfatorio y vomeronasal en renacuajos	
Introducción.....	18
Objetivos.....	20
Materiales y métodos.....	21
Resultados.....	25
Conclusiones y discusión.....	43
<b>CAPÍTULO II</b>	
Evaluación de la madurez del sistema olfatorio y vomeronasal en renacuajos	
Introducción.....	50
Objetivos.....	53
Materiales y métodos.....	54
Resultados.....	58

Conclusiones y discusión.....	72
-------------------------------	----

### CAPÍTULO III

#### Participación de los sistemas quimiosensoriales nasales en la detección de estímulos específicos

Introducción.....	79
Objetivos.....	83
Materiales y métodos.....	84
Resultados.....	93
Conclusiones y discusión.....	106

### CONCLUSIONES Y

DISCUSIÓN GENERAL.....	114
------------------------	-----

APÉNDICE.....	120
---------------	-----

BIBLIOGRAFÍA.....	123
-------------------	-----

# **Introducción general**

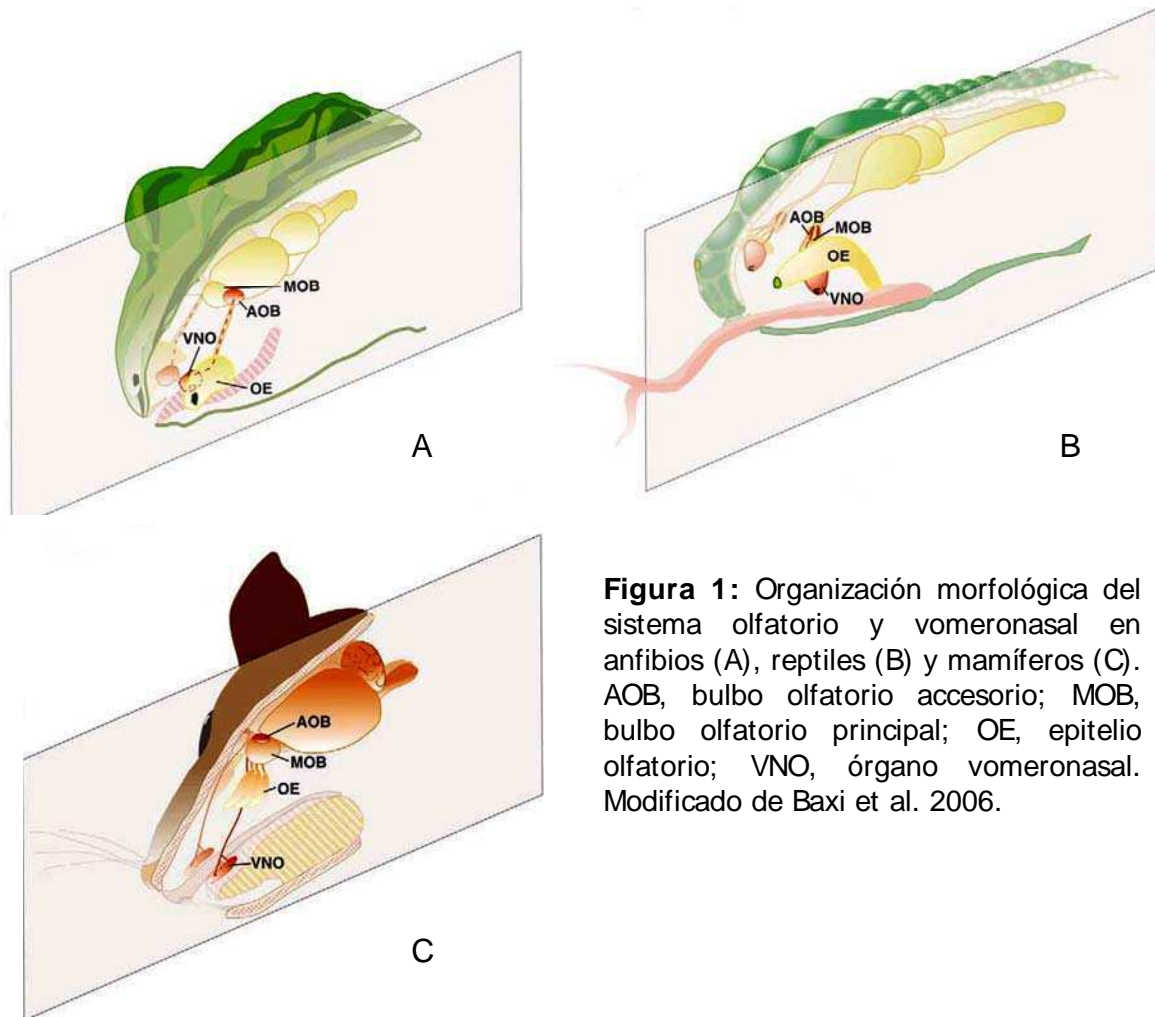
*Science is a cyclic affair. With each advance, we feel we have come to grips with problems, and clever solutions are obvious. Soon, conflicting data arise, and the old explanations are either insufficient or simply wrong*

Brunjes y Greer – “Progress and Directions in Olfactory Development”

Es difícil para los humanos, al ser tan dependientes del sentido de la visión, comprender la importancia fundamental que tiene la detección de estímulos químicos ambientales (quimiodetección) para los seres vivos. La capacidad de detectar y responder de manera adaptativa a las señales químicas resulta esencial para la supervivencia y la reproducción de los organismos y, en muchas especies animales, esta vía sensorial es la principal ventana de conexión con el mundo externo (Prasad y Reed, 1999; Ache y Young, 2005). La detección de olores provenientes del ambiente ayuda a los animales en la localización de recursos fundamentales como alimento, agua o sitios de nidificación. Además, la detección de moléculas producidas y liberadas por otros organismos afecta el comportamiento y la fisiología del animal receptor. Estos mecanismos son evidentes en la interacción predador-presa, en la localización de potenciales parejas reproductivas, en el marcado territorial, en el reconocimiento de individuos y su estatus social, en asociaciones simbióticas, etc.

La capacidad de los organismos de detectar estos estímulos externos está dada por la presencia de sistemas quimiosensoriales. Estos sistemas pueden ser tan simples como *clusters* de receptores de membrana empleados en la quimiodetección en bacterias (Maddock y Shapiro, 1993) hasta organizaciones más complejas como los sistemas olfatorio y gustativo de vertebrados. En esta tesis en particular nos dedicaremos a los sistemas quimiosensoriales nasales u olfatorios.

En la mayoría de los tetrápodos existen dos sistemas quimiosensoriales nasales: el sistema olfatorio principal, al cual nos referiremos simplemente como sistema olfatorio (SO) y el sistema olfatorio accesorio o vomeronasal, al cual nos referiremos como sistema vomeronasal (SVN). Ambos sistemas sensoriales están definidos anatómicamente (Eisthen, 1997). El SO está formado por un epitelio olfatorio (EO) ubicado en la cavidad nasal que contiene a las neuronas receptoras olfatorias (NRO). Las NRO son bipolares; sus axones proyectan al telencéfalo anterior donde establecen conexiones sinápticas en el bulbo olfatorio principal (BOP), mientras que su proceso dendrítico se extiende hacia la luz del EO donde entran en contacto con el medio externo (cavidad nasal). Por su parte, el SVN se identifica morfológicamente por la presencia de un órgano vomeronasal (OVN) que contiene a las neuronas receptoras vomeronasales (NRV) y se ubica generalmente entre la cavidad nasal y la cavidad oral o en un divertículo de la cavidad nasal. Las NRV también son bipolares, sus axones se proyectan hacia el bulbo olfatorio accesorio (BOA), una estructura histológicamente distinguible del BOP en el telencéfalo anterior, mientras que su proceso dendrítico se extiende hacia la luz del OVN. Esta organización anatómica es general para todos los tetrápodos en donde ambos sistemas sensoriales están presentes (Figura 1).



**Figura 1:** Organización morfológica del sistema olfatorio y vomeronasal en anfibios (A), reptiles (B) y mamíferos (C). AOB, bulbo olfatorio accesorio; MOB, bulbo olfatorio principal; OE, epitelio olfatorio; VNO, órgano vomeronasal. Modificado de Baxi et al. 2006.

Al menos desde el punto de vista anatómico, las estructuras características del SVN (*i.e.* un OVN distinguible en la cavidad nasal y un BOA en el telencéfalo anterior) no han sido identificadas en peces. Además, a lo largo de la filogenia el SVN se ha perdido secundariamente de manera independiente en varios grupos de tetrápodos como los cocodrilos, las aves, la mayoría de los murciélagos, algunos mamíferos acuáticos como cetáceos y manatíes, y los monos del viejo mundo (Bertmar, 1981; Eisthen, 1992; Bhatnagar y Meisami, 1998; Halpern y Martinez-Marcos, 2003).



## Diferencias y algunas semejanzas entre el SO y el SVN

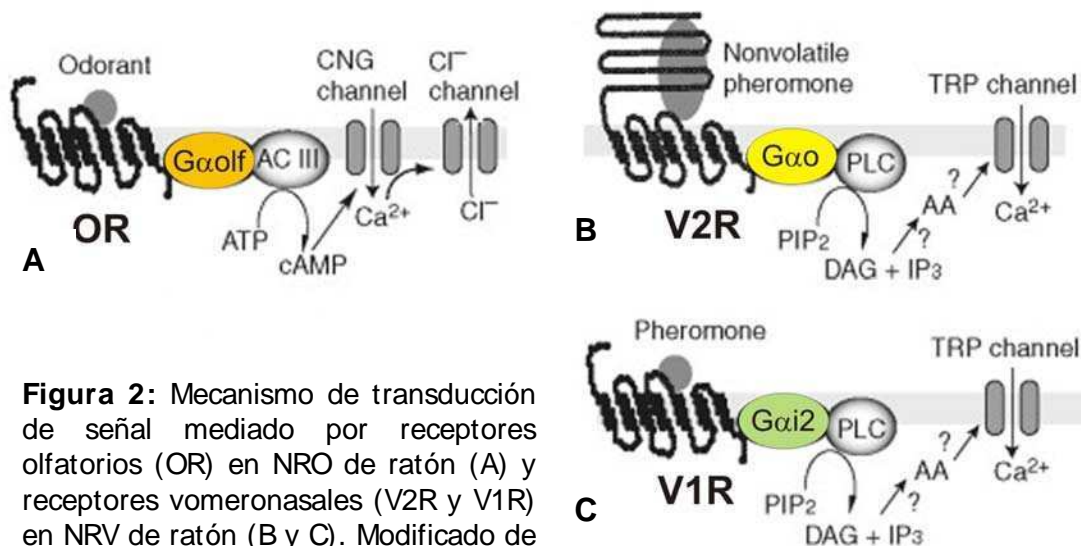
La organización histológica de los epitelios sensoriales del SO y el SVN son bastante similares. Tanto el EO como el OVN son epitelios pseudoestratificados con tres tipos celulares básicos: 1) las células progenitoras, ubicadas generalmente en la zona basal del epitelio sensorial; 2) las células de sostén o sustentaculares, cuyos núcleos y gran parte del citoplasma se ubican en la porción más apical del epitelio; y 3) las neuronas sensoriales, cuyos somas celulares se ubican en la porción media del epitelio sensorial y son las responsables de generar la señal eléctrica luego de la interacción con estímulos químicos específicos. Otra semejanza entre ambos sistemas sensoriales se encuentra a nivel de los bulbos olfatorios. Los axones de las neuronas sensoriales (tanto olfatorias como vomeronasales) establecen su primer contacto sináptico en el sistema nervioso central con dendritas de neuronas telencefálicas (células mitrales). Este contacto axo-dendrítico forma estructuras esféricas de neuropilo denso llamadas glomérulos, los que aparentemente tienen un papel fundamental en la decodificación de la información olfatoria (Chen y Shepherd, 2005). La presencia de estas estructuras glomerulares en los sistemas quimiosensoriales es una característica muy conservada en la filogenia y esta presente incluso en invertebrados (Eisthen, 2002).

Más allá de estas características generales compartidas por el SO y el SVN, ambos sistemas sensoriales poseen marcadas diferencias morfológicas, fisiológicas y moleculares:

***Morfología de las neuronas sensoriales:*** Aunque en ambos casos se observan neuronas bipolares, las NRV presentan microvellosidades en el extremo apical de su proceso dendrítico, mientras que las NRO de la gran mayoría de los tetrápodos son ciliadas (Eisthen, 1997).

***Receptores de membrana y vías de señalización:*** El reconocimiento de estímulos específicos por parte de las NRO y las NRV está dado por la

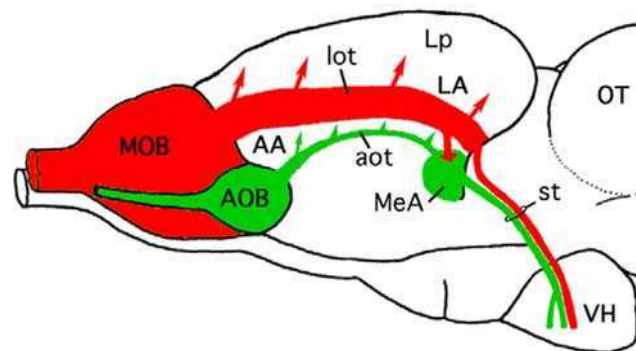
presencia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas (Figura 2). En mamíferos, las NRO expresan la familia de receptores olfatorios OR (por “*olfactory receptors*”) acoplados a la vía de señalización de Golf (una proteína G característica del SO) (Buck y Axel, 1991). Por otra parte, en el OVN de mamíferos se puede encontrar dos poblaciones de NRV; estas dos subpoblaciones neuronales expresan las familias de receptores vomeronasales V1R y V2R, los cuales están acoplados a diferentes vías de señalización mediadas por Gai2 y Gao, respectivamente (Dulac y Axel, 1995; Matsunami y Buck, 1997; Ryba y Tirindelli, 1997). En el OVN de anuros se ha encontrado solo la población de NRV que expresan receptores de la familia V2R-Gao (Hagino-Yamagishi *et al.*, 2004). El bajo grado de similitud en las secuencias de los genes que codifican para los receptores OR, V1R y V2R, sugiere que éstos aparecieron en forma independiente dentro de la gran familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G y que participan del reconocimiento de tipos diferentes de estímulos (Dulac y Axel, 1995; Ryba y Tirindelli, 1997).



**Figura 2:** Mecanismo de transducción de señal mediado por receptores olfatorios (OR) en NRO de ratón (A) y receptores vomeronasales (V2R y V1R) en NRV de ratón (B y C). Modificado de (Touhara, 2007)

**Proyecciones axónicas:** Los axones de las NRO y las NRV proyectan al bulbo olfatorio principal y accesorio, respectivamente. Las proyecciones de las neuronas telencefálicas (en el BOP y BOA) también mantienen vías separadas hacia zonas cerebrales de mayor integración. Las neuronas del BOP proyectan hacia la amígdala lateral (LA), mientras que las del BOA lo hacen hacia la amígdala media (MeA), a su vez, ambas zonas del complejo de la amígdala (LA y MeA) proyectan masivamente hacia el hipotálamo (Moreno *et al.*, 2005)(Figura 3). Resulta interesante que estas proyecciones separadas hacia zonas diferentes del complejo de la amígdala en la región caudal del telencéfalo, el cual sería un núcleo de integración multisensorial, se observan tanto en anfibios como en reptiles y mamíferos (Scalia y Winans, 1975; Scalia *et al.*, 1991; Moreno y Gonzalez, 2006; Moreno y Gonzalez, 2007).

La presencia consistente de proyecciones separadas en los tres grupos de tetrápodos, así como las diferencias moleculares presentes en ambos sistemas sensoriales, sugieren que éstos tienen diferentes funciones en la fisiología y el comportamiento de los animales (Halpern y Martinez-Marcos, 2003).



**Figura 3:** Vista lateral del cerebro de un anuro adulto (anterior a la izquierda) mostrando las proyecciones del BOP (MOB) y BOA (AOB) hacia la amígdala lateral (LA) y media (MeA), respectivamente, y la subsecuente conexión con el hipotálamo ventral (VH). Modificado de Moreno *et al.*, 2005.

## **Sobre la aparición de un sistema dual de quimiodetección en la evolución de vertebrados. ¿La tierra o el agua?**

Hace unos 400 millones de años durante el período Devónico ocurrió uno de los eventos mas significativos en la evolución de los vertebrados: la “conquista” del medio terrestre por parte de un linaje ancestral que derivaría, de manera independiente, en los tetrápodos actuales (Long y Gordon, 2004). Esta transición a la tierra, según la reconstrucción que realizó Bertmar (1981) de la historia evolutiva del SO y SVN en vertebrados, fue el factor ecológico mas importante que dio lugar a la aparición de un sistema olfatorio accesorio. Bertmar llegó a esta conclusión a partir de varias líneas de evidencias: Primero, su revisión del registro fósil lo llevó a la conclusión de que un divertículo vomeronasal prospectivo en la cavidad nasal apareció por primera vez en los animales que él consideraba como los ancestros de los tetrápodos actuales. Segundo, el SVN esta ausente en peces y se ha perdido en tetrápodos que son secundariamente acuáticos o de hábitos arbóreos, como los cocodrilos y las aves. Como la mayor diferencia ecológica entre los tetrápodos y otros vertebrados es que los tetrápodos son terrestres, y como además el SVN se perdió secundariamente en tetrápodos no terrestres, Bertmar llegó a la conclusión de que este sistema sensorial apareció como una consecuencia de la adaptación a este nuevo ambiente en los vertebrados (Bertmar, 1981).

Sin embargo, las evidencias surgidas en los últimos años desafían esta hipótesis y sugieren que el SVN apareció en los ambientes acuáticos, tempranamente durante la evolución de los vertebrados (Grus y Zhang, 2006; Grus y Zhang, 2009; Gonzalez *et al.*, 2011).

Un dato interesante puede obtenerse de los estudios realizados en los sistemas quimiosensoriales de anfibios. El SVN esta presente en los tres órdenes de anfibios actuales: Anuros (ranas y sapos), Urodelos (salamandras y tritones) y Apodos (cecilidos) (Reiss y Eisthen, 2008). Algunas características de

los sistemas quimiosensoriales descriptas ya hace tiempo en anfibios parecen argumentar a favor de una posible funcionalidad del SVN en ambientes acuáticos. Por ejemplo: En urodelos, se ha identificado un SVN desarrollado en representantes de las familias Amphiumidae y Sirenidae que son permanentemente acuáticos (Eisthen, 2000). En cecilidos, un estudio donde se compara la región nasal en representantes de seis familias mostró que el OVN se encuentra mas desarrollado (presenta un mayor tamaño) en especies acuáticas (Schmidt y Wake, 1990). En anuros, por su parte, el SVN también esta presente en especies completamente acuáticas de la familia Pipidae (Paterson y Hindle, 1951). Incluso, se ha especulado que el OVN participaría en la detección de estímulos en el agua en ranas de hábitos semi-acuáticos del género *Pelophylax* (Døving *et al.*, 1993).

Por otra parte, respecto de la ancestría de este sistema sensorial, la presencia de un SVN en la mayoría de los tetrápodos actuales indica que éste estaba presente en el ancestro común del grupo; el cual, muy probablemente fue acuático ya que las evidencias paleontológicas indican que los linajes de anfibios y amniotas “conquistaron” el medio terrestre de manera independiente (Clack, 2002).

En este sentido, quizá una de las evidencias mas importantes que sustenta esta nueva interpretación de la aparición del SVN en la evolución de vertebrados sea la aportada recientemente por Gonzalez *et al.* (2011). Estos investigadores han identificado un SVN presuntivo en el pez pulmonado Africano *Protopterus dolloi* (Gonzalez *et al.*, 2011). Los peces pulmonados o dipnoos son un grupo monofilético de peces óseos que ocupan un nicho evolutivo interesante ya que divergieron del linaje de los vertebrados después de la separación de los otros linajes de peces y son el grupo viviente mas cercanamente emparentados a los tetrápodos (Brinkmann *et al.*, 2004). En *P. dolloi*, se han encontrado criptas epiteliales en la base de las lamelas del EO cuyas neuronas sensoriales expresan marcadores moleculares descriptos en las NRV de tetrápodos. Claramente esta organización anatómica de criptas

epiteliales difiere marcadamente de un OVN discreto como se observa generalmente en tetrápodos. Sin embargo, a través del marcado de trazos neuronales se vio que las neuronas de todas estas criptas proyectan sus axones al margen lateral del bulbo olfatorio (BOA presuntivo) y desde allí hacia áreas cerebrales homólogas a las que intervienen en el procesamiento de la información del SVN en tetrápodos (Moreno y Gonzalez, 2007).

Además, mediante análisis genómicos comparados se han identificado genes específicos vomeronasales (los receptores V1R y V2R, así como el canal de membrana TRPC2) en peces óseos, elasmobranquios y lampreas (Grus y Zhang, 2006; Grus y Zhang, 2009), sugiriendo que al menos los componentes moleculares del SVN aparecieron tempranamente en la filogenia de los vertebrados. En este sentido, los datos de estudios recientes sugieren que el EO de los peces es probablemente un híbrido entre el EO y OVN de los tetrápodos: neuronas receptoras con distinta morfología expresan receptores olfatorios y vomeronasales con sus vías de señalización características y proyectan a diferentes regiones del bulbo olfatorio (Hansen *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005). Aunque la homología entre estas subpoblaciones neuronales de peces y las NRO y NRV de tetrápodos debe ser aún comprobada, el escenario evolutivo más probable es que el SVN haya aparecido como una segregación de diferentes clases de NRO preexistentes en peces. La cuestión entonces es: ¿Por qué se dio esta segregación de diferentes poblaciones neuronales en tetrápodos dando lugar a un sistema dual de quimiodetección?

Todos los hallazgos anteriormente mencionados indican que el SVN podría jugar un papel importante en la quimiodetección en los ambientes acuáticos, sin embargo esta hipótesis ha sido prácticamente inexplorada en todos los grupos de tetrápodos.

## Sobre la funcionalidad del SVN y el SO

Aunque es común leer que el SVN es un sistema sensorial especializado en la detección de feromonas y que el SO detecta olores “comunes” (Belluscio *et al.*, 1999; Buck, 2000; Dulac, 2000), esta hipótesis es simplista y no está sustentada, en realidad, por los datos fisiológicos y comportamentales disponibles en los diferentes grupos de tetrápodos (Baxi *et al.*, 2006). Las feromonas son señales químicas, liberadas por un individuo, que evocan respuestas fisiológicas y comportamentales específicas en otros individuos de su misma especie (Karlson y Luscher, 1959). Dado que estos estímulos permanecen invariantes a lo largo de las generaciones y que resultan muy importantes para la supervivencia y el éxito reproductivo de una especie, es razonable pensar que pueda existir un sistema sensorial especializado en su detección. Si el SVN fuese realmente un sistema sensorial especializado en la detección de feromonas, entonces tendría que esperarse que: 1) todas las señales feromonales sean detectadas y procesadas solamente por el SVN, y 2) que el SVN no participe de la detección de otro tipo de estímulos. En realidad, los datos experimentales disponibles contradicen ambos puntos mencionados.

Claramente el SVN participa en la detección de feromonas sexuales en mamíferos (Keverne, 2004), reptiles (Shine, 2003) y anfibios urodelos (Toyoda y Kikuyama, 2000; Wirsig-Wiechmann *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado en mamíferos que algunas feromonas son detectadas por el SO (Dorries *et al.*, 1997; Swann *et al.*, 2001; Schaal *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005). Además, una cantidad considerable de estudios indica que el SVN participa en la detección de una variedad de estímulos en los diferentes grupos de tetrápodos (Halpern y Martínez-Marcos, 2003; Baxi *et al.*, 2006; Shepherd, 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que el SVN es fundamental para la detección de estímulos relacionados con la localización de presas en reptiles (Graves y Halpern, 1990; Alving y Kardong, 1996) y anfibios urodelos (Placyk y

Graves, 2002); mientras que en mamíferos el SVN modifica la preferencia por el alimento (Halpern et al., 2005) y modula respuestas defensivas desencadenadas por la detección de señales de alarma interespecíficas (Papes et al., 2010).

Una hipótesis alternativa propone que el SVN participa en la detección de moléculas de baja volatilidad, mientras que el SO mediaría la detección de moléculas con mayor volatilidad (Baxi et al., 2006). En experimentos con conejillos de indias (*Cavia porcellus*) se ha demostrado que si los animales acceden libremente a restos de orina de coespecíficos a la cual se ha agregado un colorante fluorescente no volátil, este colorante se transfiere al OVN pero no al EO (Wysocki et al., 1980).

Algunas de las feromonas que han sido identificadas y aisladas en mamíferos y anfibios son moléculas grandes de alto peso molecular (Kikuyama y Toyoda, 1999; Wabnitz et al., 1999), esto explicaría en parte por que el SVN media la detección de feromonas. Además, las feromonas de bajo peso molecular como la androstenona son detectadas por el SO en mamíferos (Hudson y Distel, 1986; Schaal et al., 2003), lo cual también es consistente con la hipótesis de la volatilidad. Sin embargo, la presencia de SVN en anfibios y reptiles acuáticos pareciera contradecir esta hipótesis ya que la volatilidad es irrelevante en el agua. Esta contradicción puede ser resuelta si pensamos que en realidad lo importante no es la volatilidad de los estímulos sino su peso molecular, el cual es relevante tanto en el aire como en el agua. Entonces, quizás el SVN media la detección de moléculas de alto peso molecular mientras que el SO detecta compuestos de bajo peso molecular. De todas maneras esta hipótesis no puede ser aún aceptada o rechazada debido a la escasa cantidad de datos disponibles, sobre todo datos comparados en distintos grupos de tetrápodos (Baxi et al., 2006).

Es evidente que varias controversias existen respecto a la funcionalidad del SO y SVN en tetrápodos. Seguramente las controversias respecto del propio



origen de estos sistemas sensoriales, cuya evolución esta comenzando a ser un poco mejor comprendida en los últimos años, sean en parte responsables de esta situación. Claramente, ambos sistemas sensoriales presentan marcadas diferencias a nivel molecular, fisiológico, morfológico, etc. Sin embargo, los intentos por adjudicarles funciones específicas han resultado por lo general frustrantes. A pesar de esto, algunos puntos comienzan a estar un poco más claros en la actualidad: 1) La presencia de un sistema dual de quimiodetección, formado por un SO y SVN, parece haber aparecido en ambientes acuáticos durante la evolución de los vertebrados, y 2) El SVN no es un sistema sensorial especializado en la detección de feromonas.

### **El modelo de estudio: los renacuajos**

Entre los tetrápodos, los anfibios son únicos al presentar una etapa larval acuática seguida de un adulto de hábitos terrestres. La presencia de ciclos de vida complejos, con etapas larvales de vida libre, es considerada una condición ancestral en los tres grupos de anfibios vivientes, y seguramente sea una característica heredada del ancestro común del grupo (Hanken, 1999).

De los tres órdenes de anfibios, las larvas de anuros, también conocidas como renacuajos, son las que presentan mayores diferencias respecto al fenotipo del adulto. Esto seguramente obedezca a que renacuajos y adultos habitan nichos ecológicos muy diferentes y por lo tanto están sujetos a distintas presiones de selección (Wells, 2007). Los renacuajos están bien adaptados para la locomoción en el agua: presentan un cuerpo redondeado y una larga cola con una aleta aplanada lateralmente (Altig y McDiarmid, 1999). Aún cuando los renacuajos de casi todas las especies presentan esta organización general, la diversidad respecto a forma y proporciones corporales es considerablemente grande y por lo general se correlaciona con las características ecológicas de los

cuerpos de agua que habitan (lénticos, lóticos, etc.) y/o con sus hábitos alimenticios (raspadores, filtradores, carnívoros, etc.) (McDiarmid y Altig, 1999).

Las distintas etapas del desarrollo larval y la metamorfosis de anfibios son en general clasificadas en tablas en base a caracteres morfológicos (Gosner, 1960). Estas tablas de clasificación permiten fijar eventos del desarrollo (estadios) según la secuencia de aparición de estos caracteres durante la ontogenia. La tabla desarrollada por Gosner (1960) es la más utilizada en la actualidad para clasificar renacuajos exotróficos<sup>1</sup> y, salvo que se indique lo contrario, es la que hemos empleado para clasificar los animales utilizados en esta tesis. En el apéndice I se muestra una versión modificada de la tabla de clasificación de Gosner (1960).

La etapa larval comienza luego de que los embriones han internalizado las branquias externas y desarrollado las partes de la boca que les permite alimentarse por si solos, y termina con la completa reabsorción de la cola. Esta es una etapa efímera no reproductiva en anuros, no existen casos registrados de neotenia como si sucede en urodelos, y su duración es muy variable habiendo especies que pasan hasta un año (o más) como larvas antes de completar la metamorfosis (McDiarmid y Altig, 1999).

En este punto es necesario hacer una aclaración importante. Tal como considerara R.M. Savage, un pionero en la investigación con larvas de anuros, nosotros no interpretamos a los renacuajos simplemente como “animales que están en proceso de convertirse en otra cosa”, sino como animales cuya vida, aunque corta comparada con el adulto, es vivida en un plano completamente diferente en el cual los individuos deben enfrentar sus propios desafíos (Savage, 1961). Esta visión respecto de los renacuajos como modelo biológico creemos que es particularmente atinada en lo que se refiere a los sistemas

---

<sup>1</sup> Los renacuajos exotróficos son larvas de anuros de vida libre que se alimentan por si mismos y representan la condición mas general para las larvas de anuros. Hacemos esta aclaración ya que también existen algunas especies de desarrollo directo (que no presentan etapa larval) y especies con desarrollo larval endotrófico (animales de vida libre pero que no se alimentan por si mismos). Todas las especies utilizadas en esta tesis presentan renacuajos exotróficos.

sensoriales. Al ser animales de vida libre, los renacuajos afrontan varios retos durante su existencia: deben localizar fuentes de alimento, lidiar con la competencia intra- e interespecífica, seleccionar el microhábitat más favorable, evitar los predadores, etc. Precisamente, sus órganos sensoriales deben permitir la detección de estímulos externos específicos y la integración de la información proveniente de estos estímulos debe generar respuestas con valor adaptativo de forma tal de maximizar la supervivencia de los individuos.

En este sentido, y dadas las controversias respecto a la funcionalidad de los sistemas quimiosensoriales en tetrápodos y la posible aparición de un sistema dual de quimiodetección en ambientes acuáticos, creemos que los renacuajos constituyen un modelo de estudio muy interesante para investigar aspectos anatómicos, bioquímicos y funcionales de los sistemas quimiosensoriales en ambientes acuáticos.

## HI PÓTESIS Y OBJETIVOS

En el presente trabajo se propone estudiar la morfología y funcionalidad de los órganos nasales quimiosensoriales durante etapas larvales de anfibios anuros, utilizando abordajes anatómicos comparados, bioquímicos, experimentales y comportamentales.

**Hipótesis general: Las larvas de anuros poseen un sistema “dual” de quimiodetección formado por un sistema olfatorio y un sistema vomeronasal, cada uno de los cuales participa en la detección de estímulos específicos.**

A partir de los estudios realizados en esta temática se pretende conocer, no sólo aspectos relacionados con la comunicación química de los anfibios y sus interacciones sociales, sino también dilucidar aspectos o mecanismos generales de la quimiodetección en vertebrados, qué tipo de estímulos son detectados por el EO y el OVN, como interaccionan estos dos sistemas sensoriales, y qué consecuencias tiene la detección de tales estímulos sobre la fisiología y el comportamiento de los animales.

Para poner a prueba la hipótesis general nos propusimos los siguientes objetivos:

- ✓ Evaluar la presencia de un sistema “dual” de quimiodetección (olfatorio y vomeronasal) en renacuajos
- ✓ Evaluar el estado de maduración de estos sistemas sensoriales durante la etapa larval
- ✓ Evaluar la participación del sistema olfatorio y vomeronasal en la detección de estímulos en el ambiente

Estos objetivos generales serán abordados en diferentes capítulos de esta tesis, en cada uno de los cuales se detallaran objetivos específicos planteados para responder preguntas concretas.

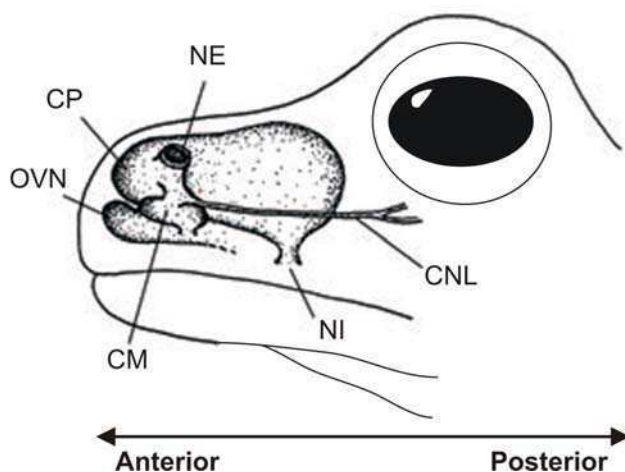
# **CAPITULO I**

**Aspectos morfológicos e histológicos del sistema olfatorio  
y vomeronasal en renacuajos**

## INTRODUCCIÓN

La morfología de los órganos nasales quimiosensoriales en anfibios anuros adultos ha sido bastante estudiada por diferentes autores. Existe una serie de revisiones en la temática que detallan muy bien aspectos comparados de los órganos olfatorios en adultos, fundamentalmente de aquellas características con interés taxonómico (Helling, 1938; Paterson y Hindle, 1951; Jurgens, 1971). En comparación con las cavidades nasales de otros vertebrados, que suelen presentar pliegues en sus paredes internas aumentando la superficie de contacto, la cavidad nasal en anuros es relativamente simple. Esta condición se verifica aparentemente durante las etapas larvales.

En etapas post metamórficas, los órganos olfatorios de los anuros se organizan básicamente en tres cámaras interconectadas (Figura 1.1): la cámara principal (superior), que es alargada en el eje anteroposterior, contiene al epitelio olfatorio principal y es la cámara que se comunica con el medio externo y la cavidad de la boca a través de la narina externa e interna (coana), respectivamente; la cámara media, que es aplanada dorsoventralmente, generalmente no sensorial y en la cual desemboca el conducto nasolacrimal; y finalmente la cámara inferior que también es aplanada dorsoventralmente y en cuyo receso medial se encuentra el OVN.



**Figura 1.1:** Esquemización de las cavidades nasales en anuros adultos (solo lado izquierdo), basada en la especie *Trachycephalus resinifictrix*. CP: cámara principal, CM: cámara media, CNL: conducto nasolacrimal, NE: narina externa, NI: narina interna, OVN: órgano vomeronasal. Modificado de Nowack y Wöhrmann-Repenning (2010).

Por el contrario, la morfología de los órganos olfatorios en renacuajos es bastante menos conocida. Las descripciones se limitan a especies puntuales y son sorprendentemente escasas, con una separación de décadas entre los diferentes trabajos (Hinsberg, 1901; Rowedder, 1937; Yvroud, 1966; Khalil, 1978; Jermakowicz *et al.*, 2004). La región nasal en renacuajos esta representada por una cámara principal, la cual corre casi verticalmente desde la narina externa hasta la coana. De esta cámara principal se desprenden una serie de pequeños apéndices: el apéndice anterior esta revestido por el epitelio sensorial de OVN, mientras que el apéndice lateral esta revestido de un epitelio cuyas células presentan características de células secretoras.

## OBJETIVOS

En este primer capítulo se abordan aspectos morfológicos e histológicos de los órganos olfatorios en renacuajos. Cabe aclarar que el interés de este trabajo no es realizar un análisis exhaustivo en diferentes especies tratando de obtener caracteres morfológicos con relevancia taxonómica. Por el contrario, el objetivo fundamental en este capítulo radica en extraer, mediante el análisis comparado de varias especies, características generales de estos órganos sensoriales en renacuajos.

Aún así, como una parte importante de los experimentos de esta tesis se realizaron utilizando como modelo larvas del sapo común *Rhinella arenarum*<sup>1</sup> se ha dedicado una sección completa de este capítulo para conocer y describir detalladamente los órganos olfatorios en esta especie durante la ontogenia.

Para este capítulo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Analizar el desarrollo larval y la metamorfosis de los órganos olfatorios en *R. arenarum*
- ✓ Analizar la ultraestructura de los órganos olfatorios en larvas de *R. arenarum*
- ✓ Evaluar la presencia y el grado de desarrollo del sistema olfatorio y vomeronasal en renacuajos de diferentes especies de anuros.
- ✓ Medir el volumen total y relativo de los distintos órganos olfatorios durante el desarrollo larval y la metamorfosis de *Hypsiboas pulchellus*, *R. arenarum* y *Xenopus laevis*.

---

<sup>1</sup> Las razones que motivaron la utilización de esta especie responden fundamentalmente a cuestiones de tipo práctico-metodológicas. Como su nombre lo indica, el sapo común *R. arenarum* presenta una amplia abundancia y distribución en nuestro país lo cual permite obtener ejemplares adultos fácilmente. Además, las técnicas de cría y fecundación in vitro de esta especie son empleadas en el laboratorio desde hace muchos años; esto permite disponer de renacuajos para experimentación durante todo el año.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Animales.*

Las parejas reproductoras de *Hypsiboas pulchellus*, *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae* fueron colectadas en ambientes naturales de distintas localidades en las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires. Es importante resaltar que ninguna de estas especies se encuentra en peligro de extinción, y están catalogadas como de “preocupación menor” por la *International Union for the Conservation of Nature* (IUCN 2011), de modo que su utilización no genera conflictos en cuanto a la conservación de la biodiversidad.

Los embriones de *R. arenarum* y *R. fernandezae* fueron obtenidos por fecundación in vitro según metodologías estandarizadas (Casco *et al.*, 1992). En el caso de *Xenopus laevis*, las parejas de adultos (criadas en cautiverio en nuestro laboratorio) fueron inducidas hormonalmente, inyectando gonadotrofina coriónica humana (hCG) en los sacos linfáticos dorsales (hembras: 500-800 UI, machos: 50 UI). Luego de la inyección las parejas se colocaron en estanques individuales para dejar que se produzca el amplexo y fecundación de manera natural durante la noche. En el caso de *H. pulchellus*, los adultos fueron recolectados durante la noche en temporada reproductiva y trasladados al laboratorio. Allí fueron mantenidos en terrarios con cuerpos de agua artificiales en condiciones controladas (fotoperíodo 14:10hs luz-oscuridad y temperatura 26°C), tratando de mantener las condiciones naturales. El amplexo entre parejas se produjo espontáneamente en el laboratorio durante las noches sucesivas a la captura. Los renacuajos de *Lithobates catesbeianus* fueron obtenidos de un proveedor local, mientras que los ejemplares de las demás especies analizadas fueron obtenidos de la colección de Herpetología del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (ver Tabla 1.1 y Apéndice II para datos de colección).

**Tabla 1.1. Especímenes analizados de la colección de Herpetología del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”**

Espece	Familia	Estadio del desarrollo usado
<i>Scinax acuminatus</i>	Hylidae	37
<i>Hypsiboas curupi</i>	Hylidae	29-30
<i>Phyllomedusa azurea</i>	Hylidae	36-37
<i>Limnomedusa macroglossa</i>	Cycloramphidae	38
<i>Dermatonotus muelleri</i>	Microhylidae	28-30
<i>Crossodactylus schmidtii</i>	Hylodidae	36-38
<i>Physalaemus sp.</i>	Leiuperidae	39
<i>Lepidobatrachus llanensis</i>	Ceratophryidae	36-37
<i>Leptodactylus latrans</i>	Leptodactylidae	26 y 37-38

El estadio de desarrollo de todos los animales se clasificó según Gosner (1960), excepto para *X. laevis* que se utilizó una tabla específica para esa especie (Nieuwkoop y Faber, 1994). Los renacuajos se mantuvieron en agua declorada, con fotoperíodo y temperatura constante (12:12hs., luz:oscuridad;  $21 \pm 2$  °C), y alimentados *ad limitum*. Los juveniles recién metamorfoseados fueron alimentados con grillos vivos y mantenidos en terrarios húmedos hasta su utilización. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los principios de cuidado de animales de laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (Res. CD: 140/00)

### ***Histología.***

Los animales fueron anestesiados por inmersión en 0,1% de triclaína metanosulfonato<sup>2</sup>, decapitados, y la cabeza fijada en solución de Bouin<sup>3</sup> durante 1 h a temperatura ambiente seguido de 24 hs a 4°C. Luego, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se aclaró en xileno y se embebieron en Histoplast<sup>4</sup>. Se realizaron cortes seriados de toda la región nasal en los planos transversal, horizontal y sagital. Estos cortes se montaron en

<sup>2</sup> MS222; Sigma, St. Louis, MI, EE.UU.

<sup>3</sup> 70% solución saturada de ácido pícrico, 25% formol, 5% ácido acético

<sup>4</sup> Biopack, Buenos Aires, Argentina

portaobjetos HiFix optimizados para histología e inmunohistoquímica<sup>5</sup>. El plano de corte así como el espesor de los mismos varían en los distintos experimentos, por lo que estos datos se especifican en cada caso en el lugar correspondiente.

Para el análisis histológico, las secciones se desparafinaron en xileno, se rehidrataron a través de una serie de alcoholes decrecientes hasta llegar a agua destilada. Luego se colorearon con Hematoxilina-Eosina o violeta de cresilo y se montaron para análisis en microscopía óptica de campo claro. Para ello se utilizó un microscopio Leica Reichert Polyvar y se tomaron imágenes digitales con una cámara Sony Cybershot DSC P-200 acoplada.

### ***Cálculo de volumen de los órganos nasales quimiosensoriales.***

Se utilizaron larvas de *H. pulchellus*, *R. arenarum* y *X. laevis* en distintas etapas de desarrollo: larvas tempranas (G27, N/F49), intermedias (G31, N/F53), tardías (G39, N/F56) y juveniles 1-4 días post metamorfosis (G46, N/F66). A partir de los preparados histológicos, se midió el área de los distintos epitelios sensoriales en cada imagen digital capturada utilizando el software de análisis de imágenes Image Pro Plus 5.1<sup>6</sup>. Para calcular el volumen de cada órgano sensorial se realizó la sumatoria de las áreas medidas, cada una multiplicada por el espesor del corte histológico (10  $\mu\text{m}$  para larvas tempranas e intermedias, 15  $\mu\text{m}$  para larvas tardías y juveniles). También se midió la longitud boca-cloaca (longitud del cuerpo) de animales en los estadios utilizados.

### ***Histoquímica de lectinas.***

Con el fin de mejorar la visualización de las glándulas multicelulares, se realizó histoquímica de lectinas utilizando un conjunto de lectinas que han demostrado ser específicas para identificar las glándulas multicelulares nasales (Carmanchahi *et al.*, 2000). Las secciones de tejido, obtenidas como se describió anteriormente, se desparafinaron, rehidrataron y se lavaron en buffer

---

<sup>5</sup> HF-5001, InProt, TNT, Buenos Aires, Argentina

<sup>6</sup> Media Cybernetics, Silver Spring, MD

fosfato salino (PBS). Se realizó un bloqueo de unión a sitios inespecíficos incubando con leche descremada 5% durante 45 minutos. Luego se incubó con diferentes lectinas acopladas a biotina<sup>7</sup>, RCA (*Ricinus communis* Aglutinina) o WGA (*Triticum vulgare* aglutinina) durante toda la noche a 4°C. Los cortes fueron luego tratados con un complejo estreptavidina-Alexa Fluor 488<sup>8</sup> (1/200). Se realizó una coloración general de núcleos celulares con yoduro de propidio y se montó los preparados con glicerina-PBS (50/50, v/v). Las imágenes fueron capturadas por un microscopio láser confocal (Olympus FV-300 unido a un microscopio Olympus Bx-61).

### ***Microscopia electrónica de transmisión.***

La región nasal, conteniendo al EO y el OVN, fue disecada de ocho renacuajos en estadio G34-36 y fijada en glutaraldehído 2.5% en PBS 0.1M (pH 7.4) durante 24hs. a 4°C. Luego, las muestras fueron postfijadas en tetróxido de osmio 1% en PBS 0.1M, deshidratadas y embebidas en resina Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich). Se cortaron secciones ultrafinas (espesor 70-90 nm) utilizando un ultramicrotomo Reichert-Jung (Modelo Ultracut E). Se realizó una coloración de contraste de las secciones con citrato de plomo y se las observó y fotografió con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 10C.

### ***Análisis estadísticos.***

Los datos morfométricos fueron analizados mediante ANOVA univariado. Todos los datos reunieron los supuestos para el análisis paramétrico (normalidad y homogeneidad de varianzas) y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p fue menor a 0.05. El número de replicas o sujetos experimentales utilizados para cada experimento se detalla en los epígrafes de los gráficos correspondientes. En los gráficos se muestran las medias  $\pm$  error estándar. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat.

---

<sup>7</sup> Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.

<sup>8</sup> Molecular Probes, Eugene, O, EE.UU.

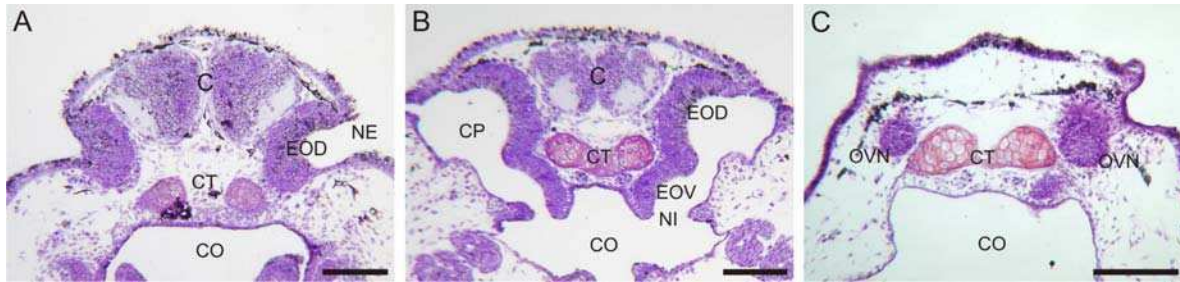
## RESULTADOS

### Desarrollo larval y metamorfosis del epitelio olfatorio, el órgano vomeronasal y las glándulas anexas en *Rhinella arenarum*

Un total de 100 animales, que abarcaron desde etapas pre-larvales (G23) hasta estadios de G46 y juveniles de 3 meses de edad postmetamorfosis (cuatro animales en cada estadio) se utilizaron en este estudio

#### *Período pre-larval o embrionario tardío*

**G23-25.** Durante esta etapa el placode olfatorio ya se ha invaginado completamente formando la cámara olfatoria principal (CP). El EO (derivado del placode olfatorio) se encuentra revistiendo la pared medial de la CP, estrechamente relacionado con el borde anterior del telencéfalo. Esta estrecha asociación con el cerebro indica que los procesos de axogénesis y diferenciación del EO continúan muy activos. En G23, las narinas externas se abren en la porción anterodorsolateral de la cabeza. El EO se extiende hacia adelante ubicándose entre el cerebro anterior y los cuernos trabeculares (CT), estrechamente relacionado a las narinas externas (Fig. 1.2 A). El OVN no ha desarrollado todavía. Hacia la región media, el EO se divide en dos ramas, una dorsolateral a los CT y de otra en posición ventrolateral a los CT (Fig. 1.2 B). Estas dos ramas del EO (dorsal: EOD, y ventral: EOv) corresponden al "saco superior" (*Hauptlumen* de Rowedder 1937, y *Supérieur Sac* de Yvroud 1966) y el "saco posterior inferior" (*Choanengang* de Rowedder 1937, y *Sac Choanal* de Yvroud 1966) descritos por otros autores para otras especies, respectivamente (Rowedder, 1937; Yvroud, 1966). La conexión entre la CP y la cavidad oral (coana) se produce hacia la región caudal de la CP en esta etapa. En G24-25, aparece el OVN como una pequeña evaginación ventral en el extremo anterior del EOD (Fig. 1.2 C). Hasta este período (G25), no se observan glándulas vomeronasales (GVN) asociadas al OVN en formación.



**Figura 1.2:** Cortes transversales (5µm) de la región nasal de *R. arenarum* en etapa embrionaria tardía. **A,B.** Región rostral y media de la cavidad nasal, respectivamente, en animales en estadio G23. El EO está dividido en dos ramas en la región nasal media, la rama dorsal (EOD) y ventral (EOV) (B). **C.** En G25 el OVN aparece como una pequeña evaginación del EO en la región nasal rostral, situado dorsolateralmente a los cuernos trabeculares (CT). C: cerebro, CO: cavidad oral, NE: narina externa, NI: narina interna. Barras 100µm.

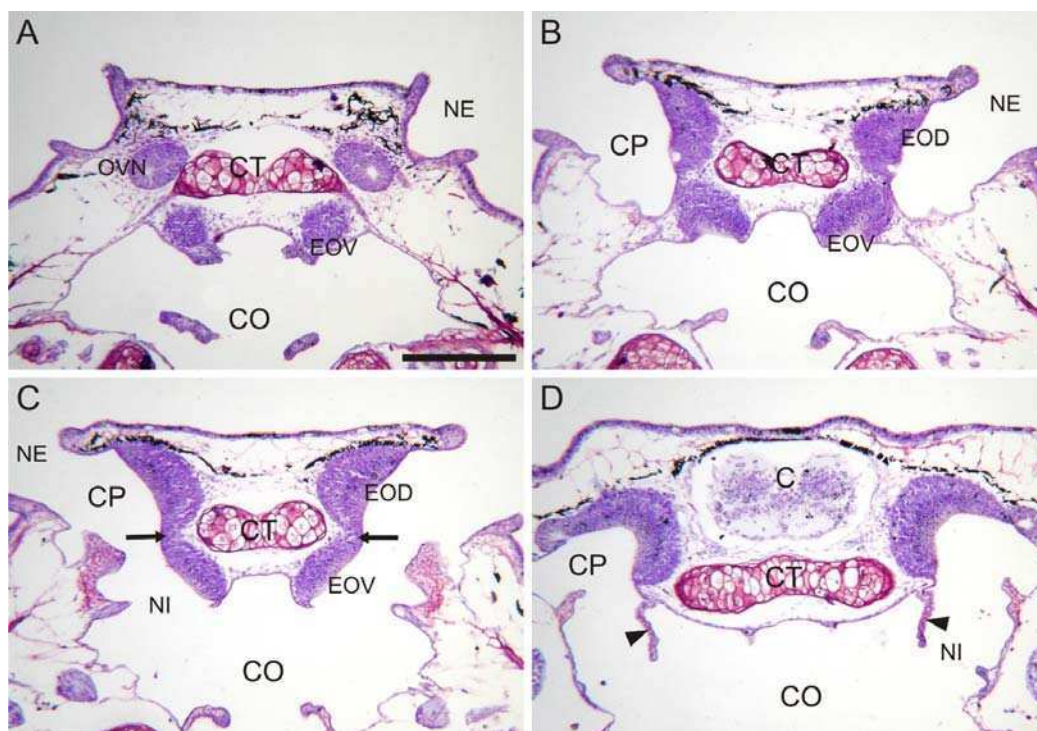
### **Período larval**

**G26-30.** La CP presenta una forma ovoide y se extiende a lo largo del eje longitudinal del condrocraqueo. El EO reviste la pared medial de la CP mientras que el lado lateral está revestido por un epitelio simple plano no sensorial (Fig. 1.3 B-D). El OVN se observa como una estructura de forma arriñonada localizada anteroventralmente a la CP, y dorsolateral a los CT (Fig. 1.3 A). En el extremo rostral de la región nasal, se observa la rama ventral del EO en contacto directo con la cavidad oral (Fig. 1.3 B). Las narinas externas se localizan más dorsalmente que en etapas pre-larvales, en la región anterior de la CP. En la zona media nasal el EO se divide en las ramas dorsal y ventral.

El EOd esta expuesto completamente a la CP, mas asociado a la narina externa, mientras que el EOV mantiene su asociación con cavidad oral. El EOD y EOV están separados por una porción muy delgada de epitelio no sensorial (Fig. 1.3 C). En la región media, las narinas externas, la CP y las coanas forman un canal de comunicación directo desde el medio exterior a la cavidad oral. Estas características se mantienen en todas las etapas de desarrollo de las larvas. Caudalmente, el EOD y el EOV se unen formando un epitelio continuo. El EO cubre también el techo de la CP y forma una estructura en forma de herradura a la región más caudal. En la región medial y lateral de la coana se

desarrollan dos delgados pliegues de tejido que forman una estructura tipo válvula entre la CP y la cavidad oral (Fig. 1.3 D). El pliegue medial se encuentra mucho mas desarrollado.

Alrededor de G28-29, se desarrollan los primeros acinos de las GVN en el tejido conectivo medial al OVN, y dorsal a los CT. Estos se desarrollan anteriores al EOD y dorsales al EO (Fig. 1.6 A).



**Figura 1.3:** Cortes transversales de *R. arenarum* en estadio G28 de las regiones rostral (A), mediorostral (B), media (C) y caudal (D) de la cavidad nasal. **A.** En la región nasal rostral, el OVN y la rama ventral del EO (EOV) aparecen dorsolaterales y ventrolaterales a los cuernos trabeculares (CT), respectivamente. **B.** En la región rostromedial, el EOD aparece en la pared medial de la cámara principal (CP), mientras que el EO (EOV) está expuesto a la cavidad oral (CO). **C.** En la región nasal media, tanto el EOD como el EO (EOV) revisten la pared medial de la CP y están separados por una pequeña porción de epitelio no sensorial (Flechas). **D.** En la región nasal caudal dos pliegues delgados de tejido forman una estructura tipo válvula en las coanas (cabezas de flecha). C: cerebro, NE: narina externa, NI: narina interna. Barra: 200  $\mu$ m

**G31-39.** A medida que la larva crece y se desarrolla, el EO y el OVN aumentan en tamaño. Las GVN crecen en el tejido conectivo que rodea el OVN, formando evidentes glándulas tubulares ramificadas (Fig. 1.6 B). A pesar del aumento de tamaño de la región nasal, las características morfológicas generales siguen siendo esencialmente las mismas. En G35-36, comienza a desarrollarse en la región caudal el tabique nasal cartilaginoso que separa la CP derecha e izquierda y en G37-38 comienza a desarrollarse la capsula olfatoria cartilaginosa que rodea a la CP.

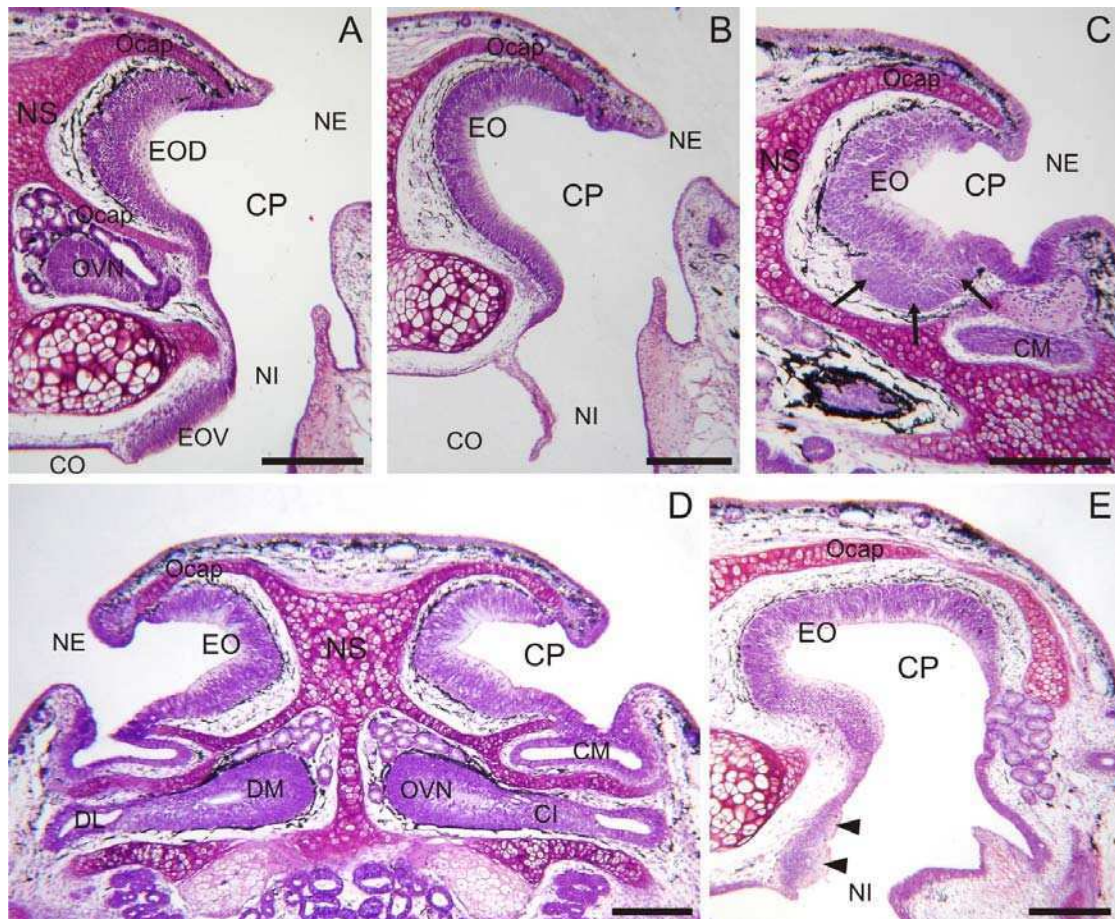
**G40-41.** En esta etapa pre-climax metamórfico ya comienzan a evidenciarse algunos cambios respecto a la organización general de los órganos quimiosensoriales descrita previamente. El EOD comienza a expandirse hacia rostral y el OVN sigue aumentando en tamaño, esto hace que el EOD, el OVN, y el EOY salgan en el mismo plano dorsoventral. El desarrollo de la cápsula nasal se hace mas evidente y separa al EOD del OVN (Fig. 1.4 A). En G41, la cámara media (CM) comienza a desarrollarse en el extremo rostral de la región nasal, situada dorsalmente al OVN, y anteroventral a la CP. La coana sigue en posición ventrolateral a la CP, y empieza a migrar caudalmente. Un primordio de lengua comienza a desarrollarse en el piso de la cavidad oral. En el EOD (pero no en el EOY) se evidencian vesículas mucosas intercaladas en el epitelio, correspondientes al desarrollo de las glándulas de Bowman (Fig. 1.4 B y 1.6 C).

### ***Clímax metamórfico***

**G42-45.** Las narinas externas cambian de posición y se sitúan en el lado lateral de la cabeza en G43. El EOD continúa expandiéndose rostralmente y ahora es la primera estructura sensorial que aparece en cortes transversales (Fig. 1.4 C). Durante las etapas intermedias del clímax metamórfico (G43-44) un nuevo epitelio sensorial se desarrolla en el piso de la CP en la región rostral, asociado espacialmente a la narina externa (Fig. 1.4 C). La CP y la CM aumentan de tamaño y se desarrollan los conductos nasolacrimales que desembocan lateralmente en la CM. Los cartílagos nasales están bien desarrollados y subdividen la región nasal. La cámara inferior (CI) se sitúa en la mitad anterior

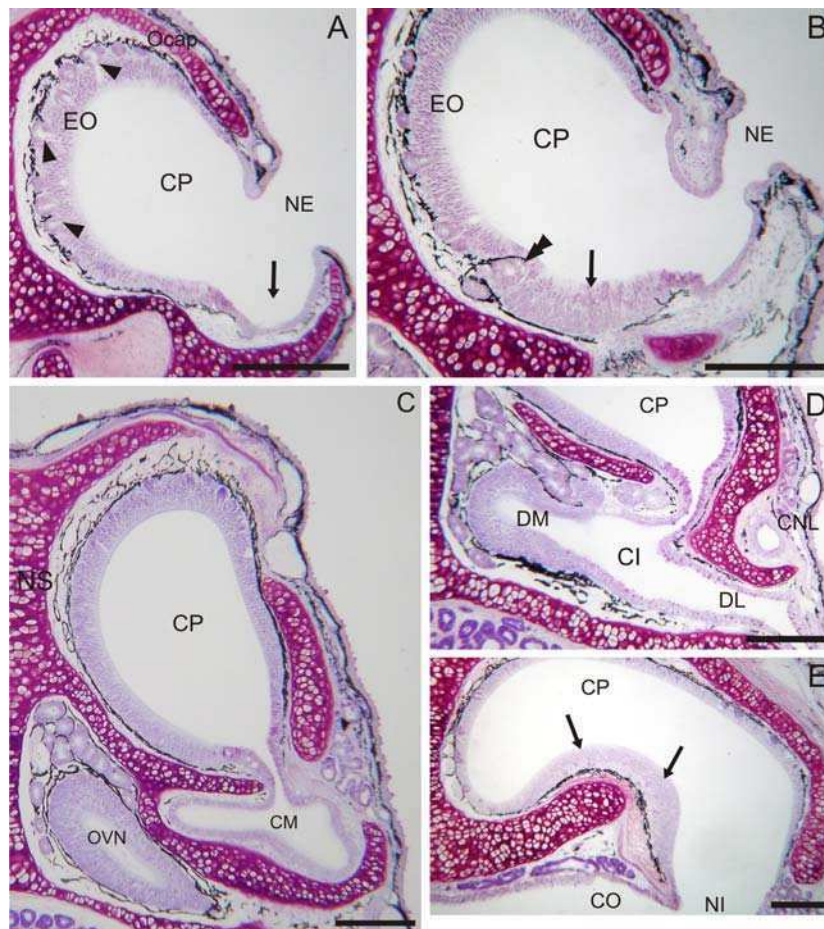


de la región nasal. Es aplanada dorsoventralmente con un divertículo medial donde se encuentra el OVN, y un divertículo lateral recubierto de un epitelio ciliado no sensorial (Fig. 1.4 D). El EOv queda en un plano mas caudal y degenera en G43-44 (Fig. 1.4 E).

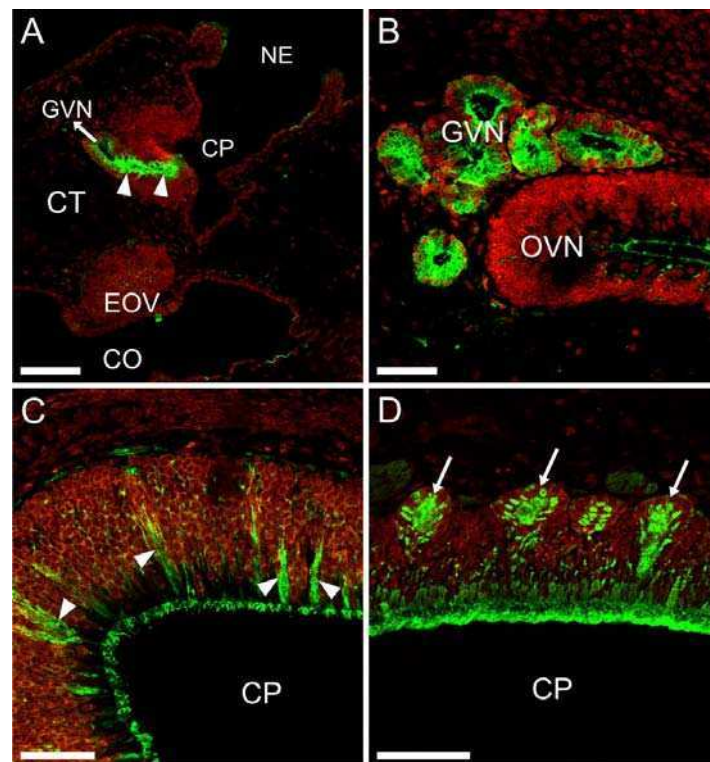


**Figura 1.4:** Cortes transversales de *R. arenarum* en *larvas* tardías (G41, A y B), y *larvas* en *clímax* metamórfico (G43, C-E). **A.** El EOD se expande rostralmente y aparece en el mismo plano de corte que el OVN y el EOv. **B.** Caudalmente, el EO reviste la pared medial de la CP. **C.** Un nuevo epitelio olfatorio se desarrolla en el piso de la CP en la región anterior cercano a la narina externa (NE; Flechas). **D.** Los cartílagos nasales están bien desarrollados y subdividen las tres cámaras olfatorias: la CP, la cámara media (CM) en desarrollo y la cámara inferior (CI) que contiene al OVN en su divertículo medial (DM) y un epitelio no sensorial en el divertículo lateral (DL). **E.** Caudalmente, el EOD reviste el lado ventromedial y el techo de la CP, la cual se conecta ventrolateralmente con la cavidad oral (CO). Una porción de EOv en degeneración puede observarse cerca de la narina interna (NI, cabezas de flecha). NS: septo nasal, Ocap: cápsula olfatoria. Barras: 200µm.

**G46-juveniles.** Al finalizar la metamorfosis tanto la cabeza como la región nasal se asemejan al fenotipo adulto. Las narinas externas están situadas en el lado lateral de la cabeza, abriendo al exterior en la región ateroventral de la CP. Un vestíbulo en forma de canal se desarrolla en el piso de la CP entre la narina externa y el EO que se encuentra levemente elevado revistiendo la pared medial y el techo de la CP (Fig. 1.5 A). Asimismo, esta estructura en forma de canal se conecta caudalmente con la CM y la CI. El nuevo epitelio sensorial, desarrollado en el piso de la CP durante el clímax metamórfico, aumenta de tamaño. Este epitelio formará, en etapas adultas, una estructura anatómica identificada como receso olfatorio (RO) en otros anuros (Helling, 1938). El RO está separado del EO por tejido conectivo y la desembocadura de la glándula oral interna (Fig. 1.5 B). Al igual que ocurre en el EO larval, no hay glándulas de Bowman intercaladas en el epitelio sensorial del RO, pero estas sí se vuelven abundantes en el EO de los juveniles (Fig. 1.5 y 1.6 D). En general, la anatomía de la región nasal en *R. arenarum* postmetamorfosis es similar a la descrita para otros anuros (Jurgens, 1971). Las tres cámaras nasales (principal, media e inferior) se encuentran interconectadas en la mitad anterior de la región nasal, mientras que en el extremo caudal la CP se conecta con la cavidad oral a través de la narina interna (Fig. 1.5 E).



**Figura 1.5:** Cortes transversales de juveniles de *R. arenarum* (3 meses postmetamorfosis, lado izquierdo). **A.** La narina externa (NE) se abre en el lateral de la CP en su extremo anterior. Las cabezas de flecha y la flecha señalan las glándulas de Bowman intercaladas en el EO y el vestíbulo en forma de canal, respectivamente. **B.** El epitelio sensorial del receso olfatorio desarrollado durante la metamorfosis aumenta en tamaño (Flecha). La doble cabeza de flecha señala la glándula oral interna. **C.** En la región nasal media la CP se conecta ventralmente con la cámara media (CM) revestida de epitelio no sensorial. **D.** Levemente mas caudal que en C, la CM desaparece y la CP se conecta ventralmente con la cámara inferior (CI), la cual contiene al OVN en el divertículo medial (DM) y epitelio no sensorial en el divertículo lateral (DL) **E.** Caudalmente, la CP se vuelve aplanada y conecta con la cavidad oral (CO) ventrolateralmente. En el piso de la CP un EO desarrollado se eleva formando la eminencia olfatoria (Flechas). CNL, conducto naso-lacrimal; NI, narina interna; NS, septo nasal; OCap, capsula olfatoria. Barras: 200  $\mu$ m.



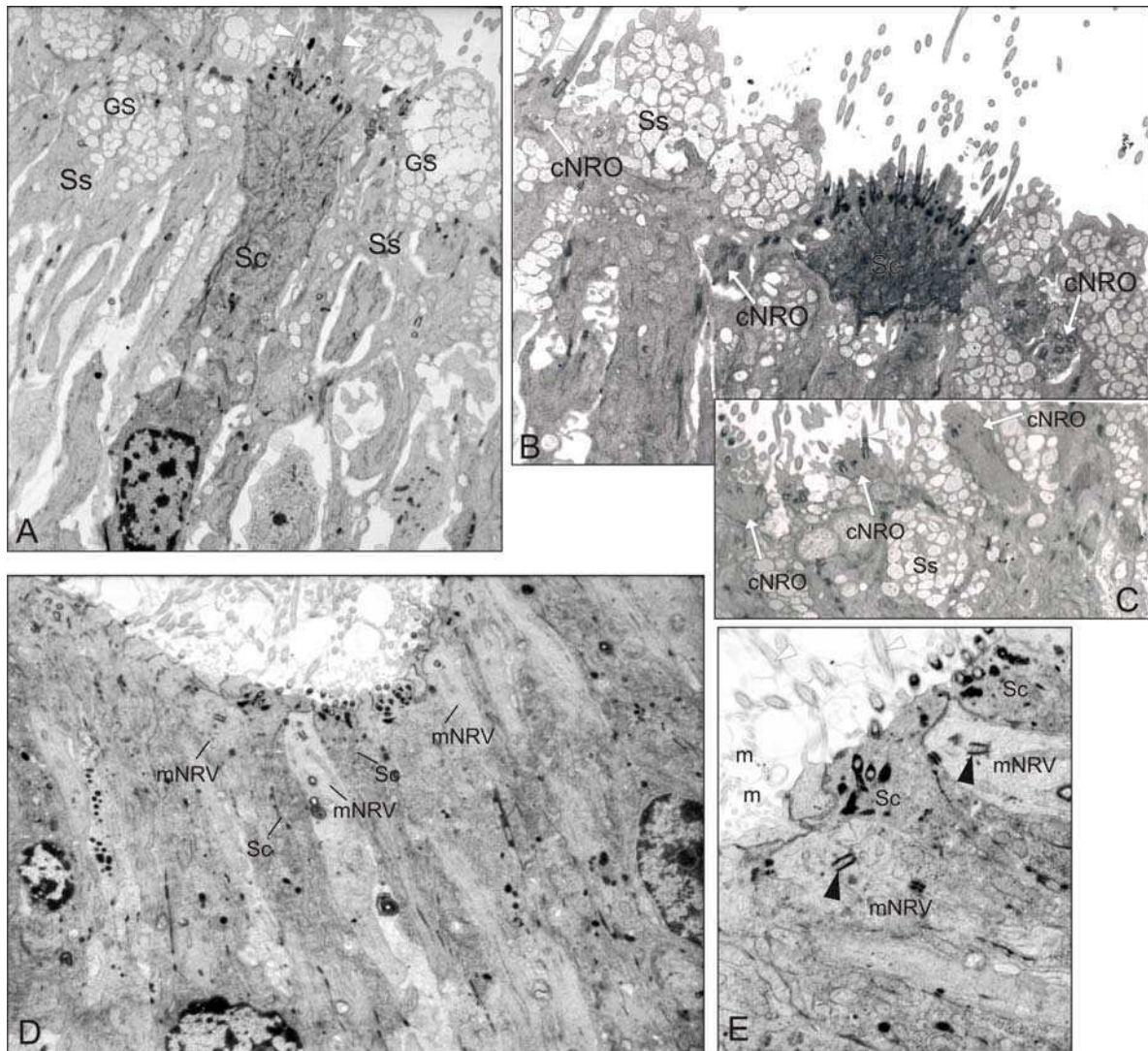
**Figura 1.6:** Histoquímica de lectinas mostrando el desarrollo de las glándulas vomeronasales (GVN; usando *Ricinus communis Agglutinin*, RCA) (A y B), y las glándulas de Bowman (GB) en el EO (usando *Triticum vulgaris*, WGA) (C y D). **A.** En G29 las GVN se desarrollan en el tejido conectivo medial al OVN. Éstas descargan sus secreciones en la porción lateral del OVN. **B.** Las GVN crecen durante el desarrollo larval formando túbulos ramificados en el tejido conectivo que rodea al OVN (G39). **C.** En períodos larvales tardíos (G41), aparecen acúmulos de mucus intercalados en el EO correspondientes a las GB en desarrollo (cabezas de flecha). **D.** Las GB son abundantes en el EO de los juveniles (Flechas). Barras 100 $\mu$ m.



## Ultraestructura del epitelio olfatorio y órgano vomeronasal en larvas de *Rhinella arenarum*

Los análisis realizados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) permitieron identificar distintos tipos celulares tanto en el EO como en el OVN durante etapas larvales intermedias (G34-36) en *R. arenarum*. En el EO se encontraron neuronas receptoras olfatorias (NRO) que presentan cilias en el extremo apical de su proceso dendrítico (usualmente conocido como *knob* dendrítico, Fig. 1.7 B y C). Las cilias presentan los cuerpos basales característicos en el *knob* dendrítico y se pueden encontrar entre una y tres de éstas cilias en un mismo plano de corte. Por otra parte el EO presenta dos tipos de células no sensoriales de sostén o sustentaculares, siendo el más abundante un tipo de célula sustentacular con características secretoras (cargadas de gránulos de secreción), las cuales, probablemente sean las responsables de generar la capa mucosa que recubre el EO. El otro tipo de célula sustentacular observado presenta cilias en su extremo apical (entre 7 y 15 en un mismo plano) y una considerable cantidad de mitocondrias. Este tipo de célula sustentacular no es tan abundante como el tipo secretor (Fig. 1.7 A y B). Las NRO se encuentran intercaladas usualmente entre las células sustentaculares secretoras (Fig. 1.7 C).

En el OVN, por otra parte, las neuronas receptoras vomeronasales (NRV) presentan microvellosidades en el extremo apical de su proceso dendrítico, mientras que solo encontramos células sustentaculares de tipo ciliado (Fig. 1.7 D y E). Al igual que lo observado en el EO, las NRV se encuentran intercaladas entre las células sustentaculares. En el proceso dendrítico de las NRV pudieron observarse numerosos neurotúbulos y entre 1 y 2 centríolos cerca de la porción terminal.



**Figura 1.7:** Microscopía electrónica de transmisión del EO (A-C) y el OVN (D-E) de larvas intermedias (G34-36) de *R. arenarum*. Solo se muestra la porción apical de los epitelios sensoriales. **A.** El EO presenta dos tipos de células sustentaculares: las células sustentaculares secretoras (Ss) que presentan abundantes gránulos de secreción (GS) en su extremo apical y son las mas comunes, y las células sustentaculares ciliadas (Sc). **B y C.** Las neuronas sensoriales o receptoras son de tipo ciliadas (Rc) en el EO de esta especie (las flechas indican los *Knobs* neuronales donde se encuentran los cuerpos basales de las cilias). **D y E.** Las neuronas receptoras vomeronasales presentan microvellosidades (Rm) en la porción terminal de su proceso dendrítico. Estas neuronas sensoriales se encuentran intercaladas con células sustentaculares de tipo ciliadas. Las cabezas de flecha negra identifican los centríolos presentes en las Rm. Magnificación: 4400X (A, B y C), 3000X (D) y 12000X (E).

## **Presencia y grado de desarrollo del epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal en larvas de diferentes especies de anuros.**

El análisis ontogenético de los órganos olfatorios en *R. arenarum* mostró que los renacuajos de esta especie presentan un sistema “dual” de quimiodetección formado por un EO y un OVN. Ahora bien, la presencia de estos dos órganos sensoriales en renacuajos, ¿es una característica general en etapas larvales de anuros? ¿O es una característica que se da solo en algunas especies puntuales? Con estas preguntas en mente realizamos un análisis de la región nasal de renacuajos de 13 especies de anuros.

En todas las especies que hemos analizado encontramos tanto un EO como un OVN desarrollados durante la etapa larval (Tabla 1.2). Al igual que lo descrito para *R. arenarum* se observó que el OVN aparece tempranamente durante la ontogenia de *H. pulchellus* y *X. laevis* (G24-25 y N/F37-38), alrededor de la etapa en que se desarrolla el opérculo en el período pre-larval (G24-25 y N/F40). Durante la etapa larval, las características histológicas generales de ambos sistemas sensoriales en las diferentes especies son idénticas a las descritas en otros grupos de vertebrados (Farbman, 1992). Tanto el EO como el OVN son epitelios pseudoestratificados compuestos básicamente por tres tipos celulares: las células progenitoras basales, que como su nombre lo indica se encuentran en contacto con la membrana basal del epitelio sensorial; las células de soporte o sustentaculares, cuyos núcleos se encuentran en la zona más apical del epitelio; y las neuronas sensoriales, cuyos somas se localizan en el estrato medio del epitelio entre los otros dos tipos celulares recién descritos. No encontramos glándulas de Bowman intercaladas en los epitelios sensoriales durante la etapa larval, pero si existe un desarrollo considerable de las glándulas vomeronasales, o de Jakobson, que crecen y se ramifican en el conectivo subyacente al OVN.

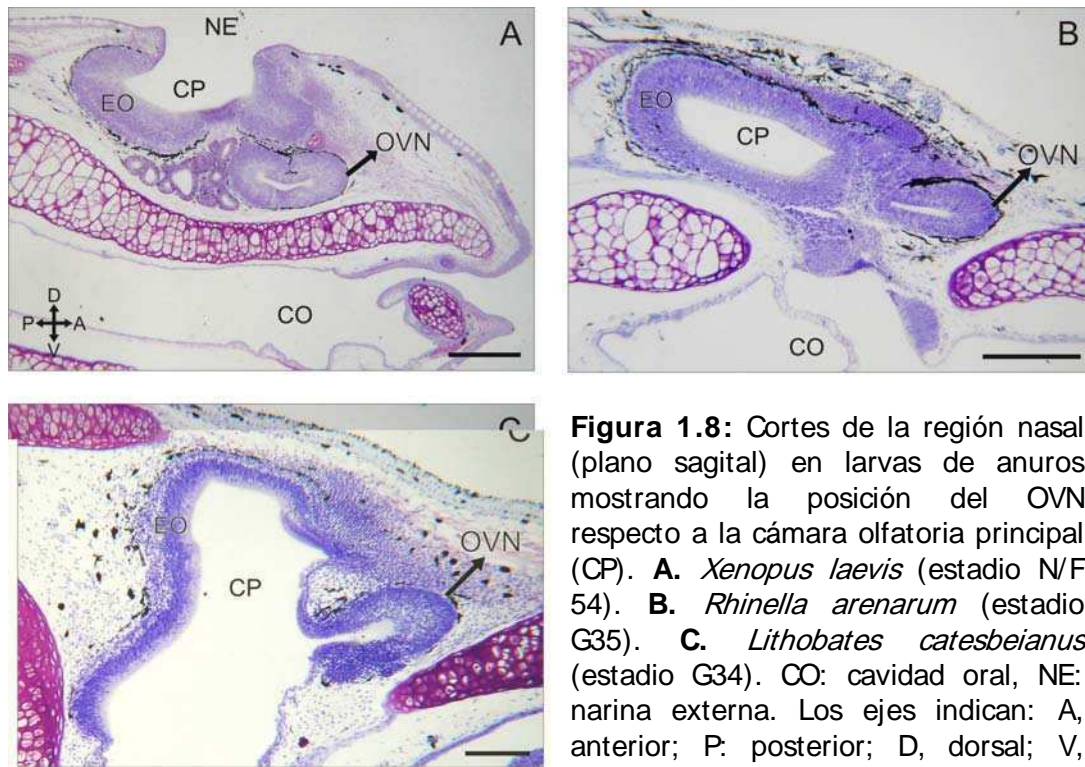
El epitelio sensorial del OVN se localiza en una cámara accesoria, o divertículo, ubicado rostroventralmente al EO de la CP. El OVN forma una estructura arriñonada en la región nasal anteromedial. Notablemente, la posición anatómica del OVN dentro de la región nasal se encuentra muy conservada entre las larvas de diferentes especies (Fig. 1.8). En una dirección rostrocaudal, el OVN es la primer estructura quimiosensorial que aparece ubicado dorsolateralmente a los cuernos trabeculares. La mayor variabilidad del OVN entre las diferentes especies parece estar relacionada con el tamaño del órgano. Por su parte el EO reviste la pared medial y el extremo caudal de la CP. Al igual que lo descrito para *R. arenarum*, hemos observado en varias especies que una rama del EO se prolonga ventralmente y entra en contacto directo con la cavidad oral. Esta porción del EO a la que nosotros nos referimos como EOV se encuentra notablemente desarrollada en las larvas de algunas especies (Tabla 1.2). Todas estas características generales de la organización anatómica de los órganos quimiosensoriales han sido resumidas en los esquemas de la figura 1.9.

**Tabla 1.2. Presencia y grado de desarrollo del EO y OVN en larvas de anuros.**

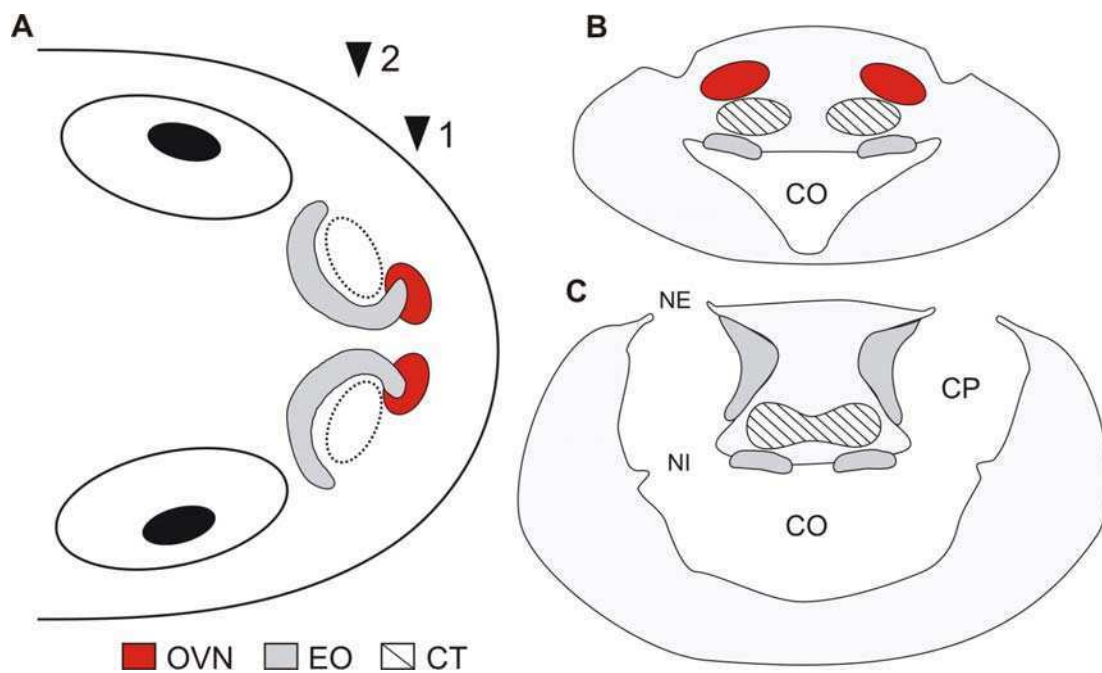
Especie	OVN	EOD	EOV (EO expuesto a la cavidad oral)
<i>Rhinella arenarum</i>	+	+	+
<i>Scinax acuminatus</i>	+	+	+
<i>Hypsiboas curupi</i>	+	+	++
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	++	+	++
<i>Phyllomedusa azurea</i>	++	+	+
<i>Limnomedusa macroglossa</i>	++	+	+
<i>Dermatonotus muelleri</i>	+ -	+	-
<i>Crossodactylus schmidtii</i>	+	+	++
<i>Physalaemus sp.</i>	+	+	+
<i>Lepidobatrachus llanensis</i>	+	+	-
<i>Leptodactylus latrans</i>	++	+	+
<i>Lithobates catesbeianus</i>	+	+	+
<i>Xenopus laevis</i>	+	+	-

+ : presente, - : ausente, + - : presente poco desarrollado, ++ : presente y conspicuo.





**Figura 1.8:** Cortes de la región nasal (plano sagital) en larvas de anuros mostrando la posición del OVN respecto a la cámara olfatoria principal (CP). **A.** *Xenopus laevis* (estadio N/F 54). **B.** *Rhinella arenarum* (estadio G35). **C.** *Lithobates catesbeianus* (estadio G34). CO: cavidad oral, NE: narina externa. Los ejes indican: A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral. Barras: 200 µm.



**Figura 1.9:** Los esquemas representan la organización anatómica general de los órganos quimiosensoriales en larvas de anuros. **A.** vista dorsal. Los óvalos de línea punteada indican la posición de las narinas externas (NE). **B** y **C** representan cortes transversales (dorsal hacia arriba) a las alturas indicadas en **A** con cabezas de flecha (1 y 2 respectivamente). Se identifica al EO (gris), el OVN (rojo) y los cuernos trabeculares (CT, rayado). El EO (rama del EO expuesta a la cavidad oral) puede estar presente o ausente dependiendo de la especie. NI: narina interna, CO: cavidad oral, CP: cavidad principal.

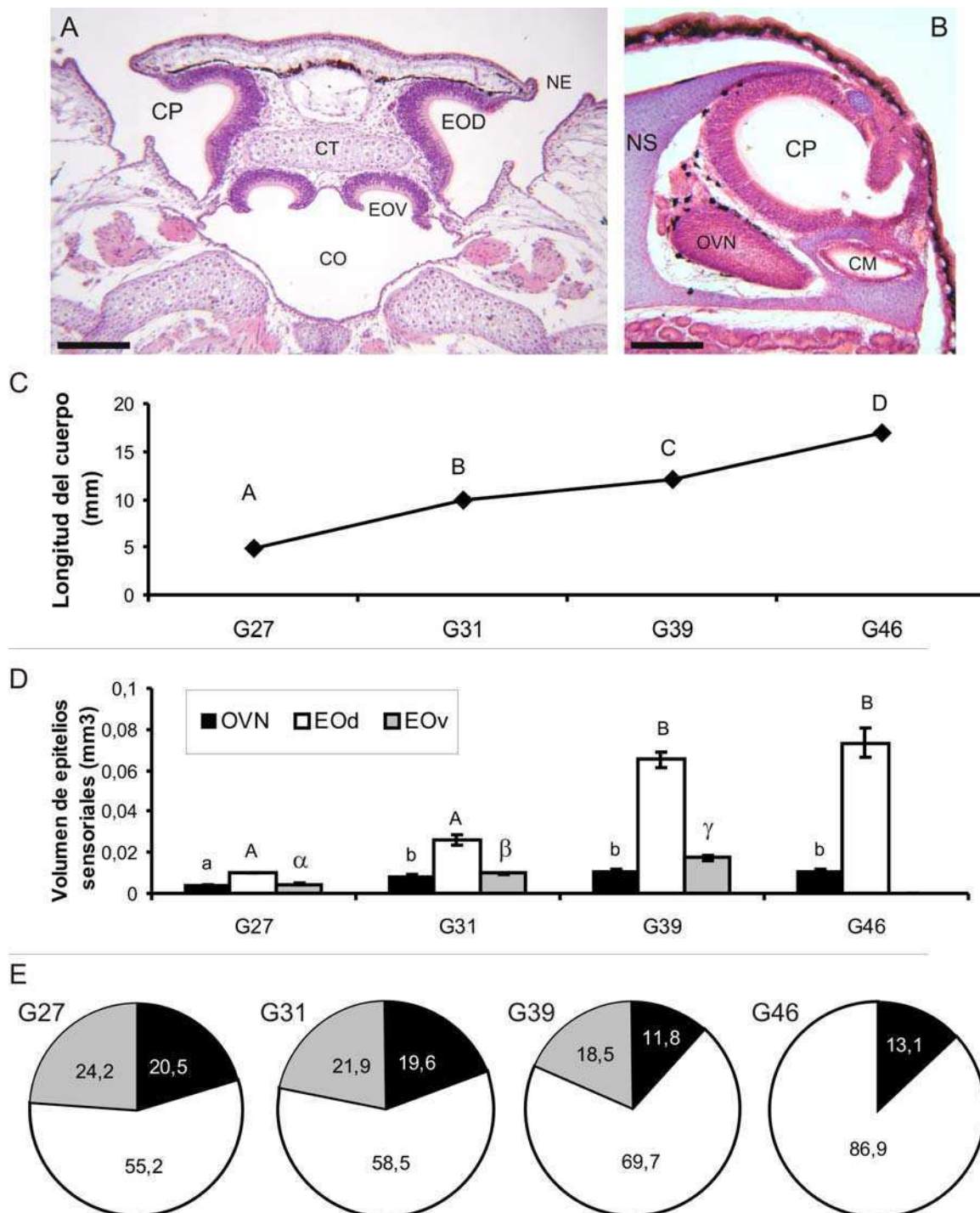
## Morfometría del EO y el OVN durante el desarrollo larval y la metamorfosis de *H. pulchellus*, *R. arenarum* y *X. laevis*.

Para muchas de las especies que se analizaron en la sección anterior de este capítulo, se contaba solo con ejemplares que se encontraban en una etapa determinada, por lo general acotada, del desarrollo larval (Ver Tabla 1.1 en materiales y métodos). Si bien, estos ejemplares aportaron datos valiosos para nuestro análisis morfológico general de los órganos olfatorios, la información que puede obtenerse en estas condiciones no deja de ser acotada. Para conocer mejor la importancia relativa que pudieran tener los distintos órganos sensoriales a lo largo del desarrollo larval y la metamorfosis, se realizó un análisis morfométrico en tres especies de las que contábamos con toda la serie del desarrollo ya que podemos reproducirlas en cautiverio.

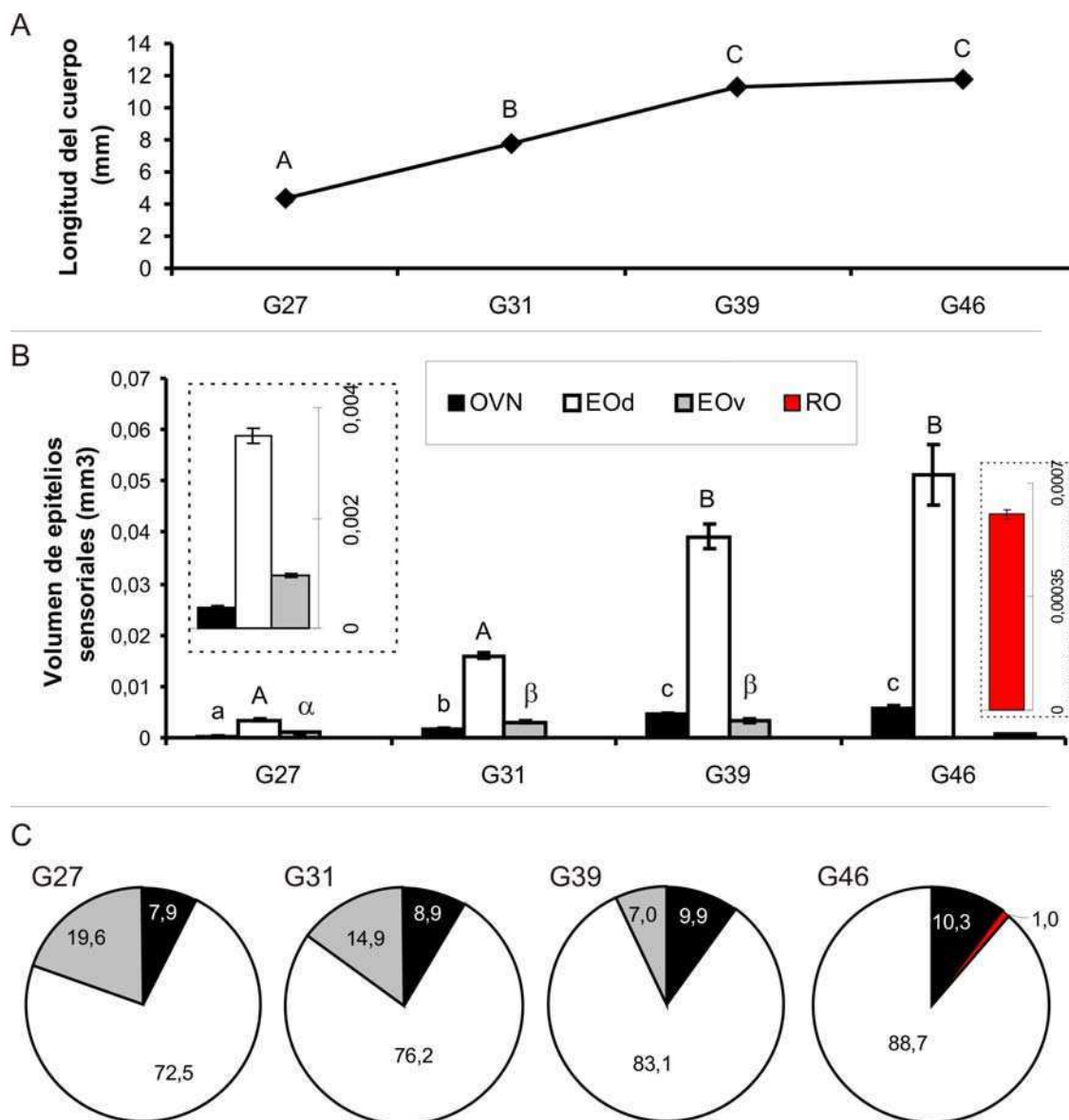
En las tres especies analizadas, los órganos o estructuras sensoriales crecen en volumen a lo largo del período larval de manera mas o menos proporcional al crecimiento del tamaño corporal (Fig. 1.10 C-D, 1.11 A-B y 1.12 C-D). En *H. pulchellus* tanto el OVN como la rama del EO expuesta a la cavidad oral (EOV, Fig. 1.9 A) son considerablemente grandes, alcanzando los 0.011 y 0.017 mm<sup>3</sup> respectivamente en etapas larvales avanzadas (G39). Proporcionalmente, estos dos epitelios juntos representan casi la mitad del volumen sensorial total durante la etapa larval (alrededor del 20% cada uno; Fig. 1.10 E). En etapas larvales tardías (G39) el OVN ya no crece tanto como el EO y representa solo el 12% del volumen sensorial. Como es de esperar, los mayores cambios ocurren durante la metamorfosis. Estos se dan fundamentalmente a nivel del EO, el cual ya no presenta una porción expuesta a la cavidad oral. A nivel del OVN no se observan grandes cambios ni en su tamaño total ni en su representación relativa en los juveniles respecto del último estadio larval analizado (Fig. 1.10 D y E).

Los datos morfométricos en *R. arenarum* confirman las observaciones cualitativas descritas previamente en este capítulo. El OVN es pequeño en tamaño total y relativo comparado con el OVN de las otras especies analizadas. Éste apenas alcanza los  $0.0047 \text{ mm}^3$  en larvas avanzadas y representa menos del 10% del volumen sensorial total durante toda la etapa larval (Fig. 1.11 B y C). Por su parte, el EO también está bastante menos desarrollado en *R. arenarum* respecto a lo observado en *H. pulchellus*, esta porción del EO tiene una importancia relativa mayor durante etapas larvales tempranas (20%, G27) e intermedias (15%, G31) pero decae a menos del 10% en larvas tardías (G39). Durante la metamorfosis el EO desaparece mientras que el OVN no presenta grandes cambios más allá de su reubicación anatómica. El nuevo epitelio sensorial (el RO) formado durante el clímax metamórfico representa sólo el 1% del volumen sensorial en los juveniles recién metamorfoseados. Sin embargo, análisis realizados en adultos mostraron que el RO se vuelve un órgano sensorial conspicuo, identificable incluso bajo lupa (datos no mostrados).

En *X. laevis* no hay una porción de EO expuesto a la cavidad oral (EOV, Fig. 1.12 A). Si bien los órganos quimiosensoriales aumentan su tamaño a lo largo de toda la etapa larval, un aumento muy marcado de estos se observa durante el pasaje de etapas larvales tempranas a intermedias comparado con el aumento del tamaño corporal (Fig. 1.12 C y D). Al igual que lo observado en *H. pulchellus* el OVN representa una proporción importante del volumen sensorial total en *X. laevis* durante etapas larvales, llegando a superar el 25% (Fig. 1.12 E) y a alcanzar los  $0.0145 \text{ mm}^3$ . En etapas larvales avanzadas comienza a desarrollarse la cámara media (CM), la cual, en esta especie, está revestida por epitelio sensorial. Éste representa menos del 5% en larvas tardías (N/F 56) pero supera el 20% del volumen sensorial total en juveniles recién metamorfoseados (Fig. 1.12 B y E). Por su parte el OVN no modifica su tamaño durante la metamorfosis aunque pierde importancia relativa debido al crecimiento del EO en la CP y al desarrollo de la CM.

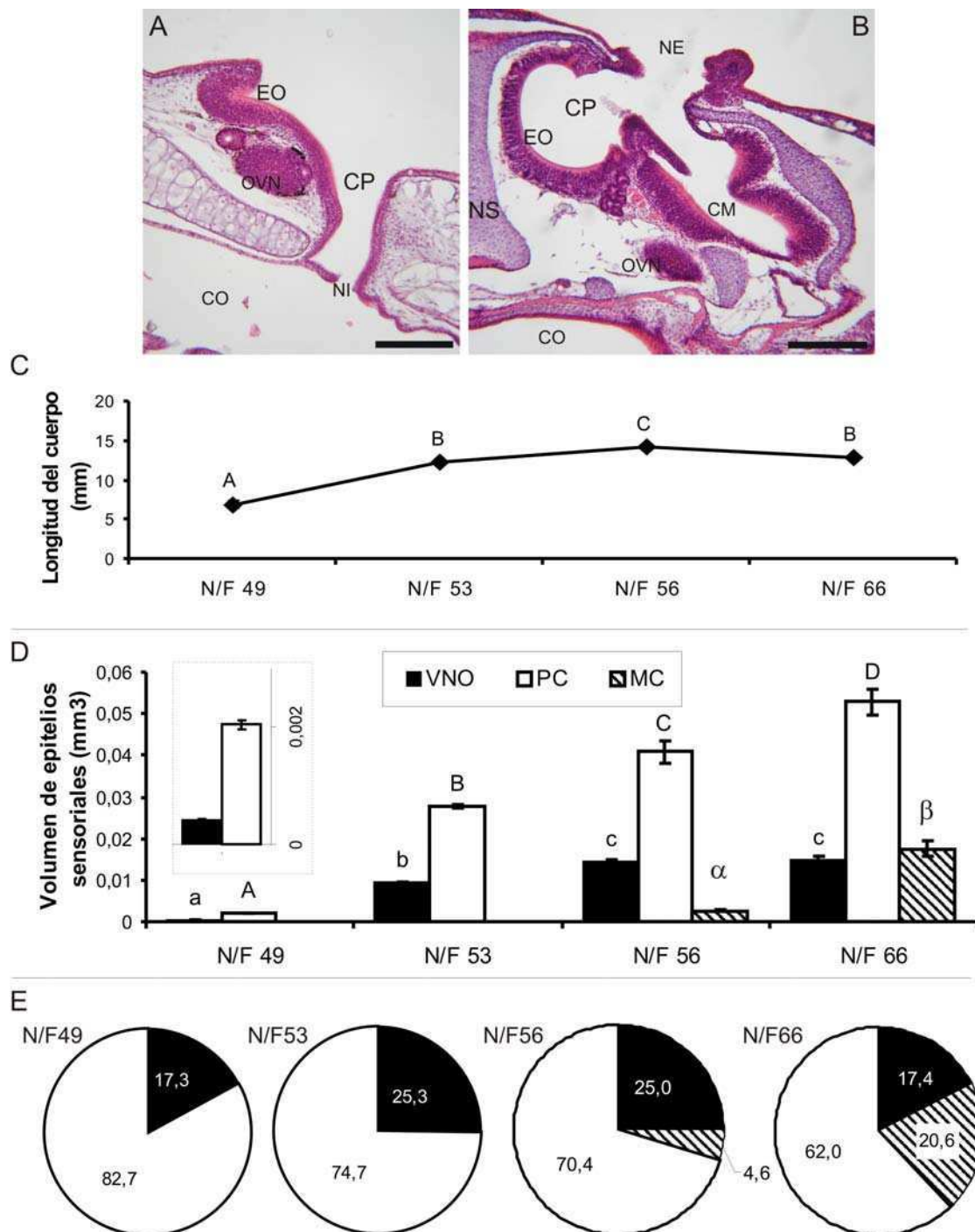


**Figura 1.10:** Datos morfométricos de *Hypsiboas pulchellus*. **A y B** muestran imágenes representativas (en corte transversal, dorsal hacia arriba) de la región nasal en larvas (estadio G27) y juveniles (G46, solo el lado derecho). Estas imágenes ejemplifican como lucen las estructuras y órganos medidos. Barras: 200 $\mu$ m. **C.** Longitud del cuerpo (hocico-cloaca) de animales durante diferentes etapas del desarrollo larval y la metamorfosis (N=16). **D.** El gráfico muestra el volumen promedio de los distintos epitelios sensoriales en los estadios analizados (N=12). **E.** Los gráficos muestran la proporción ocupada por cada estructura u órgano sensorial durante el desarrollo respecto al volumen sensorial total. Los distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1.11:** Datos morfométricos de *Rhinella arenarum*. **A.** Longitud del cuerpo (hocico-cloaca) de animales durante diferentes etapas del desarrollo larval y la metamorfosis (N=16). **B.** El gráfico muestra el volumen promedio de los distintos epitelios sensoriales en los estadios analizados (N=12). **C.** Los gráficos muestran la proporción ocupada por cada estructura u órgano sensorial durante el desarrollo respecto al volumen sensorial total. Los distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).





**Figura 1.12:** Datos morfométricos de *Xenopus laevis*. **A y B** muestran imágenes representativas (en corte transversal, solo el lado derecho, dorsal es hacia arriba) de la región nasal en larvas (estadio N/F53) y juveniles (N/F66). Estas imágenes ejemplifican como lucen las estructuras y órganos medidos. Barras: 200 $\mu$ m. Para abreviaturas ver pág. vi. **C.** Longitud del cuerpo (hocico-cloaca) de animales durante diferentes etapas del desarrollo larval y la metamorfosis (N=16). **D.** El gráfico muestra el volumen promedio de los distintos epitelios sensoriales en los estadios analizados (N=12). **E.** Los gráficos muestran la proporción ocupada por cada estructura u órgano sensorial durante el desarrollo respecto al volumen sensorial total. Los distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La primera conclusión importante que podemos obtener de los resultados presentados en este capítulo es que la presencia de un sistema “dual” de quimiodetección, formado por un EO y un OVN, parece ser una característica general en larvas de anuros. Independientemente de la etapa larval en que se encontraran los animales, ambos órganos sensoriales estaban presentes en todas las especies que se han estudiado. Estos resultados coinciden con lo observado previamente por diferentes autores en renacuajos de otras especies no incluidas en este trabajo de tesis (Jermakowicz et al., 2004, Khalil, 1978, Rowedder, 1937, Taniguchi et al., 1996, Tsui, 1946, Tsui and Pan, 1946, Yvroud, 1966).

Para aquellas especies que contábamos con toda la serie del desarrollo (*R. arenarum*, *H. pulchellus* y *X. laevis*) se observó que el OVN aparece tempranamente durante la ontogenia (alrededor de la etapa en que se forma el opérculo), en el período pre-larval. Esta característica ha sido descrita en larvas de la mayoría de las especies de anuros en que se ha estudiado la ontogenia de los órganos olfatorios (Cooper, 1943; Tsui, 1946; Khalil, 1978; Nieuwkoop y Faber, 1994; Taniguchi et al., 1996; Wang et al., 2008). En *X. laevis* el OVN aparece en el estadio 37-38 de Nieuwkoop y Faber (N/F), previo al desarrollo del opérculo (N/F 40) (Nieuwkoop y Faber, 1994). En *Rana pipiens*, *Rana japonica*, *Rana nigromaculata*, y *Rana chensinensis*, el OVN aparece en el estadio 21-22 de Gosner (1960) (G) (Cooper, 1943; Tsui, 1946; Taniguchi et al., 1996; Wang et al., 2008), mientras que en *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas pulchellus* aparece en estadio G 24-25, en todos los casos cercano o previo al desarrollo del opérculo (G 24-25). Esto implica que, ya sea funcional o no, el OVN está presente durante toda la vida larval en estas especies. Las características histológicas generales del OVN así como su posición dentro de la cavidad nasal, en la región anteromedial, están muy conservadas entre los renacuajos de distintas especies. El único caso registrado que difiere de estas características generales se encontró en el anuro basal *Ascaphus truei*. En las

larvas de esta especie el OVN se localiza en un divertículo ventrolateral de la cavidad olfatoria (Benzekri y Reiss, 2011). Este dato resulta muy interesante ya que la posición ventrolateral del OVN dentro de la cavidad olfatoria es una característica que se observa por lo general en anfibios urodelos (Stuelpnagel y Reiss, 2005).

Los análisis de MET del EO y OVN mostraron que existen neuronas sensoriales morfológicamente diferenciadas durante la etapa larval de *R. arenarum*. El OVN posee NRV con microvellosidades en su extremo apical y células sustentaculares ciliadas. Estas características ultraestructurales han sido encontradas también en OVN de las únicas otras tres especies de anuros analizadas durante la etapa larval (Tabla 1.3). Más aún, la presencia de neuronas con microvellosidades y células sustentaculares ciliadas en el OVN es una característica muy conservada de este órgano en toda la filogenia de tetrápodos (Eisthen, 1992). Por su parte, el EO de *R. arenarum* mostró neuronas ciliadas y dos tipos de células sustentaculares: secretoras o ciliadas. En el EO de larvas de *Ascaphus truei* y *Xenopus laevis* se han descrito, además de estos tres tipos celulares identificados en *R. arenarum*, un segundo tipo de NRO con microvellosidades en su extremo apical (Hansen *et al.*, 1998; Benzekri y Reiss, 2011). En *Rana japonica*, en cambio, no se han encontrado NRO con microvellosidades en el EO larval (Taniguchi *et al.*, 1996), al igual que lo descrito en *R. arenarum*. La presencia de NRO ciliadas en el EO es una característica general a todos los vertebrados. En cambio, la ocurrencia de NRO con microvellosidades en el EO sólo se da en algunos grupos de vertebrados (generalmente acuáticos) y se cree que es un carácter ancestral en la filogenia de vertebrados (Eisthen, 1992). Aunque sólo la ultraestructura de estas cuatro especies de anuros ha sido estudiada durante la etapa larval, de las casi 6000 especies vivientes, es interesante que las NRO con microvellosidades están presentes en el EO de dos representantes muy basales dentro de la filogenia de anuros (*Xenopus* y *Ascaphus*) y ausentes en *Rana* y *Rhinella*. De todas maneras, puede ocurrir que las NRO con microvellosidades en realidad existan en el EO de *R. arenarum* y *R. japonica* pero en un número menor a las NRO ciliadas, o distribuidas en zonas particulares del EO, y que no se las haya



encontrado no porque no estén ahí sino por el bajo número de especímenes analizados.

**Tabla 1.3: Tipos celulares (neuronas receptoras y células sustentaculares) presentes en el EO y el OVN de larvas de anuros**

Especie	EO (cavidad principal)	OVN	Referencia
<i>Rhinella arenarum</i>	Rc Rm(?) Sc Ss	Rm Sc	En esta Tesis
<i>Xenopus laevis</i>	Rc Rm Sc Ss	Rm Sc	Hansen et al. (1998)
<i>Ascaphus truei</i>	Rc Rm Sc Ssm	Rm Sc	Benzekri y Reiss (2011)
<i>Rana japonica</i>	Rc Rm(?) Sc Ss	Rm Sc	Taniguchi et al. (1995)

Rc, neurona receptora ciliada; Rm, neurona receptora con microvilli; Sc, célula sustentacular ciliada; Ss, célula sustentacular secretora; Ssm, célula sustentacular secretora con microvilli.

Respecto a las glándulas multicelulares asociadas a los órganos olfatorios, las únicas desarrolladas durante la etapa larval son las glándulas de Jacobson o vomeronasales, aunque desconocemos si éstas tienen alguna implicancia en la funcionalidad del OVN durante la etapa larval. Por su parte, las glándulas de Bowman (GB), que son comunes en el EO de tetrápodos (Farbman, 1992), aparecen intercaladas en el EO recién durante el clímax metamórfico de los anuros. En este sentido el EO de las larvas de anuros, desprovisto de GB, se asemeja al de los peces. Las secreciones de las GB cumplen un papel fundamental en la función olfatoria generando la capa de mucus que recubre los epitelios sensoriales. Este mucus no sólo evita la desecación del EO en animales terrestres sino que además contiene proteínas que se unen a las moléculas de olor (OBP, por sus siglas en inglés: *olfactory binding protein*) y las transportan hasta los receptores de membrana de las neuronas sensoriales (Millery *et al.*, 2005).

El análisis morfométrico de los órganos olfatorios durante la ontogenia de *H. pulchellus*, *R. arenarum* y *X. laevis* aportó datos sumamente interesantes mostrando que los distintos órganos o estructuras quimiosensoriales presentan distinto grado de desarrollo, en cuanto a su tamaño total y relativo, en las

diferentes especies. El OVN por ejemplo representa mas del 25% del volumen sensorial total en larvas de *X. laevis* mientras que en larvas de *R. arenarum* nunca alcanza el 10% del volumen sensorial total. Este desarrollo considerable del OVN en *X. laevis* también queda de manifiesto cuando se observa a nivel de los bulbos olfatorios. En un estudio morfológico realizado en larvas avanzadas de *X. laevis* (N/F 54-56) se ha encontrado que el número de glomérulos en el BOA es mayor que en el BOP (Nezlin y Schild, 2000). Un mayor tamaño de los órganos sensoriales implica un mayor número de neuronas o neuronas de mayor tamaño, o ambos, y en el caso particular de los órganos quimiosensoriales una mayor superficie de contacto con el medio externo. A raíz de esto, generalmente se observa que las estructuras u órganos sensoriales relativamente grandes están asociados con un incremento tanto en la capacidad de detección como de procesamiento de la información por parte de ese sistema sensorial, incrementando consecuentemente su sensibilidad (Catania, 2005). Es imposible por el momento evaluar si existe alguna correlación entre el grado de desarrollo del SVN y la sensibilidad o diversidad de estímulos detectados por este sistema sensorial en renacuajos. Los órganos quimiosensoriales, y la comunicación química en general, han sido tan inexplorados en larvas, e incluso adultos, de anfibios anuros que no se sabe siquiera si el SVN es funcional en este grupo, mucho menos la naturaleza o diversidad de los estímulos que este sistema sensorial detecta o los comportamientos que desencadena su activación.

Muchos animales presentan sistemas sensoriales elaborados o muy desarrollados para la adquisición de una modalidad sensorial específica. El grado de elaboración o complejidad de las estructuras sensoriales a menudo se correlaciona con especializaciones comportamentales o ecológicas y mejora el desempeño del individuo ante una tarea particular (Catania, 2005). En algunos casos llegan a desarrollarse estructuras extremadamente curiosas y complejas como es el caso del sistema mecanosensorial del topo nariz de estrella *Condylura cristata* (Catania, 1999). En el caso específico de los órganos olfatorios, en distintos grupos de vertebrados suelen observarse pliegues en las paredes internas de las cavidades olfatorias. Estos pliegues forman estructuras

llamadas rosetas en peces y turbinales en reptiles y mamíferos, e incrementan significativamente el número de neuronas y la superficie de contacto del epitelio sensorial. El grado de complejidad de estos pliegues suele ser proporcional a la agudeza del sentido del olfato en diferentes grupos: los mamíferos macrosmáticos, como los perros y los roedores, tienen gran cantidad de pliegues (Schreider y Raabe, 1981; Craven *et al.*, 2007), mientras que los microsmáticos, como los primates, presentan diseños mucho más sencillos (Smith *et al.*, 2007). Aún así, esto no quiere decir que la detección de estímulos químicos en animales con diseños sencillos de sus órganos olfatorios no resulte fundamental para su reproducción y supervivencia. En nuestro caso, no se han encontrado diseños llamativamente elaborados de los órganos quimiosensoriales en ninguno de los renacuajos de las especies estudiadas. Sin embargo, la presencia de “especializaciones anatómicas” en los epitelios sensoriales tanto en etapas larvales como post-metamórficas constituyen una clara evidencia de la importancia de la detección de estímulos químicos en los anuros.

Durante la etapa larval, muchas especies exponen (con mayor o menor superficie) una porción del EO a la cavidad oral (EOV). Todas las especies en que se encontró un EOV presentan el mismo tipo de comportamiento de alimentación, son especies “raspadoras”. Estas especies tienen un aparato oral o disco oral formado por estructuras queratinizadas (filas de dentículos y pico córneo) que utilizan para raspar el sustrato sumergido y obtener el alimento (Vera Candiotti, 2007). Durante el comportamiento de alimentación la cavidad oral se carga de materia orgánica; el EOV expuesto a la cavidad oral seguramente este detectando estímulos químicos que brindan información respecto de la composición de esta materia orgánica a los animales. Las especies en que no hemos encontrado EOV presentan comportamientos de alimentación diferentes, no son especies raspadoras y no poseen disco oral con estructuras queratinizadas. Las larvas de *X. laevis* y *Dermatonotus muelleri* se alimentan por filtración suspendidas en la columna de agua, mientras que las larvas de *Lepidobatrachus llanensis* son macrófagas voraces que capturan grandes presas por succión (Vera Candiotti, 2007). Sería muy interesante

realizar un estudio específico en este tema, extendiendo el análisis a un número mayor de especies, para evaluar si las diferencias en estas características están efectivamente relacionadas con diferencias ecológico-comportamentales y/o con la historia filogenética de las especies.

Al finalizar la etapa larval el EO degenera pero otras nuevas especializaciones anatómicas aparecen. Por ejemplo, en *X. laevis* la cámara media (CM) está revestida por epitelio sensorial. La presencia de este EO en la CM es una característica exclusiva de los Pípidos (Paterson y Hindle, 1951), no ha sido descrita en otros anuros (Jurgens, 1971), y se lo asocia con los hábitos secundariamente acuáticos de los adultos de este grupo. En *Xenopus* se ha demostrado que el EO de la CM permite a los animales seguir detectando estímulos en el agua luego de la metamorfosis (Iida y Kashiwayanagi, 1999). Por otra parte, es interesante lo que sucede durante la metamorfosis de *R. arenarum*; si bien la CM de esta especie no está revestida por un EO, un nuevo epitelio sensorial, el receso olfatorio (RO), se desarrolla en el piso de la cavidad principal. Los adultos de *R. arenarum* son de hábitos terrestres, sin embargo, como la mayoría de los anuros, regresan al agua para reproducirse. Las características histológicas semejantes al EO larval y la posición anatómica del RO indican que este epitelio sensorial podría participar en la detección de estímulos en el agua en animales adultos (Helling, 1938). Experimentos realizados en nuestro laboratorio, en los que se mantiene adultos de *R. arenarum* en peceras con colorantes vitales, mostraron que efectivamente el agua del medio circundante baña la superficie sensorial del RO (resultados no mostrados).

## **CAPÍTULO II**

**Evaluación de la madurez del sistema olfatorio y vomeronasal en renacuajos**

## INTRODUCCIÓN

Los análisis morfológicos comparados, resumidos en el capítulo anterior, mostraron que los renacuajos presentan un sistema dual de quimiodetección formado por un EO y un OVN. Ahora bien, la pregunta obvia que se desprende a continuación es si ambos sistemas sensoriales son funcionales durante la etapa larval.

Para estudiar la funcionalidad de un sistema sensorial, o su participación en la detección de un estímulo determinado, existen múltiples enfoques: puede medirse la actividad eléctrica de una o un grupo de neuronas (ya sea de las propias neuronas sensoriales o de los núcleos cerebrales en donde se procesa la información del sistema sensorial evaluado), puede medirse la intensidad de fluorescencia de colorantes sensibles a iones específicos que se “liberan” durante la activación neuronal, o pueden diseñarse experimentos que evalúen la respuesta comportamental de los individuos a estímulos específicos, entre otras posibilidades. Este tipo de aproximaciones son muy útiles para el estudio de los sistemas sensoriales en general. Sin embargo, existen una serie de cuestiones que deben ser abordadas antes de aventurarnos a evaluar la detección de estímulos específicos por uno u otro sistema sensorial en renacuajos, por ejemplo: ¿poseen ambos órganos sensoriales neuronas receptoras diferenciadas?, ¿están conectadas sinápticamente las neuronas de estos órganos periféricos con zonas específicas del telencéfalo?, en definitiva ¿están ambos sistemas sensoriales ya maduros durante la etapa larval de anuros?

Dos mecanismos son esenciales para la formación de sistemas quimiosensoriales funcionales: 1) la morfogénesis del epitelio sensorial, nervio y bulbo, lo cual involucra la correcta organización de las conexiones epitelio-bulbares, y 2) la diferenciación de las neuronas quimiosensoriales (Farbman, 1992). En este capítulo nos hemos propuesto estudiar, en renacuajos, las proyecciones axónicas y conexiones sinápticas del EO y OVN al telencéfalo así

como la expresión de marcadores celulares que nos brinden información respecto del estado de maduración, en cuanto a diferenciación celular y tisular, del SO y SVN. Si bien estas metodologías no aportan evidencia directa de funcionalidad, creemos que forman parte del conocimiento básico necesario para comprender los sistemas quimiosensoriales en un modelo casi inexplorado en este sentido como son las larvas de anuros.

Desde hace tiempo se conoce que los órganos olfatorios, tanto EO como OVN, poseen la capacidad de renovar sus neuronas sensoriales a medida que estas van muriendo durante la vida del individuo. Este hecho ha convertido al EO en particular en un modelo clásico para el estudio de la neurogénesis (Farbman, 1992), lo cual a su vez ha favorecido la identificación de diferentes marcadores celulares.

Varios de estos marcadores son comunes a otras poblaciones neuronales, y muchos están relacionados con la plasticidad que presentan las neuronas quimiosensoriales. Las NRO expresan la enolasa específica de neuronas, NeuroD, factor de crecimiento nervioso (NGF), epidérmico (EGF), una adenilato ciclasa específica de NRO (ACIII), moléculas de adhesión, etc. (Balmer y LaMantia, 2005). Entre estas últimas, la molécula de adhesión específica de neuronas (NCAM<sup>1</sup>) ha sido descrita tanto en el EO como en el OVN (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1992; Shapiro *et al.*, 1997). NCAM participa del direccionamiento axonal durante el desarrollo del sistema nervioso y se cree que es muy importante tanto para la segregación axonal de las neuronas quimiosensoriales como para la incorporación de nuevas neuronas al circuito (Paz *et al.*, 1995; Storan *et al.*, 2004).

Una molécula considerada específica de neuronas quimiosensoriales y que sin dudas es el marcador mas ampliamente utilizado es el llamado *Olfactory Marker Protein* (OMP) descubierto por F. Margolis hace 40 años (Margolis, 1972). Esta proteína de ubicación citoplasmática ha sido identificada tanto en neuronas del EO como del OVN en una variedad de grupos de vertebrados

---

<sup>1</sup> Por su sigla en inglés “*Neural Cell Adhesion Molecule*”

(Shapiro *et al.*, 1997; Rössler *et al.*, 1998; Ferrando *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2011). Se ha demostrado que OMP participa de la diferenciación y función neuronal (Reisert *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011), por lo que se lo utiliza comúnmente como un marcador de neuronas quimiosensoriales maduras.

Otros marcadores que resultan muy útiles para identificar distintas poblaciones neuronales, tanto en el EO como en el OVN, son las proteínas G asociadas a los receptores de membrana (Halpern y Martinez-Marcos, 2003; Hansen *et al.*, 2004; Nakamuta *et al.*, 2011). Como ya se mencionó anteriormente, tanto el SO como el SVN poseen receptores de membrana característicos pertenecientes a diferentes familias de receptores de siete pasos transmembrana asociados a diferentes vías de señalización mediadas por diferentes proteínas G.



## OBJETIVOS

Con el fin de caracterizar mejor los sistemas quimiosensoriales en renacuajos y de obtener evidencias del estado de maduración de estos sistemas sensoriales, y teniendo en cuenta los objetivos generales de la tesis, en este capítulo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Evaluar la presencia de neuronas quimiosensoriales en el EO y OVN de renacuajos utilizando marcadores específicos.
- ✓ Evaluar las proyecciones axónicas y las conexiones sinápticas del EO y OVN con el telencéfalo de renacuajos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Inmunohistoquímica.*

Las secciones de tejido, obtenidas como se ha descrito anteriormente, se desparafinaron, rehidrataron y se lavaron en PBS. Se realizó un bloqueo de peroxidasas endógenas incubando los cortes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% durante 10 min. (este paso se realizó solo para cortes procesados para análisis en microscopía de campo claro). Se bloqueó la unión a sitios inespecíficos con leche libre de grasa 5% durante 45 min. Luego se incubaron los cortes con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C (ver tabla 2.1 para datos específicos). Al otro día, las muestras se trataron con el anticuerpo secundario adecuado acoplado a biotina<sup>2</sup> durante 45 min. De aquí en adelante los procedimientos difieren si los cortes fueron procesados para análisis en microscopía de campo claro o fluorescencia.

Campo claro: Luego del anticuerpo secundario, los cortes fueron incubados con en complejo estreptavidina-HRP<sup>3</sup> (1/500) durante 45 min. y revelados con un kit de diaminobenzidina<sup>4</sup> (DAB). Finalmente los cortes recibieron una suave coloración nuclear con hematoxilina, se deshidrataron, se montaron en DPX y se analizaron y fotografiaron utilizando un microscopio Leica Reichert Polyvar acoplado a una cámara Sony Cybershot DSC P-200.

Fluorescencia: Luego del anticuerpo secundario, los cortes fueron incubados en oscuridad con el complejo estreptavidina-Alexa Fluor 488<sup>5</sup> (1/200) durante 45 min. Se realizó una coloración general de núcleos con Ioduro de propidio y se montaron los cortes con una mezcla 1:1 de glicerol:PBS. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio láser confocal (Olympus FV-300 conectado a un microscopio Olympus BX-61).

Entre cada uno de los pasos detallados en el protocolo anterior se realizaron tres lavados con PBS de 5 min. c/u.

---

<sup>2</sup> Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.

<sup>3</sup> Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories

<sup>4</sup> Dako, Glostrup, Denmark

<sup>5</sup> Molecular Probes, Eugene, O, EE.UU.

Tabla 2.1. Detalle de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo primario	Dilución final (IHQ)	Dilución final (WB)	Origen
<b>NCAM</b>	1/50	-	Ratón (Dr U. Rutishauser, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa)
<b>OMP</b>	1/800	1/5000	Conejo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)
<b>Gao</b>	1/12000	1/5000	Conejo (sc-387, Santa Cruz Biotechnology)
<b>Gaolf</b>	1/1000	1/1000	Conejo (sc-385, Santa Cruz Biotechnology)
<b>Gai2</b>	-	-	Conejo (sc-7276, Santa Cruz Biotechnology)
<b>Sinaptofisina</b>	1/100	1/1000	Ratón (Sigma-Aldrich)

### ***Marcado de trazos neuronales.***

Los animales fueron anestesiados en 0.1% de MS222 y transferidos a una cámara húmeda. El agua remanente en la cavidad nasal se secó cuidadosamente antes de la aplicación de los trazadores neuronales. Se accedió a los epitelios sensoriales desde dorsal, a través de las narinas externas sin provocar ningún daño en los animales.

Para evidenciar las proyecciones axónicas de las neuronas sensoriales olfatorias y vomeronasales se utilizaron Dextranoaminas (DA) de 3kD (Molecular Probes) acopladas a diferentes fluoróforos.

A partir de una solución saturada de DA acoplada a Alexa Fluor 680 (680DA) en agua destilada se recristalizó una pequeña gota en la punta de una micropipeta de vidrio. La 680DA cargada en la micropipeta fue inyectada manualmente en el OVN. De la misma manera se aplicó una DA acoplada a Tetrametilrodamina (TMRDA) en el EO contralateral. Los animales inyectados

con las DA se los dejó recuperarse de la anestesia en recipientes individuales conteniendo solución de Ringer para anfibios<sup>6</sup>. En estas condiciones, los animales se mantuvieron durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo de supervivencia, los renacuajos fueron fijados en solución de Bouin y procesados para secciones de parafina (15  $\mu\text{m}$ ), como se detalla en capítulo I. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio láser confocal (Olympus FV-300 conectado a una cámara Olympus BX-61).

### ***Experimentos de doble marcado de trazos neuronales e inmunohistoquímica de sinaptofisina.***

Animales en diferentes estadios de desarrollo y de especies diferentes fueron inyectados con DA 3kD (Molecular Probes), fijados en solución de Bouin y procesados para cortes en parafina (15  $\mu\text{m}$ ) como se describe mas arriba. Las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas hasta PBS, bloqueadas para sitios inespecíficos con leche 5% e incubadas ON a 4°C con el anticuerpo primario anti-Sinaptofisina (ver Tabla 2.1). A continuación, las secciones fueron tratadas con el anticuerpo secundario biotinilado apropiado (Vector), seguido por incubación con el complejo Estreptavidina-Alexa Fluor 488 (Molecular probes) y montadas con glicerol/PBS para análisis en microscopía confocal.

### ***Histoquímica de lectinas.***

Con el fin de facilitar la identificación de las estructuras glomerulares en los bulbos olfatorios, se realizó histoquímica de lectinas utilizando la lectina Aglutinina de Soja (SBA), la cual se ha empleado para marcar las proyecciones de los nervios olfatorios en varias especies de anfibios (Meyer *et al.*, 1996). El procedimiento general se realizó como se detalla en el capítulo I.

---

<sup>6</sup> 0.1M NaCl, 1.8mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES-NaOH (pH 7.6)

**Western blot.**

La región nasal con los nervios olfatorios y la mitad anterior del telencéfalo de veinte renacuajos de *R. arenarum* se homogeneizaron en buffer Tris<sup>7</sup> con 1X de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Las muestras proteicas (60µg) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 15% (SDS-PAGE). Las proteínas y los marcadores de peso molecular<sup>8</sup> fueron transferidos a una membrana de PVDF<sup>9</sup>, según se ha descrito anteriormente (Pozzi *et al.*, 2006). Luego del bloqueo de sitios inespecíficos (leche 5% 1 hora a temperatura ambiente) se incubó con anticuerpo primario (ver Tabla 2.1) en agitación a 4°C durante toda la noche. Luego, las membranas se lavaron con buffer Tris-Tween (TTBS) y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP<sup>10</sup>. A continuación, las membranas se lavaron en TTBS y se revelaron con un kit de DAB (Dacko) o bien utilizando un sistema de detección de quimioluminiscencia para visualizar la actividad de peroxidasa (Chemicon), en cuyo caso la imagen fue capturada con un analizador de imagen luminiscente LAS-1000 plus (Fuji Photo Film Co., Ltd.).

---

<sup>7</sup> 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5% de NP40, 1% de Triton, PMSF 1 mM

<sup>8</sup> SeeBlue Plus2 Invitrogen

<sup>9</sup> Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, EE.UU.

<sup>10</sup> Chemicon, Millipore, Billerica, MA

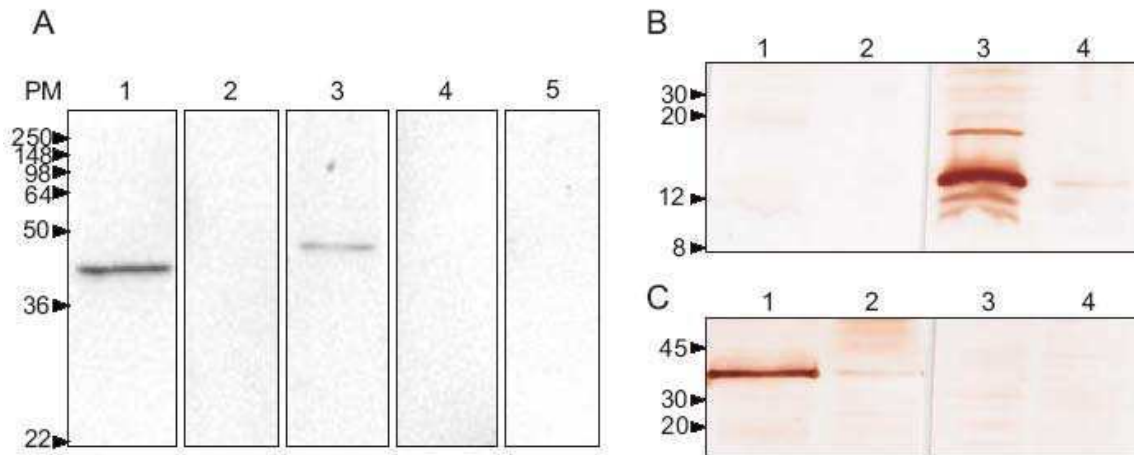
## RESULTADOS

### ***Caracterización de los anticuerpos utilizados***

Los controles generales de la técnica de inmunodetección consistieron en: 1) preincubación del anticuerpo primario con el antígeno sintético específico (siempre que estuviera disponible) y 2) omisión del anticuerpo primario en el protocolo de inmunodetección. En ninguno de estos controles negativos se detectó inmunomarcación en las secciones de tejido. Además se realizaron mediciones por western blot para corroborar la especificidad de las proteínas detectadas en *R. arenarum* (Fig. 2.1). Esta técnica permitió la identificación de bandas específicas con un peso molecular (PM) aproximado esperado de acuerdo a lo observado en otras especies y a los datos suministrados por las respectivas empresas fabricantes. Los anticuerpos anti-Gao y Gaolf reconocieron bandas con un PM aproximado de 44 y 46 KDa respectivamente (Fig. 2.1 A calles 1 y 3). Estas bandas no se inmunodetectaron al incubar previamente el anticuerpo primario con el antígeno específico<sup>11</sup> (Fig. 2.1 A calles 2 y 4) o al omitir el anticuerpo primario del protocolo de inmunodetección (Fig. 2.1 A calle 5). Por otro lado, ninguna banda específica se observó cuando las membranas se incubaron con antisuero contra Gai2 (datos no mostrados). Los anticuerpos anti-OMP y anti-sinaptofisina reconocieron bandas con un PM aproximado de 16KDa (Fig 2.1 B calle 4) y 38 KDa (Fig 2.1 C calle 2) respectivamente. Estas bandas aparecen a la misma altura en la membrana que las bandas específicas reconocidas en homogenatos de rata (calles 3 y 1 en Fig. 2.1 B y C, respectivamente); además, estas bandas no se observan si se omite el anticuerpo primario del protocolo de inmunodetección (calles 1 y 2 en Fig. 2.1 B y calles 3 y 4 en Fig. 2.1 C). La especificidad del anticuerpo anti-NCAM en *R. arenarum* ya había sido corroborada previamente en nuestro laboratorio (Paz *et al.*, 1995).

---

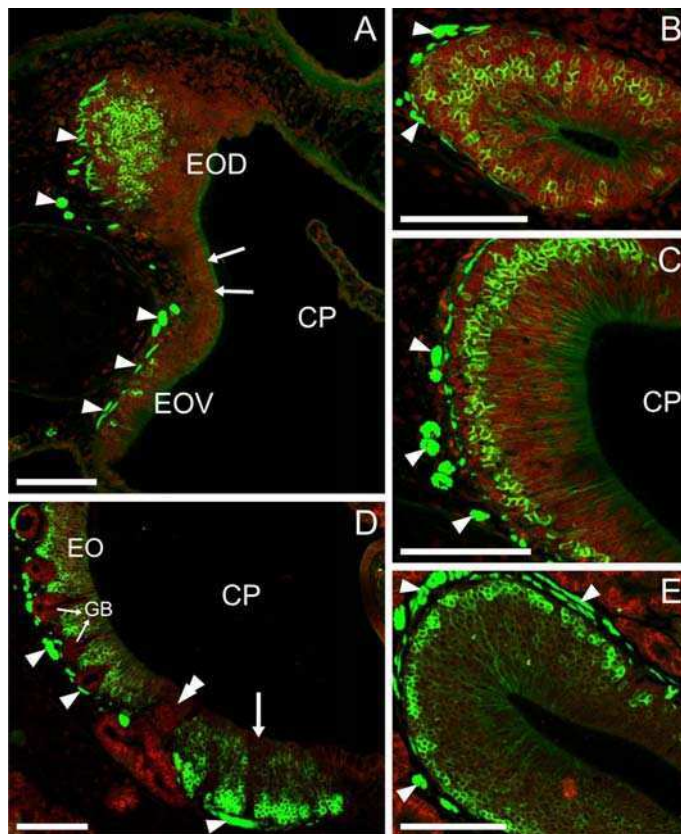
<sup>11</sup> Péptido de bloqueo Gao (sc-387 P) y Gaolf (sc-385 P), Santa Cruz Biotechnology.



**Figura 2.1:** Evaluación mediante western blot de la especificidad de los anticuerpos utilizados. **A.** Proteína Gao (calle1) y Golf (calle 3) en homogenatos de *R. arenarum*, mostrando un peso aproximado de 44 y 46KDa. Las calles 2 y 4 muestran los controles de preincubación y la calle 5 omisión del anticuerpo primario. **B.** OMP en homogenatos de *R. arenarum* (calles 2 y 4) y homogenatos de rata (calles 1 y 3). Las calles 3 y 4 muestran las bandas específicas con un peso aproximado de 16KDa, y las calles 1 y 2 los correspondientes controles negativos. **C.** Sinaptofisina en homogenatos de *R. arenarum* (calles 2 y 4) y homogenatos de rata (calles 1 y 3). Las calles 1 y 2 muestran las bandas específicas con un peso aproximado de 38KDa, y las calles 3 y 4 los correspondientes controles negativos. Las cabezas de flechamarcan los estándares de peso molecular (PM).

***Expresión de marcadores celulares como evidencia del estado de maduración de los sistemas quimiosensoriales.***

La inmunodetección de NCAM nos permitió corroborar la naturaleza sensorial de todos los epitelios analizados hasta ahora, tanto en etapas larvales como en juveniles de anuros (Fig. 2.2). NCAM aparece como una marca conspicua en el EO y el OVN, mostrando una mayor intensidad en los paquetes de axones presentes en la *lamina propria* y en los estratos basales de los epitelios sensoriales.



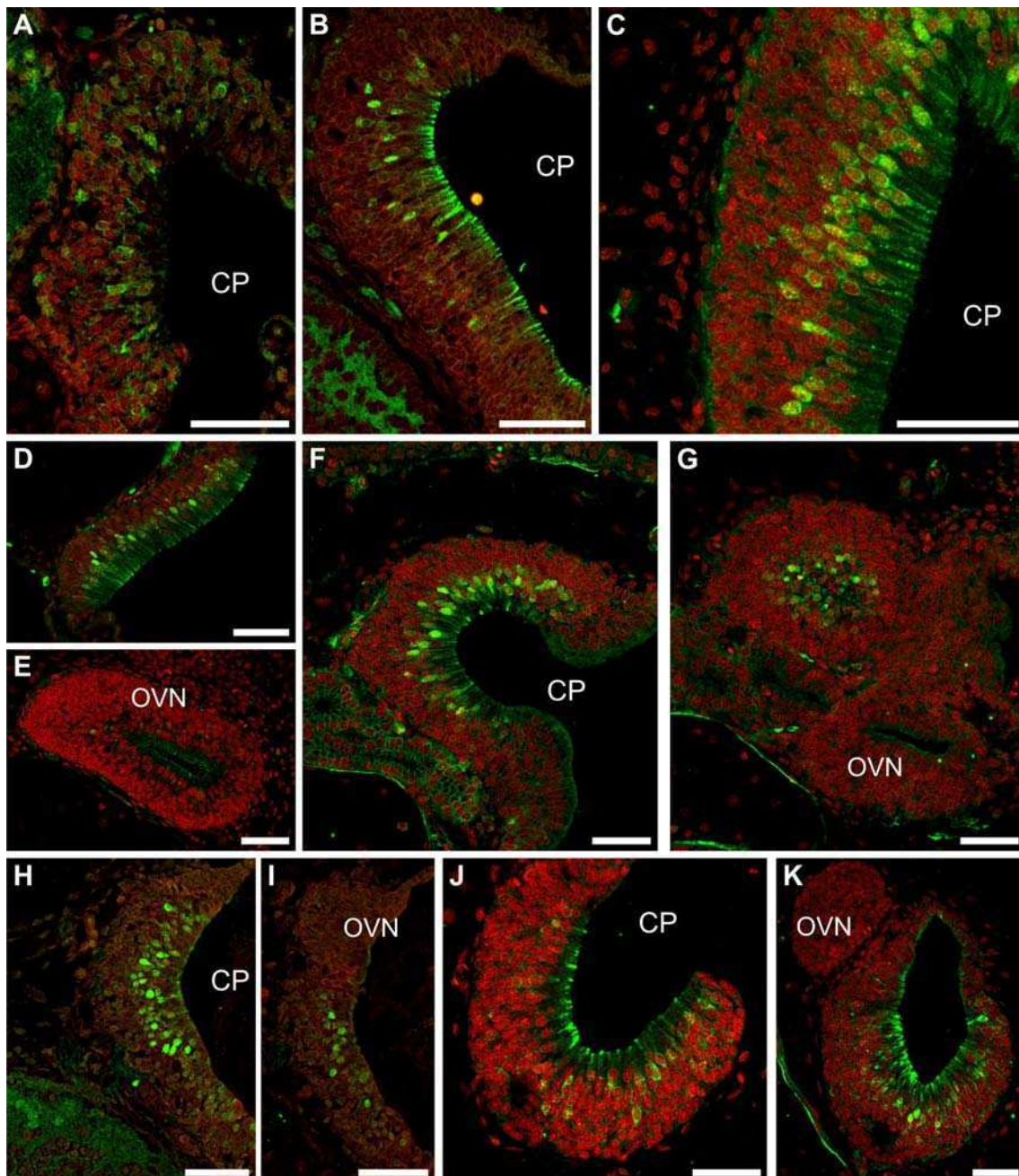
**Figura 2.2:** Inmunodetección de NCAM en cortes transversales de los epitelios quimiosensoriales de larvas (A-C) y juveniles (D y E) de *R. arenarum*. **A.** Las ramas dorsal y ventral del EO (EOD y EO V) están separadas por una porción de epitelio no sensorial (flechas; G29). **B y C.** OVN y EOD (respectivamente) en larvas estadio G37. **D.** En juveniles, NCAM inmunomarca tanto en EO como el epitelio sensorial del receso olfatorio (RO, flecha). La doble cabeza de flecha señala la glándula oral interna que separa el EO del RO. GB: glándulas de Bowman. **E.** OVN en juveniles. Las cabezas de flecha señalan paquetes de axones en la lámina propia. Dorsal es arriba y lateral a la derecha. Barras: 100µm.

Por otra parte, la inmunodetección de OMP reveló la presencia de NRO maduras en el EO de todas las especies estudiadas (Fig. 2.3). En *R. arenarum* se encontraron células OMP inmunoreactivas (ir) en el EO incluso durante la etapa prelarval (Fig. 2.3 A), aunque estas células no presentaban aún morfología de neuronas sensoriales. En cambio, al comenzar las primeras etapas larvales, las células OMP-ir detectadas en el EO de todas las especies estudiadas presentaron una morfología neuronal evidente, mostrando su proceso dendrítico extendido hacia el lumen epitelial (Fig. 2.3 B-D, F, H, y J-K). La población de NRO OMP-ir ocupó la mitad apical de este epitelio sensorial. El OVN, por otra parte, no presentó inmunomarca para OMP en ninguna de las especies estudiadas (Fig 2.3 E, G, I y K). Esta ausencia de inmunomarca de OMP en el OVN se observó tanto en larvas tempranas como en períodos más avanzados del desarrollo larval (Fig. 2.3 E). Es más, ensayos realizados en

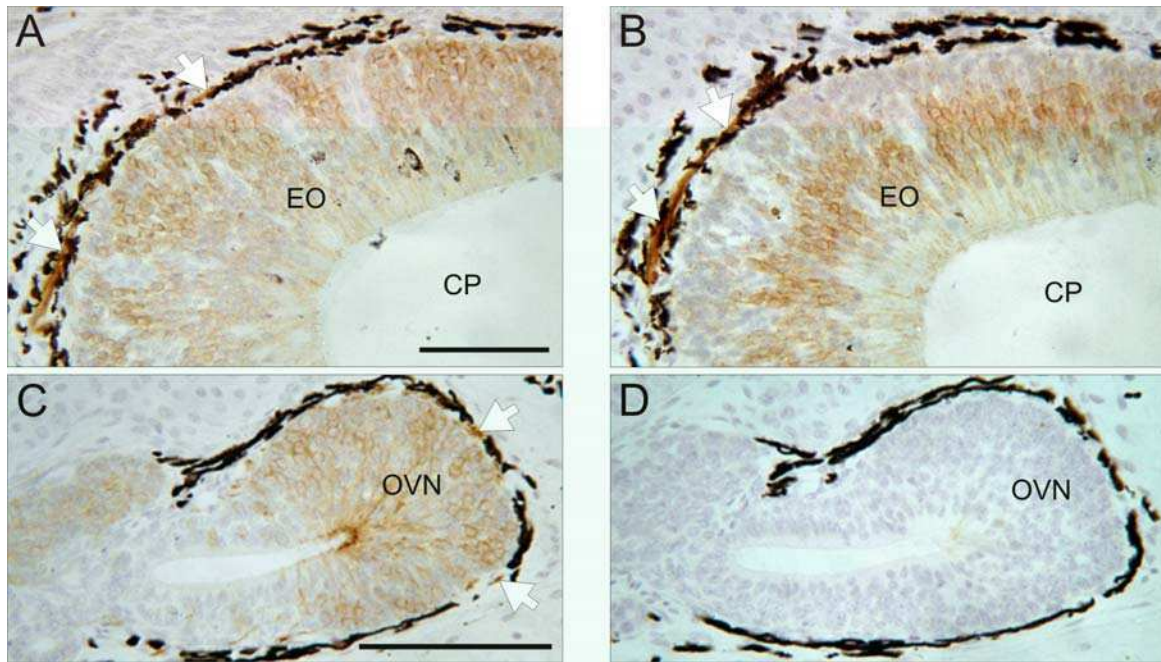


juveniles y adultos de *X. laevis* y *R. arenarum*, tampoco mostraron inmunodetección de OMP en el OVN (datos no mostrados).

Con el fin de ampliar la caracterización de los órganos quimiosensoriales en renacuajos, se realizó un análisis de la expresión de las proteínas G $\alpha$ olf, G $\alpha$ o y G $\alpha$ i2 en etapas larvales intermedias y avanzadas de *R. arenarum* (G32-38). Este análisis permitió identificar dos poblaciones neuronales en el EO (Fig. 2.4 A y B). El anticuerpo contra G $\alpha$ o marcó neuronas bipolares cuyos somas se encontraron en la mitad basal del EO. Los axones de estas neuronas (que forman paquetes en la *lamina propria*) se marcaron intensamente, mientras que sus proyecciones dendríticas hacia el lumen del EO presentaron una marca mucho más débil (Fig. 2.4 A). Por su parte, el anticuerpo contra G $\alpha$ olf marcó neuronas bipolares cuyos somas se encontraron en la mitad apical del EO. Esta población de neuronas también presentó evidentes paquetes de axones G $\alpha$ olf-ir en la *lamina propria*, mientras que sus proyecciones dendríticas se marcaron más débilmente (Fig. 2.4 B). En el caso de OVN, todas las neuronas resultaron inmunoreactivas para G $\alpha$ o y sus somas se ubicaron a varias alturas del epitelio sensorial sin una organización aparente (Fig. 2.4 C). Los axones G $\alpha$ o-ir formaron paquetes en la *lamina propria*, mientras que los procesos dendríticos se marcaron intensamente en la porción terminal la cual se encuentra en contacto con el lumen del OVN (Fig. 2.4 C). El anticuerpo contra G $\alpha$ olf no produjo inmunomarca en el OVN (Fig. 2.4 D), mientras que el anticuerpo contra G $\alpha$ i2 no presentó inmunomarca ni en el OVN ni en el EO (no mostrado).



**Figura 2.3:** Inmunodetección de OMP en los epitelios quimiosensoriales de renacuajos. **A-E.** OMP durante el desarrollo de *R. arenarum* **A.** EOD durante la etapa prelarval (G25). **B.** EOD en etapa larval inicial (G27). **C.** EOD en una etapa larval más avanzada (G35). **D.** EOv en G 35. **E.** OVN en G35. **F-G.** *H. pulchellus* en estadio G27, mostrando inmunomarca de OMP en neuronas del EOD (F) pero no en el OVN (G). **H-I.** *R. fernandezae* en estadio G27, mostrando inmunomarca de OMP en neuronas del EOD (H) pero no en el OVN (I). **J-K.** *Xenopus laevis* en etapa larval inicial (N/F 47), mostrando inmunomarca de OMP en neuronas del EO (J) pero no en el OVN (K). En todos los paneles se muestra sólo el lado derecho. A y C-G son cortes transversales (dorsal arriba y lateral a la derecha), mientras que B y H-K son cortes horizontales (anterior arriba y lateral a la derecha). CP, cavidad principal. Barras: 50 $\mu$ m



**Figura 2.4:** Inmunodetección de proteínas Gao (A y C) y Golf (B y D) en el epitelio olfatorio (EO, A y B) y el órgano vomeronasal (OVN, C y D) en larvas de *R. arenarum*. (G36). **A.** La proteína Gao se expresa en neuronas ubicadas en la mitad basal del EO. **B.** Las neuronas inmunoreactivas (ir) para Golf se encuentran en el tercio medio del EO. **C.** Todas las neuronas del OVN son Gao-ir. **D.** No se detecta inmunomarca para Golf en el OVN. Las flechas blancas indican los axones de las neuronas sensoriales formando paquetes en la *lamina propria*. Barras 100 $\mu$ m.

Dado que las NRV resultaron negativas para OMP pero positivas para Gao, una proteína G que ha sido utilizada por otros autores como marcador de NRV en diferentes animales (Halpern y Martínez-Marcos, 2003; Date-Ito *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2011), hemos decidido analizar la expresión de Gao durante la ontogenia del OVN en *H. pulchellus* y *R. arenarum*.

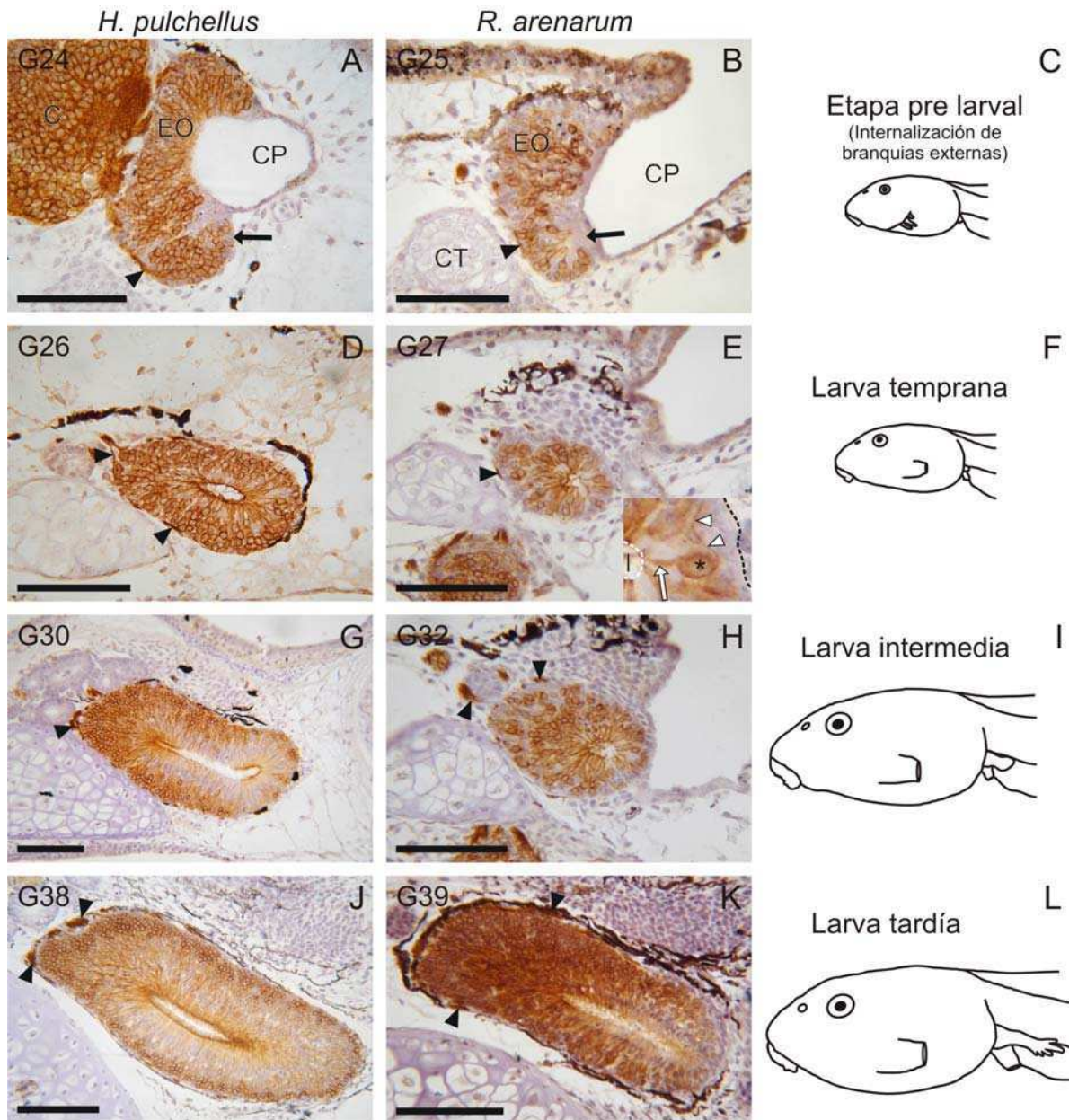
La figura 2.5 resume los resultados obtenidos en estos experimentos. Como ya describimos en el capítulo anterior, el OVN se forma como una evaginación ventral del EO durante la etapa prelarval. Las células de este OVN en formación presentaron inmunomarca para Gao (Fig. 2.5 A y B), incluso se pueden evidenciar, en la *lamina propria*, paquetes de axones saliendo de este grupo de células hacia el telencéfalo (Fig. 2.5 A) y esbozos de procesos dendríticos en formación (Fig. 2.5 B). Ya en las primeras etapas larvales las

células Gao+ del OVN presentan la morfología bipolar típica de las neuronas quimiosensoriales, con sus procesos dendríticos llegando hasta la luz del OVN y sus axones proyectados hacia la membrana basal (Fig. 2.5 D y E). Todas las NRV parecen ser Gao-ir. De aquí en adelante el patrón se mantiene durante el resto del desarrollo larval. El OVN simplemente aumenta en tamaño y consecuentemente el número de NRV Gao-ir (Fig. 2.5 G, H, J y K).

***Proyecciones axónicas y conexiones sinápticas del epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal con el telencéfalo***

Para demostrar que tanto el SO como el SVN han alcanzado un grado significativo de maduración durante la etapa larval, de tal forma que nos permita especular sobre su posible funcionalidad, no sólo basta con demostrar que ambos sistemas poseen neuronas sensoriales diferenciadas. Es necesario también definir si estas neuronas están formando parte del circuito que va a permitir la detección y procesamiento de potenciales estímulos. Es decir, si las neuronas del EO y OVN están conectadas sinápticamente con áreas específicas del telencéfalo.



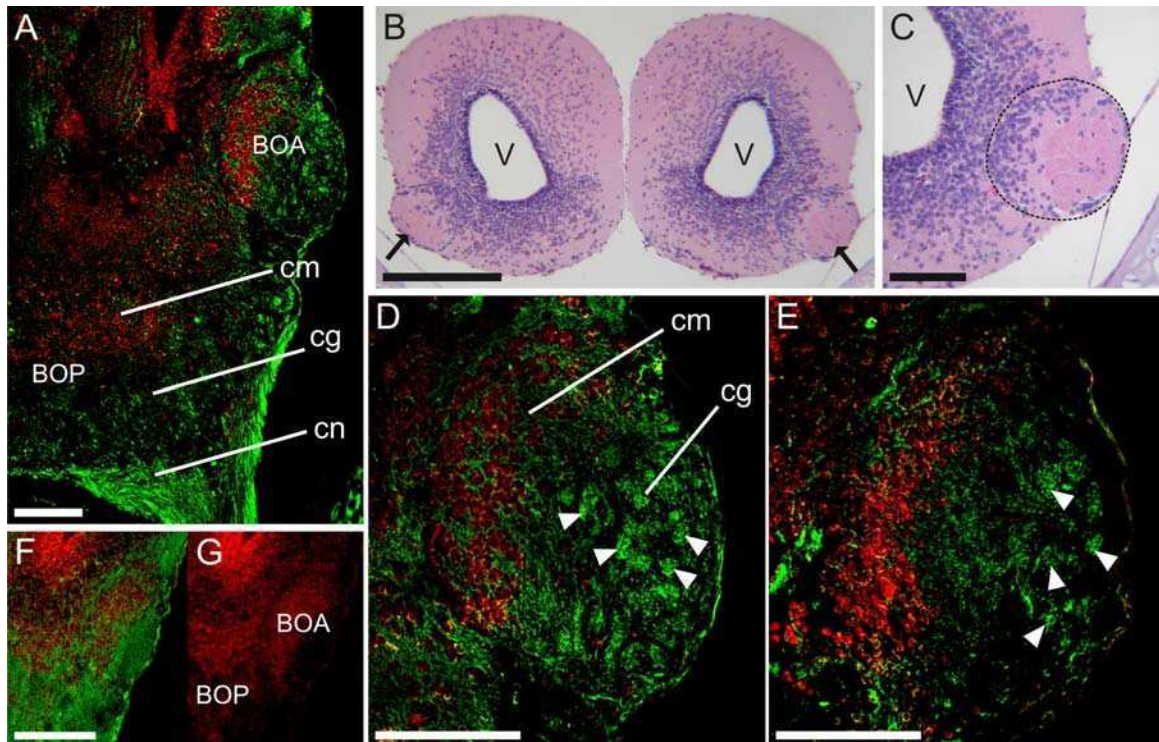


**Figura 2.5:** Inmunodetección de Gao en el OVN (corte transversal, lado izquierdo) de *H. pulchellus* (A, D, G y J) y *R. arenarum* (B, E, H y K) durante el desarrollo larval. En la columna de la derecha (C, F, I y L) se muestran esquemas del aspecto externo general de las larvas en las diferentes etapas analizadas. Los estadios del desarrollo se especifican en la esquina superior izquierda de cada foto. **A-B.** Durante la etapa prelarval (C), un grupo de células Gao inmunoreactivas (ir), correspondientes al OVN en formación (flecha negra), se separan de la porción ventral del EO. En la *lamina propria* pueden verse paquetes de axones Gao-ir saliendo de estos grupos celulares (cabezas de flecha negras) y corriendo hacia el telencéfalo. **D-E.** En las primeras etapas larvales (F) las células Gao-ir del OVN ya presentan la típica morfología bipolar de neuronas sensoriales. El inserto en E muestra en detalle una NRV Gao-ir, con su proceso dendrítico (flecha blanca) extendiéndose hacia el lumen (l) del OVN, el soma ubicado en la zona media (asterisco) y un delgado axón saliendo de su parte proximal (cabezas de flecha blancas); la línea punteada marca la lámina basal. Las neuronas Gao-ir abarcan todo el OVN, el cual crece en las etapas larvales intermedias (G-I) y tardías (J-L). C, cerebro; CT, cuernos trabeculares. Dorsal: arriba, lateral: derecha. Barras: 100µm.

***El bulbo olfatorio principal (BOP) y accesorio (BOA) en renacuajos.***

Antes de aventurarnos a analizar las proyecciones axónicas del EO y OVN nos pareció apropiado realizar un análisis de la morfología general de la porción anterior del telencéfalo en renacuajos. Para ello realizamos cortes seriados del cerebro en los planos transversal y horizontal de larvas de todas las especies estudiadas. A grandes rasgos, la morfología de la porción anterior del telencéfalo fue muy similar en todas las especies analizadas (Fig. 2.6). El BOP se presenta como una estructura de organización laminar, al igual que ocurre en el resto de los vertebrados, donde puede distinguirse claramente en dirección rostrocaudal las capas nerviosa, glomerular y mitral (Fig. 2.6 A). En todas las especies el BOA puede ser identificado histológicamente como un núcleo separado del BOP, sin necesidad de utilizar marcadores específicos (Fig. 2.6 B-C). El BOA también está organizado en forma laminar y en todas las especies se lo encontró en posición ventrolateral en el telencéfalo anterior, levemente caudal al BOP (Fig. 2.6 A-C). El uso de la técnica de histoquímica de lectinas facilitó la identificación de estructuras glomerulares, tanto en el BOP como en el BOA (Fig. 2.6 A y D-E). En las larvas de todas las especies se observaron glomérulos bien desarrollados en el BOA, con excepción de *Scinax acuminatus* y *Dermatonotus muelleri*, en las cuales la capa glomerular del BOA consistió en una malla fibrilar no estructurada (Fig. 2.6 F y G).

Una vez que fuimos capaces de distinguir claramente los bulbos olfatorios (tanto principal como accesorio) en todas las especies, entonces procedimos a realizar los experimentos de trazados neuronales y conexiones sinápticas.



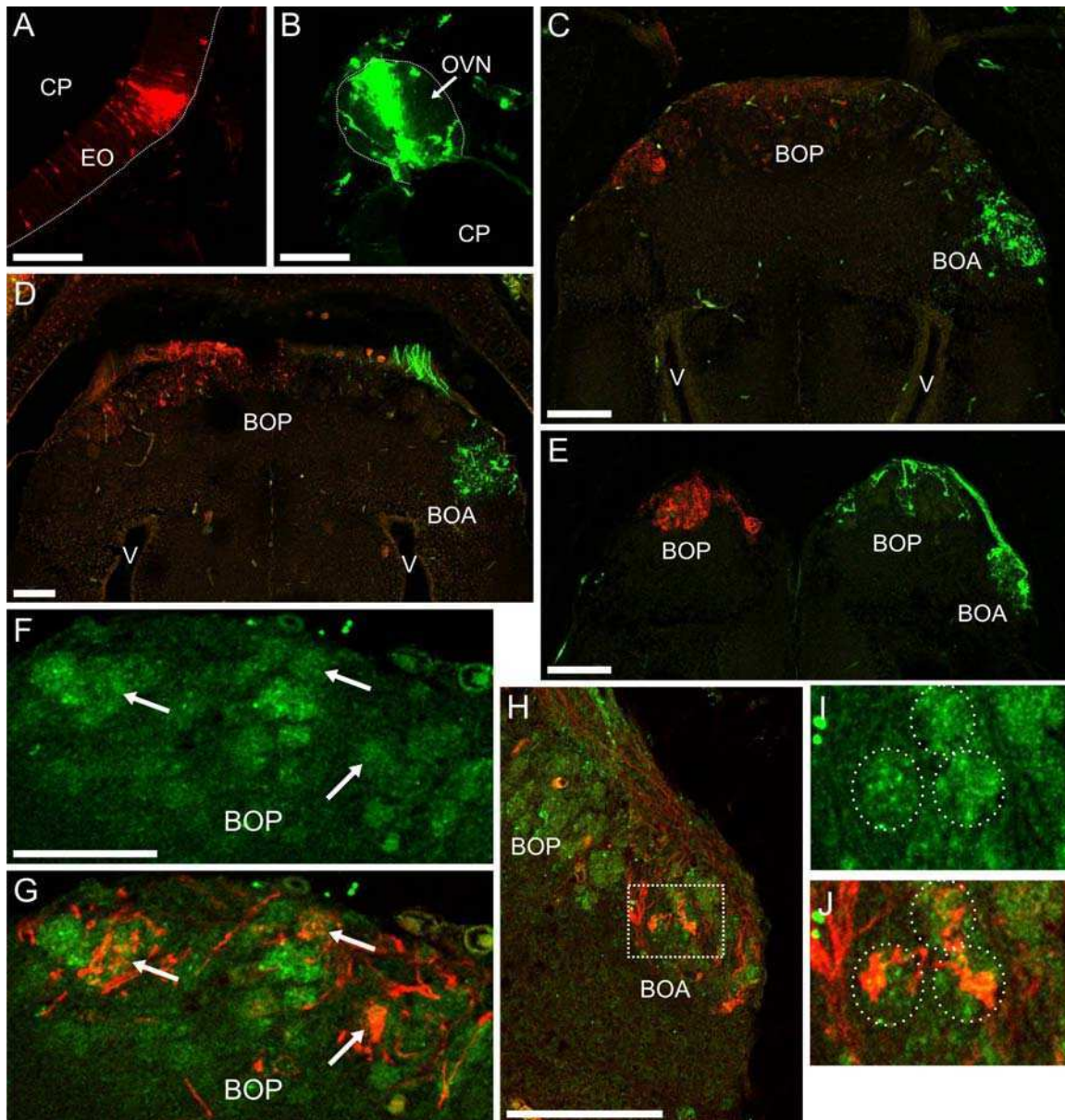
**Figura 2.6:** Posición y organización anatómica del bulbo olfatorio principal (BOP) y accesorio (BOA) en larvas de anuros. A y D-F, preparados coloreados con la lectina SBA (verde) y Ioduro de propidio (rojo), corte en plano horizontal (Arriba: caudal, derecha: lateral). B y C, preparados histológicos coloreados con H-E. **A.** Telencéfalo anterior (lado izquierdo) de larvas de *Crossodactylus schmidtii* (G36) mostrando el BOP y BOA. **B.** Corte transversal del telencéfalo de *H. pulchellus* (G34) a la altura del BOA (flechas). Dorsal arriba. V, ventrículos cerebrales. **C.** Detalle del BOA izquierdo (delimitado por la línea negra punteada) mostrado en B. **D.** Detalle del BOA mostrado en A. **E.** Detalle del BOA de *Leptodactylus latrans* (G37). Las cabezas de flecha en D y E señalan estructuras glomerulares identificadas en el BOA. **F.** Telencéfalo anterior (lado izquierdo) de *Dermatonotus muelleri* (G30). **G.** Misma imagen que en F pero sólo con ioduro de propidio. cg: capa glomerular, cm: capa de células mitrales, cn: capa nerviosa. Barras: 200 $\mu$ m (A y B) y 100 $\mu$ m (C-F).

En la figura 2.7 se resumen los resultados obtenidos de estos experimentos. La aplicación de las dextranoaminas fluorescentes (DA) en el EO (Fig. 2.7 A) mostró que las NRO proyectan sus axones al BOP (Fig. 2.7 C), mientras que la aplicación de DA en el OVN contralateral (Fig. 2.6 B) mostró que los axones de las NRV se contactan con el BOA (Fig. 2.7 C). Estos resultados fueron consistentes en las diferentes especies analizadas (Fig. 2.7 C y D). En unos pocos ejemplares, observamos que algunos trazos neuronales y glomérulos aparecieron marcados en el BOP cuando se inyectaron DA en el

OVN ipsilateral (Fig. 2.7 E). Sin embargo, no creemos que esta marca sea de NRV que envían sus axones al BOP. Por el contrario, este resultado inesperado seguramente se debe a un artefacto asociado al método de aplicación de las DA que se ha utilizado. El borde anterior del OE está estrechamente relacionado con el OVN, por lo que las NRO de esta zona son muy difíciles de evitar cuando se inyecta el OVN accediendo por la narina externa en animales intactos.

Para evaluar si existe conexión sináptica entre las neuronas sensoriales del EO y el OVN con el cerebro, realizamos experimentos de doble marcado con DA e inmunodetección de sinaptofisina, una proteína de vesículas sinápticas que es utilizada para cuantificar y evaluar la distribución de sinapsis en el cerebro (Calhoun *et al.*, 1996). La inmunodetección de sinaptofisina produjo un reticulado tenue en todo el cerebro (lo cual era esperable ya que virtualmente todas las neuronas presentan esta proteína en sus terminales sinápticas) y una marca intensa tanto en los glomérulos del BOP (Fig. 2.7 H) como los del BOA (Fig. 2.7 I). La presencia de inmunomarca de sinaptofisina en ambos bulbos olfatorios se observa desde las primeras etapas larvales en *R. arenarum* (G26). La colocalización entre axones de NRO inyectados con DA y la inmunomarca de sinaptofisina en los glomérulos del BOP demostró que las NRO establecen contacto sináptico con neuronas telencefálicas (seguramente células mitrales) en el BOP durante la etapa larval (Fig. 2.7 F-G). El mismo resultado pudo observarse entre las NRV y los glomérulos del BOA, demostrando que ambos están conectados sinápticamente durante la etapa larval (Fig. 2.7 H-J).

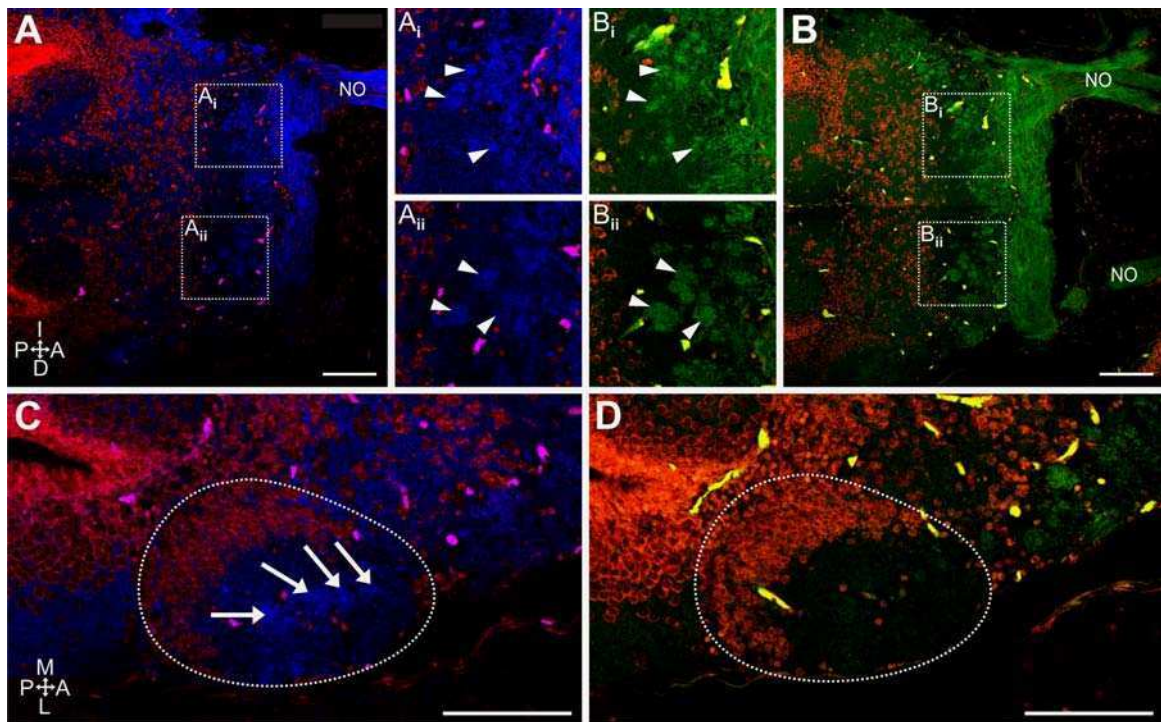




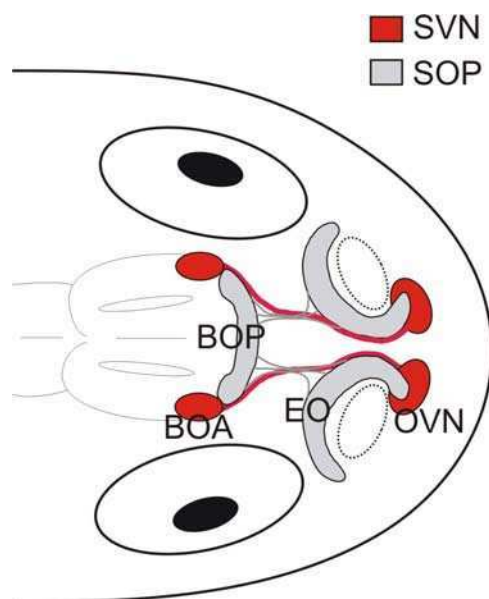
**Figura 2.7:** Proyecciones axónicas y conexiones sinápticas de las neuronas sensoriales del EO y el OVN en renacuajos. **A-E.** Cortes horizontales (anterior arriba) de renacuajos después de la aplicación de los trazadores neuronales TMRDA (EO lado izquierdo, rojo) y 680DA (OVN lado derecho, verde). **A-C.** *R. arenarum* (G32) se muestra los sitios de inyección en el EO (A) y OVN (B) y los sitios de proyección correspondientes en el cerebro anterior (el BOP y BOA, respectivamente) (C). **D.** Cerebro anterior de *H. pulchellus* (G30). **E.** Cerebro anterior de *X. laevis* (N/F54). **F-J.** Doble marcado con 680DA (rojo) e inmunodetección de sinaptofisina (Sin; verde). **F.** Inmunoreactividad (ir) de Sin en cortes horizontales del BOP (lado derecho) de *R. arenarum* en estadio G34. **G.** Misma foto que en F más 680DA. Las flechas señalan tres glomérulos que muestran colocalización. **H.** Sin-ir y 680DA en el BOA de *R. arenarum* (G35). **I y J.** Detalles de la zona recuadrada en (F). Los mismos tres glomérulos son identificados por líneas de puntos circulares en I (Sin-ir) y J (doble marca, Sin-ir y 680DA). CP: cámara principal, V: ventrículo. La línea punteada delimita la lámina basal en A y B. Barras 100  $\mu\text{m}$  (excepto para F y G: 50  $\mu\text{m}$ ).

Por otra parte, como el análisis de expresión de proteínas G en los epitelios sensoriales reveló la presencia de dos poblaciones neuronales en el EO (Gao-ir basales, Gaolf-ir apicales), se realizó un análisis con estos anticuerpos a nivel de los bulbos olfatorios para evaluar si estas poblaciones neuronales, segregadas en el EO, proyectan sus axones a zonas diferentes en el BOP. Lamentablemente, como ambos anticuerpos están hechos en conejo, no se pudo realizar una doble marcación, por lo que tuvimos que recurrir a otra estrategia: se realizaron cortes seriados muy finos del cerebro (5 $\mu$ m) los cuales fueron alternados consecutivamente en dos portaobjetos diferentes. Así, cada corte en un portaobjetos es inmediatamente consecutivo a los cortes en el otro portaobjeto, los cuales fueron sometidos a inmunohistoquímica de Gao y Gaolf. Los resultados resumidos en la figura 2.8 muestran que ambas poblaciones neuronales (Gao-ir y Gaolf-ir) proyectan a todo el BOP sin que haya alguna zona preferentemente representada (Fig. 2.8 A Y B). Es más, el análisis detallado del BOP mostró que, al menos algunos glomérulos se marcaron tanto con Gao como con Gaolf (Fig. 2.8 Ai, Aii y Bi, Bii). Por su parte, el BOA presentó glomérulos Gao-ir (Fig. 2.8 C), pero no se observó inmunomarca para Gaolf (Fig. 2.8 D), lo cual coincide con lo observado en el OVN.

Por último, con los resultados obtenidos en este capítulo, sumados a los conocimientos anatómicos adquiridos en el capítulo anterior, hemos realizado el esquema de organización general de los sistemas quimiosensoriales de larvas de anuros que se muestra en la figura 2.9. Hasta donde hemos podido investigar, esta organización general es aplicable para larvas exotróficas de todas las especies de anuros, con excepción de las larvas del anuro basal *Ascaphus truei*.



**Figura 2.8:** Inmunodetección de Gao (A y C) y Gaolf (B y D) en el bulbo olfatorio principal (BOP, A y B) y accesorio (BOA, C y D) de *R. arenarum* (G36). A<sub>i</sub> y A<sub>ii</sub>, muestran detalles de las zonas correspondientes recuadradas en A. B<sub>i</sub> y B<sub>ii</sub>, Idem para B. Las cabezas de flecha muestran glomérulos compartidos entre A<sub>i</sub> y B<sub>i</sub> y entre A<sub>ii</sub> y B<sub>ii</sub>. Las flechas en C señalan glomérulos Gao-ir en el BOA (delimitado con línea punteada). A: anterior, D: derecha, I: izquierda, M: medial, L: lateral, P: posterior. NO: nervio olfatorio. Barras: 100 μm.



**Figura 2.9:** El esquema resume la organización anatómica general de los sistemas nasales quimiosensoriales para un renacuajo generalizado. BOA: bulbo olfatorio accesorio, BOP: bulbo olfatorio principal, EO: epitelio olfatorio, OVN: órgano vomeronasal, SOP: sistema olfatorio principal, SVN: sistema vomeronasal.

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En este capítulo hemos estudiado aspectos bioquímicos y estructurales del SO y SVN de renacuajos. En conjunto, los resultados obtenidos han demostrado que un grado importante de maduración, en lo que respecta a parámetros de diferenciación celular y tisular, se alcanza tanto en el SO como en el SVN durante la etapa larval de anuros. Además, estos resultados han permitido una caracterización inicial de los sistemas quimiosensoriales en renacuajos que, aunque acotada debido a limitaciones de tipo metodológicas<sup>12</sup>, constituye una base sólida para el planteo de futuras interrogantes en la temática.

La expresión de OMP en el EO de renacuajos descrita en este capítulo es, sin duda, una evidencia contundente de la presencia de NRO diferenciadas (maduras) en este órgano sensorial. Durante el desarrollo de mamíferos, la expresión de OMP en las NRO está temporalmente regulada y correlacionada con la llegada de los axones de estas neuronas al BOP (Graziadei *et al.*, 1980). Aparentemente, la existencia de blancos específicos en el BOP y el establecimiento de conexiones sinápticas funcionales que suministren factores tróficos a las NRO, parecen ser un requerimiento fundamental para el mantenimiento de la expresión de OMP, así como para la supervivencia de las NRO (Farbman, 1990). En larvas de anuros hemos demostrado la presencia de OMP en NRO desde los inicios de la etapa larval (primeros estadios larvales). Esto demuestra que la diferenciación neuronal en el EO se da muy tempranamente durante el desarrollo de anuros (probablemente durante la etapa prelarval cuando tiene lugar la organogénesis del EO) y que al comenzar la etapa de vida libre (etapa larval) los animales cuentan con una población de NRO funcionales.

Por su parte, el OVN resultó negativo para OMP en larvas de todas las especies de anuros estudiadas. ¿Significa esto que el OVN de renacuajos carece de neuronas sensoriales maduras? En mamíferos, la expresión de OMP ha sido

---

<sup>12</sup> Estas limitaciones están basadas fundamentalmente en la baja o nula disponibilidad de herramientas moleculares avanzadas (anticuerpos específicos, secuencias genómicas, etc.) cuando se trabaja en especies o modelos no tradicionales.

descrita tanto en el EO como en el OVN (Tarozzo *et al.*, 1998; Dennis *et al.*, 2004); incluso, OMP esta presente en las neuronas sensoriales del órgano septal y órgano de Grüneberg, dos subsistemas olfatorios exclusivos de roedores (Levai y Strotmann, 2003; Roppolo *et al.*, 2006). Esto pareciera argumentar que, efectivamente, la ausencia de expresión de OMP en el OVN de renacuajos implica la ausencia de NRV maduras. Sin embargo, algunos puntos importantes, respecto de resultados obtenidos en esta tesis y por otros autores, deben ser considerados y discutidos antes de emitir una sentencia al respecto. El primer dato que llamó nuestra atención proviene de ensayos de inmunohistoquímica que hemos realizado en *X. laevis* y *R. arenarum*. Las NRV de juveniles y adultos de estas dos especies tampoco mostraron inmunomarca para OMP. Este resultado da lugar a dos interpretaciones posibles: 1) que el OVN carece de NRV maduras durante todas las etapas del ciclo de vida de los anuros (incluida la etapa adulta), lo cual creemos poco probable, o 2) que las NRV de anuros expresan una variante de OMP, diferente a la expresada en las NRO, que no es reconocida por el anticuerpo comercial utilizado. En un principio, esta segunda opción nos pareció un tanto aventurada ya que, aparentemente, OMP está codificada por un único gen en mamíferos (Danciger *et al.*, 1989). Sin embargo, se ha demostrado mediante *screening* de bibliotecas de cDNA obtenidas de órganos olfatorios de adultos de *X. laevis* que, efectivamente, existen variantes de OMP representadas diferencialmente en los distintos órganos quimiosensoriales (Rössler *et al.*, 1998). Los análisis de hibridación *in situ* mostraron que en la cámara principal de *Xenopus* (que detecta estímulos en el aire) se expresa la variante XOMP2, mientras que en la cámara media (que detecta estímulos en el agua) se expresa la variante XOMP1. En el OVN sólo se detectaron unas pocas células marcadas con ambas variantes de OMP por lo que los autores especulan que incluso una tercera variante, no identificada, de esta proteína se expresaría en *X. laevis* (Rössler *et al.*, 1998).

Los análisis de expresión de diferentes proteínas G en los órganos quimiosensoriales de renacuajos aportaron datos muy interesantes. Por un lado, revelaron la existencia de dos poblaciones de NRO segregadas en el EO



de larvas de *R. arenarum*: Las NRO cuyos somas se ubicaron en la mitad apical del EO resultaron G $\alpha$ olf inmunoreactivas (ir), mientras que las NRO cuyos somas se ubicaron en la mitad basal del EO resultaron G $\alpha$ o-ir. Un patrón similar de segregación de NRO (G $\alpha$ olf-ir y G $\alpha$ o-ir) se ha descrito en el EO de peces teleósteos, aunque en este caso las NRO G $\alpha$ olf-ir se ubican basalmente mientras que las NRO G $\alpha$ o-ir se ubican en la zona apical del EO. Además, se ha demostrado que estas dos poblaciones de NRO de peces difieren entre sí en otros aspectos importantes: las NRO G $\alpha$ olf-ir son ciliadas y expresan receptores de membrana tipo OR similares a los de roedores, mientras que las NRO G $\alpha$ o-ir tienen microvellosidades y expresan receptores de membrana tipo V2R (Belanger *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004). Por otra parte, dos poblaciones segregadas de NRO (G $\alpha$ o-ir basales y G $\alpha$ olf-ir apicales, igual que lo hallado en larvas de *R. arenarum*) se han descrito en el EO de la cámara media de adultos de *X. laevis* (Nakamuta *et al.*, 2011). En este caso también, las NRO G $\alpha$ olf-ir son ciliadas mientras que las NRO G $\alpha$ o-ir parecen tener microvellosidades. Resulta curioso que este patrón de segregación de NRO se haya encontrado sólo en epitelios que, a priori, participan de la detección de estímulos disueltos en el agua (peces, larvas de *R. arenarum* y cámara media de adultos de *X. laevis*), sería interesante analizar la expresión de proteínas G en el EO de adultos de *R. arenarum* (momento en el cual se supone que detectan estímulos volátiles) para ver si este patrón de segregación se mantiene o se pierde.

En el EO de larvas de *R. arenarum* sólo hemos encontrado NRO ciliadas (capítulo I). Este resultado, en principio, difiere de lo observado en peces y xenopus donde NRO con distintas vías de señalización presentan distinta morfología apical. Sin embargo, como hemos discutido previamente, el hecho de no haber encontrado NRO con microvellosidades en el EO de *R. arenarum* no quiere decir que estas no existan. En este sentido, sería interesante realizar un análisis combinado de inmunomarcación de proteínas G con microscopía electrónica a fin de dilucidar si tanto las NRO G $\alpha$ o-ir como las G $\alpha$ olf-ir encontradas en el EO de *R. arenarum* presentan cilios apicales.

En los vertebrados, cuando las NRO mueren son reemplazadas por nuevas NRO que surgen a partir de la división y diferenciación de células progenitoras ubicadas sobre la lámina basal del EO (Farbman, 1992). En este contexto, es posible que la población de NRO Gao-ir ubicada en la mitad basal y la población de NRO G $\alpha$ olf-ir ubicada en la mitad apical del EO estén representando en realidad diferentes etapas de maduración de un mismo tipo neuronal. La utilización de diferentes proteínas G en diferentes etapas de la maduración de NRO se ha demostrado en ratones (Chesler *et al.*, 2007). Durante el desarrollo embrionario tanto las células progenitoras como las NRO inmaduras y maduras expresan la proteína G $\alpha$ s (cuya activación estaría involucrada en la coalescencia de axones en glomérulos específicos), mientras que en etapas post embrionarias las NRO expresan la proteína G $\alpha$ olf (la cual esta involucrada en la transducción evocada por olor) (Chesler *et al.*, 2007). Sin duda, la población de células Gao-ir ubicadas basalmente en el EO de *R. arenarum* no corresponde a células progenitoras pluripotenciales, ya que la inmunodetección de Gao reveló paquetes de axones que llegan al BOP, una característica exclusiva de neuronas. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que esta población de NRO Gao-ir sea en realidad una población de neuronas “inmaduras” que se encuentran en proceso de diferenciación. Puede ocurrir entonces que la segregación observada se deba a la visualización de dos procesos diferentes que ocurren simultáneamente en el EO: por un lado las NRO G $\alpha$ olf-ir representarían neuronas “maduras” participando (vía G $\alpha$ olf) de la transducción de señal evocada por olor, mientras que por otro lado las NRO Gao-ir representarían neuronas “inmaduras” en un activo proceso de axogénesis (vía Gao) que suma nuevas neuronas al circuito. Esta hipótesis explicaría por qué algunas NRO Gao-ir contactan glomérulos en común con NRO G $\alpha$ olf-ir en el BOP.

En este punto es preciso retomar la discusión respecto a los resultados obtenidos con la inmunodetección de OMP. Curiosamente, la inmunomarca de OMP se observó en NRO ubicadas en la mitad apical del EO de manera consistente en todas las especies y etapas larvales estudiadas. Lamentablemente, como los anticuerpos anti-OMP y anti-proteínas G están

realizados en la misma especie (ver tabla 2.1) no hemos podido realizar dobles marcaciones con ellos. De todas maneras, dada la distribución de las inmunomarcas obtenidas separadamente, es muy probable que OMP colocalice con la población de NRO G $\alpha$ olf-ir pero no con las NRO G $\alpha$ o-ir. Este resultado, aún en el caso de ser alcanzado, tampoco demostraría que las NRO G $\alpha$ o-ir son neuronas inmaduras ya que, como discutimos mas arriba, es muy probable que una o varias poblaciones de NRO maduras expresen una variante de OMP no reconocida por el anticuerpo comercial utilizado. En este sentido, sería interesante estudiar si alguno de los anticuerpos para NRO inmaduras, disponibles comercialmente, reconoce epítopes específicos en anfibios, de tal forma de evaluar si esta población de neuronas corresponde a NRO inmaduras o maduras.

Por otra parte, el OVN de *H. pulchellus* y *R. arenarum* mostró una expresión masiva de G $\alpha$ o en sus NRV. Esta expresión de G $\alpha$ o se registró desde etapas tempranas del desarrollo de anuros en las células que constituyen al OVN en formación durante la etapa prelarval. Estas células G $\alpha$ o-ir adquieren rápidamente una morfología neuronal bipolar durante las primeras etapas larvales. La presencia de la proteína G $\alpha$ o en NRV ha sido descrita en anfibios (Hagino-Yamagishi *et al.*, 2004; Hagino-Yamagishi y Nakazawa, 2011), reptiles (Murphy *et al.*, 2001) y mamíferos (Halpern y Martinez-Marcos, 2003). Incluso, la detección de esta proteína ha sido utilizada para caracterizar el SVN presuntivo descrito en el pez pulmonado *Protopterus doloi* (Gonzalez *et al.*, 2011).

En algunos mamíferos existen dos poblaciones de NRV segregadas en el OVN: en la zona basal hay NRV que expresan los receptores de la familia V2R acoplados a la proteína G $\alpha$ o y proyectan sus axones a la región posterior del BOA, mientras que en la zona apical las NRV expresan los receptores de la familia V1R acoplados a la proteína G $\alpha$ i2 y proyectan sus axones a la región anterior del BOA (Jia y Halpern, 1996; Jia *et al.*, 1997; Matsunami y Buck, 1997; Ryba y Tirindelli, 1997). En nuestros experimentos no hemos detectado inmunomarca de G $\alpha$ i2 en el OVN de renacuajos. En este sentido, otros autores



han encontrado que en el OVN de *X. laevis* sólo se expresan receptores de la familia V2R y la proteína acoplada G $\alpha$ o tanto en etapas adultas como larvales (Hagino-Yamagishi *et al.*, 2004). Aunque también hay que considerar la posibilidad de que el anticuerpo comercial utilizado para identificar a la proteína Gai2 en renacuajos tal vez no funcione con especies alternativas.

Finalmente, los experimentos de marcado de trazos neuronales y expresión de sinaptofisina demostraron que tanto las neuronas del EO como del OVN proyectan sus axones a áreas específicas del telencéfalo donde establecen contacto sináptico con neuronas del BOP y BOA. En todas las especies analizadas, ambos bulbos olfatorios pueden distinguirse con una simple coloración topográfica general, ya que BOP y BOA forman estructuras histológicamente separadas. Resulta muy interesante además que los análisis histológicos del telencéfalo anterior realizados con la técnica de histoquímica de lectinas hayan demostrado la presencia de glomérulos tanto en el BOP como el BOA. La formación de los glomérulos requiere del arribo previo de los axones de las neuronas sensoriales, las cuales se cree que inducen la formación de la arborización glomerular en las proyecciones dendríticas de las células mitrales (Malun y Brunjes, 1996; Treloar *et al.*, 1999). Este dato es particularmente importante para interpretar los resultados obtenidos de aquellas especies que solo disponíamos de material de colección de museo, y en las cuales la técnica de incorporación de DA no puede utilizarse. La presencia de estructuras glomerulares en el BOP y BOA durante la etapa larval sugiere que los axones de las neuronas sensoriales ya se han contactado con neuronas telencefálicas y demuestra que un importante grado de maduración histológico existe en ambos bulbos olfatorios.

# **CAPÍTULO III**

**Participación de los sistemas quimiosensoriales nasales en la detección de estímulos específicos**

## INTRODUCCIÓN

Sin duda, existen tres cuestiones fundamentales en la vida de cualquier animal: encontrar pareja para reproducirse, encontrar comida y evitar ser comido. No existen casos registrados de neotenia en larvas de anuros, por lo cual, todos aquellos comportamientos asociados generalmente a la reproducción están ausentes en renacuajos. Por el contrario, los otros dos puntos mencionados (localización de comida y evitación de predadores) si resultan trascendentales durante la vida larval. De hecho, la variedad de comportamientos descritos en renacuajos, aunque acotados respecto a otros animales, siempre están relacionados con estrategias que favorecen el crecimiento, desarrollo y supervivencia de los individuos hasta la metamorfosis. En particular, se ha demostrado en numerosos trabajos que la detección de claves químicas en el ambiente, entre las distintas modalidades sensoriales de los renacuajos, juega un papel fundamental en la activación y mediación de estos comportamientos (Hoff *et al.*, 1999).

La quimiodetección es utilizada por los renacuajos para la localización de fuentes de alimento (Veeranagoudar *et al.*, 2004; Crossland y Shine, 2011; Crossland *et al.*, 2012), el reconocimiento de predadores (Kiesecker *et al.*, 1996; Scarabotti *et al.*, 2007; Fraker, 2008a; Gonzalo *et al.*, 2009) y la detección de señales de alarma liberadas por coespecíficos (Hews y Blaustein, 1985; Hews, 1988; Kiesecker *et al.*, 1999; Mirza *et al.*, 2006; Fraker *et al.*, 2009). Incluso, los renacuajos son capaces de reconocer el grado de parentesco entre diferentes individuos de su misma especie a través de señales químicas (Waldman, 1985; Blaustein y Waldman, 1992; Villinger y Waldman, 2008).

Respecto a la localización de fuentes de alimento, está generalmente aceptado que se basa casi exclusivamente en la detección de señales químicas, aunque curiosamente este comportamiento ha sido muy poco estudiado o por lo menos muy poco documentado. Los escasos trabajos realizados al respecto,

efectivamente, demuestran que las larvas se guían por claves químicas más que por cualquier otra vía sensorial (Veeranagoudar *et al.*, 2004; Crossland y Shine, 2011). Sin embargo, en ningún caso se ha analizado cuál es el órgano o sistema sensorial (olfatorio, vomeronasal u otro) involucrado en este comportamiento.

Por el contrario, la detección de estímulos relacionados con comportamientos antipredatorios ha sido bastante más estudiado en larvas de anuros, al menos desde un punto de vista ecológico-comportamental (Hoff *et al.*, 1999). En los renacuajos, al igual que en muchos otros animales, la respuesta más frecuente ante una amenaza de predación consiste en una disminución de los niveles de actividad de los individuos (comportamiento comúnmente conocido como *freezing*). Por lo general, al detectar un estímulo que señala un riesgo de predación, los renacuajos cesan todo tipo de actividad locomotora y simplemente se dejan caer al fondo del estanque, confiando en no ser detectados (Kiesecker *et al.*, 1996; Kiesecker *et al.*, 1999; Fraker, 2008a). Aunque esta última respuesta comportamental antipredatoria suele ser la más frecuente en renacuajos, por lo menos en la bibliografía, también se han registrado otros tipos de comportamientos antipredatorios como evitación de zonas, uso de refugios o inclusive aumento de la actividad locomotora (Hews y Blaustein, 1985; Hews, 1988; Kiesecker *et al.*, 1999).

La naturaleza química de los estímulos que advierten a los renacuajos de un riesgo de predación permanece casi completamente desconocida; aunque estos estímulos pueden ser claramente divididos en dos tipos: Por un lado, los renacuajos pueden detectar claves químicas provenientes del propio predador (kairomonas<sup>1</sup>) (Kiesecker *et al.*, 1996), y por otro, pueden detectar claves químicas liberadas por otros renacuajos a modo de señales de alarma (Kiesecker *et al.*, 1999; Mirza *et al.*, 2006; Gonzalo *et al.*, 2007; Fraker *et al.*, 2009). La respuesta a señales de alarma liberadas por coespecíficos pareciera ser innata en los renacuajos, ya que animales nacidos en cautiverio responden

---

<sup>1</sup> Las kairomonas son moléculas liberadas por un organismo que benefician a individuos de otra especie que la detectan, sin beneficiar (o incluso perjudicando) al emisor. Este tipo de señales son comúnmente empleadas en las interacciones interespecíficas de predadores y presas.

sin haber experimentado nunca un riesgo de predación, mientras que la detección de predadores pareciera ser, al menos en algunos casos, aprendida al experimentar simultáneamente claves químicas del predador y señales de alarma de otros renacuajos (Mirza *et al.*, 2006; Gonzalo *et al.*, 2007; Gonzalo *et al.*, 2009).

Como estas señales de alarma liberadas por los renacuajos evocan respuestas comportamentales antipredatorias de manera especie-específica (Hews y Blaustein, 1985; Hews, 1988; Lefcort y Eiger, 1993; Summey y Mathis, 1998), muchos autores hablan de la liberación de feromonas de alarma (Summey y Mathis, 1998; Rajchard, 2006; Hagman y Shine, 2009), aunque la diversidad de especies utilizada en estos trabajos es, por lo general, acotada y las distancias filogenéticas entre ellas considerablemente grandes.

La naturaleza química y el origen de síntesis de estas señales de alarma han sido muy poco estudiados en renacuajos y los pocos datos disponibles han dado origen a controversias. Recientemente, se ha caracterizado una feromona de alarma en renacuajos de la especie *Rana sylvatica*. Esta feromona parece consistir en dos pequeños péptidos que son liberados activamente por células epidérmicas durante un encuentro con un predador y actúan conjuntamente para evocar la respuesta antipredatoria en renacuajos coespecíficos (Fraker *et al.*, 2009). Otros autores han demostrado que cuando los renacuajos de *Rana aurora* son “molestados” simulando un evento de predación, estos liberan amonio el cual actúa como señal de alarma para otros renacuajos coespecíficos (Kiesecker *et al.*, 1999). Los autores proponen al amonio como feromona de alarma en renacuajos de esta especie. Sin embargo, el amonio es el principal producto de desecho metabólico en muchas especies acuáticas y de hecho la liberación de este compuesto es utilizada también como señal de alarma por varias especies animales incluyendo crustáceos y peces (Hazlett, 1989; Chivers y Smith, 1998; Weber *et al.*, 2012).

Como se observó en renacuajos de *R. sylvatica*, las señales de alarma pueden ser liberadas activamente como parte de un mecanismo anti-predatorio

(Fraker *et al.*, 2009). Aunque en la mayoría de los casos se cree que estas señales son liberadas involuntariamente como resultado del daño de tejidos provocado durante el encuentro con un predador, o incluso en los restos de presas no digeridos liberados en los desechos del predador (Chivers y Smith, 1998).

Llamativamente, aunque este fenómeno de comunicación social por señales químicas de alarma en renacuajos es conocido desde hace mucho tiempo y ha sido registrado en muchas especies (Pfeiffer, 1966; Hews y Blaustein, 1985; Hoff *et al.*, 1999), muy poco se ha estudiado por fuera de los límites de los enfoques puramente ecológicos o comportamentales y nunca se ha realizado un análisis integral del tema, en el cuál se evalúe que órgano o sistema sensorial es el que participa en la detección de estos estímulos.

## OBJETIVOS

Siguiendo con los objetivos generales según se delinearan al comienzo de la tesis, en este capítulo nos hemos propuesto evaluar la participación del EO y el OVN en la detección de estímulos específicos.

Para ello hemos elegido analizar dos aspectos bien diferentes de la vida de los renacuajos. Por un lado, la respuesta a un estímulo relacionado con la detección de fuentes de alimento, y por otro la respuesta a un estímulo relacionado a la comunicación social (señales de alarma que codifican un riesgo de predación).

Como estos estímulos han sido muy poco o nada estudiados en *Rhinella arenarum*, los primeros objetivos específicos de este capítulo están orientados a explorar aspectos básicos como la existencia de este tipo de estímulos en esta especie y la caracterización de las respuestas comportamentales a dichos estímulos.

Los objetivos planteados fueron los siguientes:

- ✓ Evaluar la importancia de claves químicas y visuales en la detección de fuentes de alimento en renacuajos de *R. arenarum*.
- ✓ Analizar si existen señales de alarma que disparen comportamientos antipredatorios en *R. arenarum*.
- ✓ Caracterizar la respuesta comportamental de larvas de *R. arenarum* ante estímulos químicos de alimento y de alarma.
- ✓ Evaluar la participación del OVN y el EO en la detección de estos estímulos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Animales***

En esta parte de la tesis hemos utilizado larvas de *Rhinella arenarum*<sup>2</sup> como modelo de estudio. Esto obedece fundamentalmente a dos motivos: Primero, gran parte del repertorio comportamental mediado por detección de claves químicas, conocido en renacuajos, ha sido descrito en larvas de bufónidos, lo cual hace pensar que seguramente las larvas de *R. arenarum* también tengan, si no todas, una buena parte de estas capacidades quimiosensoriales. Segundo, la puesta a punto de metodologías nuevas y complejas, completamente desconocidas para el laboratorio, como los ensayos comportamentales y la ablación de los órganos quimiosensoriales, hicieron prever que un gran número de animales iba a ser requerido. En este sentido, si bien hemos logrado reproducir artificialmente y obtener renacuajos de varias especies de anuros durante el transcurso de esta tesis, lo cierto es que para ninguna especie contamos con un protocolo tan estandarizado, reproducible y exitoso de reproducción y cría como el que se ha logrado para *R. arenarum* a lo largo de muchos años de trabajo con esta especie.

### ***Obtención de los estímulos***

**Estímulo de alarma.** Se tomaron 12 renacuajos de *R. arenarum* (en estadio G34-37, biomasa=1,925 g), se anestesiaron en MS222 y se homogeneizaron enteros (quitando el intestino) en 2 ml de agua deionada utilizando un potter de homogenización con émbolo de teflón. Los animales y el homogenato fueron manipulados en hielo todo el tiempo. El intestino se quitó

---

<sup>2</sup> En realidad, durante la puesta a punto de los ensayos comportamentales también se utilizaron larvas de *Hypsiboas pulchellus* y *Xenopus laevis*. Ninguna de las dos especies parecieron promisorias para utilizarse como modelos en este capítulo. Las larvas de *X. laevis* no parecieran detectar señales de alarma en homogenatos de coespecíficos, o al menos no encontramos un patrón claro de respuesta. Por su parte, las larvas de *H. pulchellus* se mostraban muy poco activas todo el tiempo, ya sea durante los ensayos o en sus estanques de cría. Éstas no respondían a ningún estímulo salvo cuando se las tocaba y salían nadando vigorosamente (esto seguramente se deba a que estas larvas son más activas durante la noche). Nada de esto fue incluido en esta tesis debido a que estos datos, al igual que otros, se perdieron durante un robo sufrido en el laboratorio.



para evitar mantener restos de comida parcialmente digerida en la solución resultante. Luego de homogeneizados, se agregó agua a las muestras hasta completar un volumen de 20 ml. La solución obtenida se centrifugó a 5000g durante 5 minutos para remover las partículas en suspensión y se recuperó el sobrenadante que fue congelado a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso (concentración final=0,1 g/ml; solución madre 1:1). Esta solución madre (1:1) fue utilizada en todos los experimentos salvo en el experimento de umbral de sensibilidad para el cual se crearon diluciones seriadas de 1:10, 1:100 y 1:1000 con agregado de agua de clorada a la solución madre. Se realizaron también homogenatos de larvas de otras especies (*R. fernandezae* y *H. pulchellus*) siguiendo el mismo protocolo y manteniendo constante la concentración de “masa de renacuajo/volumen de agua” en  $\sim 0,1$ g/ml.

**Estímulo de alimento.** Este estímulo se obtuvo a partir de la suspensión resultante en el agua luego de hervir acelga con la que se alimenta a los animales en condiciones de cautiverio. Para controlar y estandarizar la concentración de estímulo utilizado en los diferentes ensayos el mismo se preparó hirviendo 200 g de acelga (sólo la parte de la hoja) en 200 ml de agua durante 15 minutos en microondas a 900 Watts. El agua resultante de este proceso se filtró para remover partículas pequeñas en suspensión y se guardó a  $-20^{\circ}$  C. Este líquido fue utilizado como estímulo químico de alimento. Además, se armaron pequeños paquetes de 2 g de acelga hervida para utilizarlos como estímulo visual de alimento.

### ***Diseño experimental***

Todas las pruebas comportamentales se realizaron en un cuarto acondicionado para tal fin y en una franja horaria restringida de 10 a 14 hs para evitar posibles efectos circadianos sobre el comportamiento.

**Experimentos de actividad.** Se utilizaron peceras de vidrio rectangulares de 24 x 18 x 8 cm, conteniendo 1.5 L de agua de clorada a  $21^{\circ}$  C. El esquema de la figura 3.1 A resume las condiciones y el protocolo de estimulación utilizados. Cada sujeto experimental fue testeado sólo una vez y

de forma individual. Al momento del testeo, los renacuajos (estadio G34-37) fueron transferidos desde su estanque de cría a la arena experimental donde se les permitió aclimatarse durante 10-15 min. Luego de este tiempo de aclimatación comenzó a registrarse con una cámara de video digital suspendida 50 cm por encima de la pecera. Cada ensayo tuvo una duración de 12 min. y consistió en un período de 6 min. pre- y 6 min. post-estímulo. El agregado de los diferentes estímulos (2 ml de homogenato de animales coespecíficos o heteroespecíficos) o control (agua declorada) se realizó con pipeta Pasteur durante un lapso temporal de 10 seg., comenzando en los últimos 5 seg. De los 6 min. pre-estímulo. La pipeta fue posicionada a 45° para evitar hacer sombra sobre la pecera y con la punta apenas tocando la superficie del agua. La liberación del estímulo fue continua (a una tasa aproximada de 200  $\mu$ l/seg.) y recorriendo suavemente la longitud de la arena para maximizar su difusión. Ensayos realizados con azul de metileno mostraron que los 2 ml de solución agregados de esta manera demoran aproximadamente 5-10 segundos en distribuirse por toda la arena.

De los videos registrados se cronometró la cantidad de tiempo que los animales permanecieron activos (en movimiento) durante los 6 min. pre y post agregado del estímulo. Con estos datos se calculó la variable “cambio en los niveles de actividad” (tiempo activo post-estímulo menos tiempo activo pre-estímulo) la cual se utilizó para comparar los diferentes grupos.

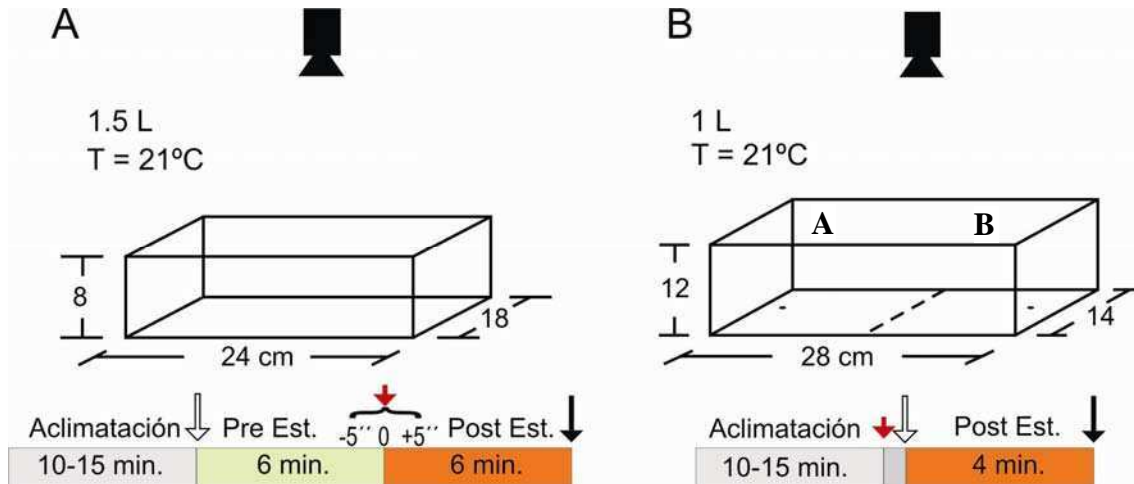
**Experimentos de elección-evitación.** En este caso se utilizaron peceras de vidrio rectangulares de 28 x 14 x 12 cm conteniendo 1 L de agua declorada a 21°C. El esquema de la figura 3.1 B resume las condiciones y el protocolo de estimulación utilizados. Se trazó una línea media perpendicular al eje mayor dividiendo las peceras en dos zonas iguales (Zonas A y B). Cada animal fue aclimatado durante 10-15 min., luego se agregó el estímulo correspondiente (ya sea de alarma o de alimento) e inmediatamente después comenzó a registrarse en video durante 4 min. Los animales testeados con estímulos de alimento (ya sea químico o visual) fueron hambreados

previamente, quitándoles la comida de sus estanques de cría el día anterior al ensayo.

Agregado del estímulo: se descargó 400 $\mu$ l de solución durante un lapso de 4 segundos (tasa de descarga aproximada de 100  $\mu$ l/seg.) utilizando una pipeta automática posicionada perpendicularmente a la superficie del agua. El estímulo fue asignado aleatoriamente a la zona A o B y se descargó siempre sobre un punto fijo situado en la línea media longitudinal y a 3 cm de distancia del borde terminal. En todos los casos se descargó, simultáneamente al estímulo, solución control (400  $\mu$ l de agua) en el punto fijo de la zona opuesta. Ensayos realizados con colorantes mostraron que los 400 $\mu$ l de solución descargados en los puntos fijos y en las condiciones mencionadas demoran 6 min. o más en alcanzar la línea media que delimita las zonas A y B. Además, se realizó un control para evaluar si los animales mostraban preferencia por alguna zona debida a factores no controlados. Para ello se agregó agua en los puntos fijos de ambas zonas (A y B) siguiendo las condiciones descriptas más arriba.

Para evaluar si otros sistemas sensoriales como el visual participan en la detección y/o localización de fuentes de alimento se realizó otra serie de experimentos: Se colocaron dos recipientes cilíndricos (radio = 1.8 cm, altura 9 cm) de vidrio transparente en los puntos fijos de las zonas A y B (aquellos en donde se “sembraban” los estímulos químicos en el experimento anterior), estos recipientes permiten la detección de claves visuales pero no permiten el intercambio de moléculas. Los cilindros se cargaron con agua hasta alcanzar el nivel de la pecera. Cada animal se aclimato durante 10-15 min., luego se agregó 2 g de acelga dentro de uno de los cilindros elegido al azar y se registró en video durante 4 min.

De todos los videos obtenidos se cuantifico el tiempo que los animales permanecieron en las zonas A y B así como el número de cruces por la línea media.



**Figura 3.1:** Diseño de la arena experimental, condiciones y protocolo de estimulación y registro de los experimentos de actividad (A) y elección-evitación (B) ante diferentes estímulos. Flechas blanca y negra: comienzo y fin de la filmación, respectivamente. Flecha roja: agregado del estímulo.

### ***Ablación del OVN y el EO***

Los animales (larvas de *R. arenarum* en estadio G35-36) fueron anestesiados en 0.1% de MS222 y transferidos a una cámara húmeda. La cámara se mantuvo todo el tiempo apoyada sobre un refrigerante y bajo microscopio estereoscópico se procedió a la ablación bilateral de los órganos quimiosensoriales.

**OVN.** A diferencia de otras especies, los renacuajos de *R. arenarum* presentan una pigmentación dérmica muy abundante, mayoritariamente compuesta por melanina, que dificulta la observación de estructuras internas en animales intactos. Sin embargo, los epitelios olfatorios (OVN y EO) también presentan pigmento en el conectivo subyacente haciendo que el área donde estos se encuentran (zona anterior, medial y caudal a la narina externa) luzca aún mas oscura que el resto del cuerpo (Fig. 3.2 A). Sumado a esto, los conocimientos anatómicos que se han adquirido de esta especie, producto de su utilización como modelo experimental en el laboratorio, nos permitió remover quirúrgicamente el OVN aún cuando éste no puede ser observado directamente en el momento de la intervención.

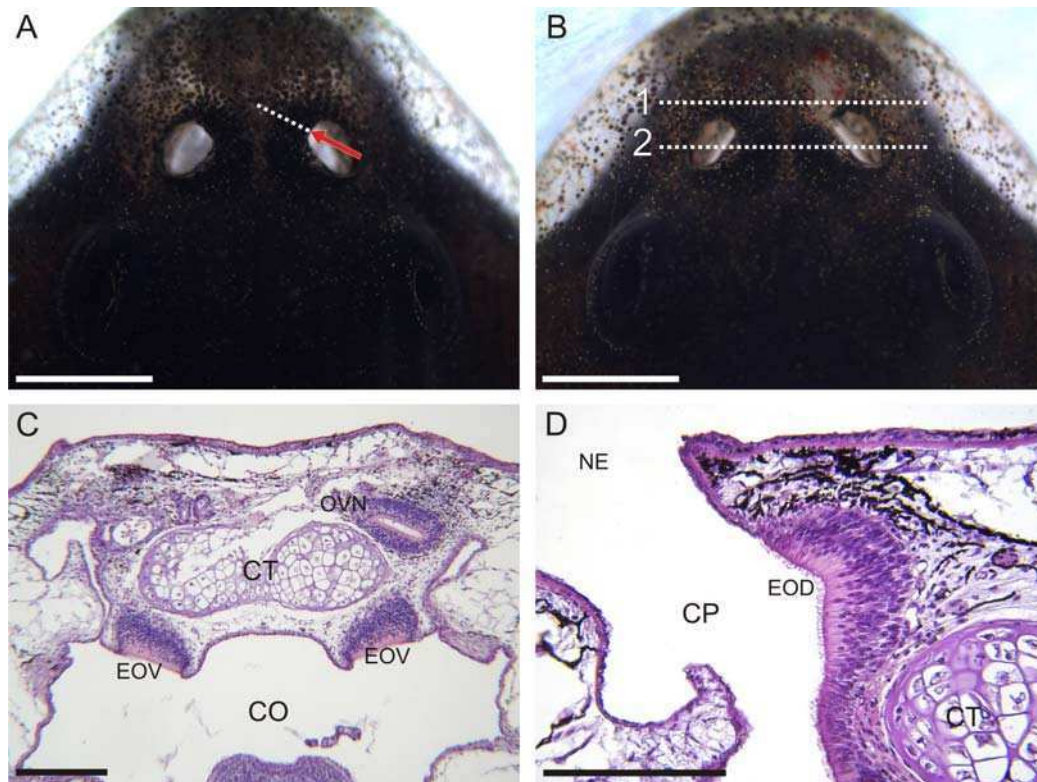
Para ello se utilizaron agujas de jeringas de tuberculina como micro cuchillas. Accediendo por la narina externa (NE), la aguja fue introducida en dirección rostromedial entre la epidermis y los cuernos trabeculares a la altura del borde anterior de la NE (Fig. 3.2 A). En esta zona se encuentra el borde anterior del EO y el extremo caudal del OVN. La aguja se movió repetidamente en sentido vertical y luego desplazándola unos milímetros hacia rostral, tratando de romper la conexión del OVN. Luego se aspiró la zona pigmentada rostral al área intervenida, utilizando una pipeta Pasteur de vidrio estirada para reducir el diámetro de la punta y conectada a una manguera de bajo calibre (OVN; Fig. 3.2 B). Los cortes histológicos de animales ablacionados unilateralmente mostraron que el OVN es removido sin causar mayores daños en el EO (Fig. 3.2 C y D).

**EO + OVN.** Debido a su organización anatómica no es posible ablacionar completamente el EO sin dañar al OVN, por lo tanto ambos órganos sensoriales fueron removidos en este grupo experimental. En este caso se utilizaron agujas de acero afiladas manualmente (por desgaste sobre piedra) montadas sobre un mandríl el cual, a su vez, fue atornillado a un soldador de estaño. Accediendo a través de la NE, esta herramienta nos permitió cauterizar la región nasal al mismo tiempo que los epitelios quimiosensoriales eran raspados.

Luego de la intervención, los animales fueron transferidos a recipientes individuales con solución de Ringer estéril para anfibios y se los dejó recuperarse por 48hs. en un sitio aislado sin ser molestados ni alimentados. La sobrevivencia a estas intervenciones es alta, superando el 90% en animales con ablación del OVN (OVNX) y entre el 80 y 90% para animales en que se ablacionaron tanto el EO como el OVN (EOX).

Luego de transcurrido el tiempo de recuperación, y antes de someterlos a las pruebas comportamentales, los animales fueron controlados durante unos 15 a 20 min., a fin de constatar que presentaran un comportamiento "normal" (se observó el nivel de actividad de los mismos). Los animales que no realizaron ningún tipo de movimiento durante este tiempo fueron excluidos de los

posteriores ensayos. Además, al terminar la prueba comportamental cada animal fue fijado y procesado para histología a fin de corroborar la correcta y total ablación de el o los órganos sensoriales correspondientes.



**Figura 3.2:** Ablación unilateral del OVN en *R. arenarum*. **A.** Vista dorsal de la región cefálica. La flecha roja y la línea punteada muestran el punto de entrada y corte de la microcuchilla, respectivamente. **B.** Vista dorsal del animal mostrado en A luego del corte y aspirado del OVN. **C y D** muestran preparados histológicos (H-E) de cortes transversales a las alturas 1 y 2 señaladas en B, respectivamente. Nótese que el OVN es removido exitosamente sin dañar el EO localizado más caudalmente. Barras: 1 mm en A y B, 200 $\mu$ m en C y D.

### ***Cuantificación de neuronas quimiosensoriales activadas utilizando incorporación de Agmatina (AGB)***

La agmatina (1-amino-4-guanidobutano o AGB) es un análogo de la guanidina que atraviesa canales catiónicos de manera no selectiva durante la activación neuronal (Marc, 1999). Esta molécula puede ser inmunodetectada

utilizando anticuerpos específicos, permitiendo así la visualización de neuronas individuales que hayan respondido a un estímulo determinado. Esta metodología ya ha sido previamente utilizada para demostrar el marcado de neuronas quimiosensoriales estimuladas con olores tanto en vertebrados como invertebrados (Michel *et al.*, 1999; Wirsig-Wiechmann *et al.*, 2002).

Se utilizaron las siguientes soluciones: estímulo de alimento, estímulo de alarma (homogenato de *R. arenarum*) o control (agua deionada). Cada una de estas soluciones fue mezclada 1:1 con AGB 6mM disuelto en PBS, dando una concentración final de AGB 3mM. Los animales (G35-37) fueron anestesiados y colocados en una cámara húmeda bajo lupa. Se secó cuidadosamente el exceso de agua de las cavidades nasales y se descargaron 0.5 µl de solución sobre cada narina utilizando una pipeta automática; se esperó 1 min. y luego se lavó cada narina con 5 µl de PBS. Este proceso se repitió 5 veces y luego se transfirió a los renacuajos a recipientes individuales. Al día siguiente se fijó<sup>3</sup> a los animales y se los procesó para inmunohistoquímica. La inmunodetección de AGB<sup>4</sup> se realizó siguiendo el protocolo general descrito en el capítulo II.

### ***Análisis estadísticos***

Los experimentos en que se analiza actividad (cruces por línea media) y cambio de actividad (tiempo en movimiento pre-estímulo menos post-estímulo) fueron analizados mediante un test de t o análisis de varianza (ANOVA) de un factor seguido de pruebas *post-hoc* de Tukey, según correspondiera de acuerdo al número de grupos comparados. En el caso de los experimentos de actividad (cruce por línea media) en que los datos fueron discriminados durante los diferentes tiempos del ensayo se realizó un ANOVA de medidas repetidas. Para los experimentos de elección-evitación se realizaron pruebas de t pareadas. Todos los datos reunieron los supuestos para el análisis paramétrico (normalidad y homogeneidad de varianzas) y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p fue menor a 0.05. El número de replicas o sujetos experimentales utilizados para cada experimento se detalla en

---

<sup>3</sup> 70% solución saturada de ácido pícrico, 27,5% formol, 2,5% glutaraldehido

<sup>4</sup> Anti-AGB (conejo). Dilución: 1/500

los epígrafes de los gráficos correspondientes. En todos los casos se grafican las medias  $\pm$  error estándar. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat.



## RESULTADOS

### **Caracterización de las respuestas comportamentales ante diferentes estímulos químicos presentes en el agua**

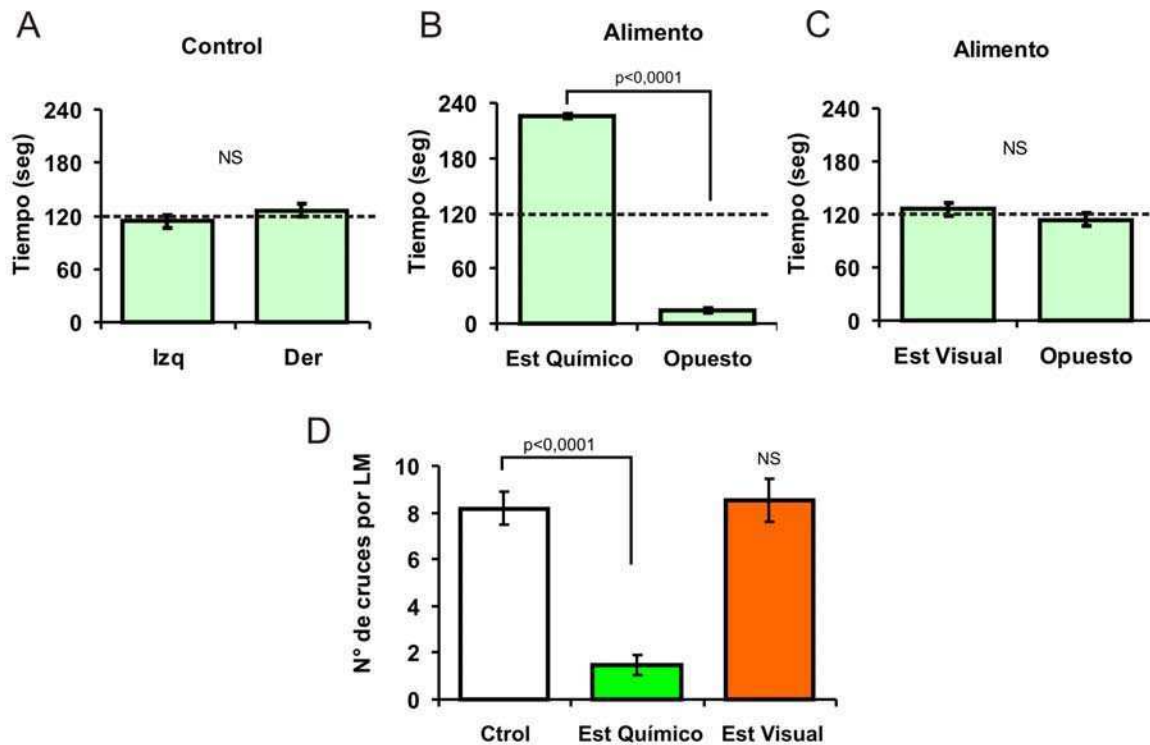
#### ***Estímulo de alimento.***

La respuesta comportamental de larvas de *R. arenarum* ante la presencia de alimento es bien conocida en nuestro laboratorio debido a que esta especie es utilizada desde hace ya muchos años como modelo experimental y todos participamos activamente de su cría y mantenimiento. Al introducir el alimento (trozos de acelga hervida) en los estanques de cría se observa que, a los pocos segundos, los animales comienzan a manifestar un comportamiento estereotipado que no se corresponde con ninguna otra actividad. Este comportamiento consiste en ramonear el sustrato (usualmente el fondo del estanque, pero también pueden ser los laterales) protruyendo los dientes y pico córneo que forman parte del aparato oral de estos renacuajos. Este ramoneo produce un balanceo vertical de la porción anterior del cuerpo, al tiempo que la cola se agita suavemente. Mientras realizan estos movimientos, los animales suelen desplazarse unos pocos milímetros, ya sea hacia delante, hacia atrás o hacia los laterales, sin dejar de ramonear. Eventualmente, luego de unos segundos de realizar esta actividad, si los animales no encuentran la fuente de alimento detienen este comportamiento, se desplazan unos centímetros y retoman la actividad de ramoneo. Esta alternancia entre ramoneo y pequeños desplazamientos se repite hasta que el animal encuentra la fuente de alimento.

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que este comportamiento es desencadenado por la detección de señales químicas pero, estrictamente, no se han diseñado experimentos que analicen la participación de otras vías sensoriales en la detección y localización de alimento. Con el fin de evaluar la importancia relativa que pudieran tener las distintas vías

sensoriales en la detección de alimento y obtener datos cuantitativos a partir de pruebas comportamentales hemos realizado los experimentos de elección-evitación cuyos resultados se resumen en la figura 3.3.

Los animales sometidos a estímulo control (agua) no mostraron preferencia por ninguna zona en particular de la arena experimental (Fig 3.3 A), demostrando que los factores externos fueron bien controlados durante los experimentos. La actividad exploratoria de los animales control fue bastante alta con un promedio de  $8.16 \pm 0.7$  cruces por la línea media (CxLM) durante los 4 min. de testeo (Fig 3.3 D). Cuando agregamos el estímulo químico de alimento los animales pasaron mucho mas tiempo en la zona donde el estímulo fue sembrado ( $226.05 \pm 3.6$  seg. De los 240 seg totales de registro; Fig 3.3 B). En cambio, con el estímulo visual de alimento, los animales se comportaron igual que los animales controles, sin mostrar preferencia por ninguna zona en particular de la arena experimental (Fig 3.3 C) y alcanzando los mismos niveles de actividad ( $8.5 \pm 0.9$  CxLM; Fig 3.3 D). Por su parte, los animales con estímulo químico presentaron una actividad exploratoria significativamente menor al control ( $1.5 \pm 0.4$  CxLM; Fig. 3.3 D). Esto se debió a que una vez que los renacuajos entraron a la zona sembrada con el estímulo se disparó el comportamiento de ramoneo y ya no volvieron a salir de ella.



**Figura 3.3:** Experimentos de elección-evitación frente a estímulos de alimento. **A.** Control: Se grafica el tiempo que los animales pasan en cada zona (izquierda y derecha) de la arena experimental, cuando en ambas zonas se siembra agua deionada (N=6). **B.** Estímulo químico: se grafica el tiempo que los animales pasan en la zona sembrada con el estímulo químico de alimento (Est Químico) y el tiempo que pasan en la zona sembrada con agua (Opuesto; N=6). **C.** Idem B pero con estímulo visual de alimento (N=6). **D.** Cruces por línea media de los tres grupos experimentales (N=18). NS: diferencias no significativas.

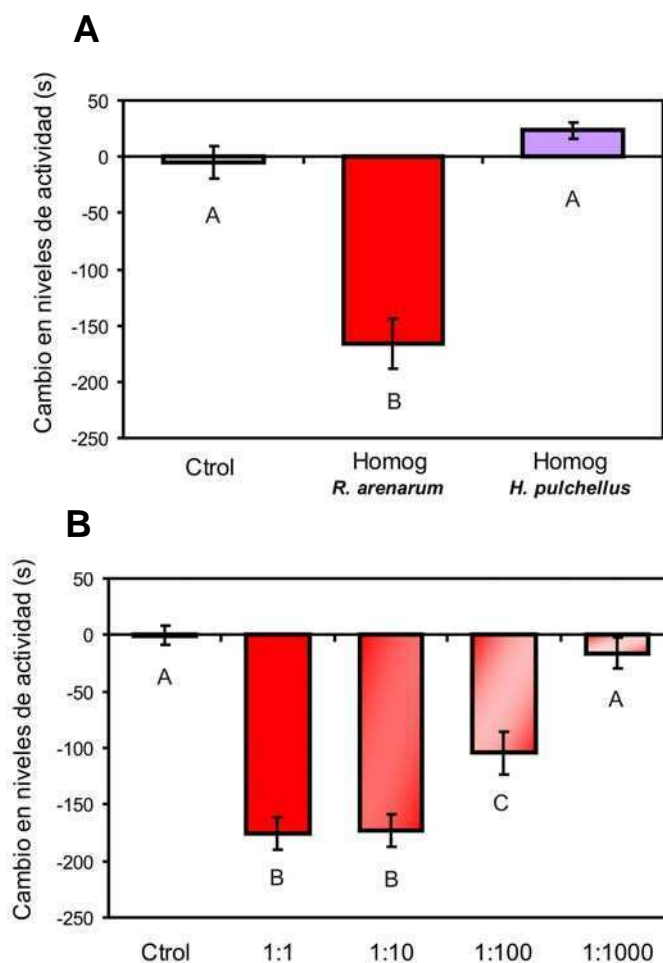
### ***Estímulo de alarma.***

#### ***Experimentos de actividad.***

Los experimentos comportamentales mostraron que las larvas de *R. arenarum* disminuyeron significativamente sus niveles de actividad cuando fueron expuestas a homogenatos de renacuajos coespecíficos (Fig. 3.4 A). La disminución de los niveles de actividad es una típica respuesta antipredatoria en larvas de anuros (Kiesecker *et al.*, 1996; Chivers y Mirza, 2001), lo cual demuestra que los renacuajos detectaron en este homogenato alguna señal que les indicó un riesgo de predación (señal de alarma). Esta respuesta antipredatoria no se manifestó cuando las larvas fueron expuestas a

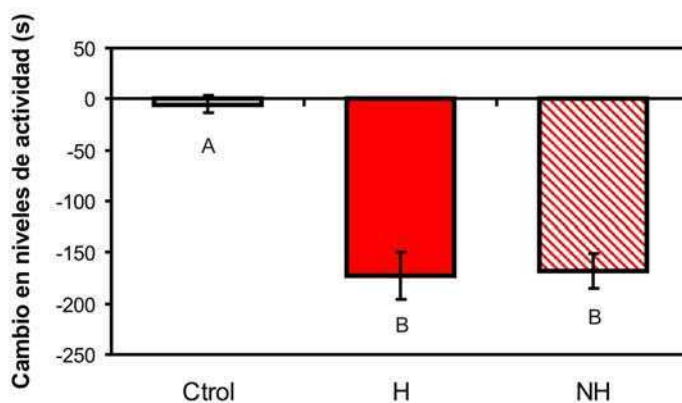
homogenatos de renacuajos heteroespecíficos de la especie *H. pulchellus* (Fig. 3.4 A). Es más, aunque las diferencias resultaron no significativa, las larvas estuvieron un poco más activas al exponerlas al homogenato de *H. pulchellus*. Gran parte de esta actividad se debió a que este homogenato disparó un comportamiento de ramoneo en los renacuajos de *R. arenarum*.

Para caracterizar un poco mejor la respuesta antipredatoria ante señales de alarma en *R. arenarum* y conocer cual es el umbral mínimo de detección realizamos experimentos con diluciones sucesivas del homogenato original (1:1) cuyos resultados se muestran en la figura 3.4 B. Los animales expuestos a homogenato diluido 10 veces presentaron los mismos niveles de reducción de actividad que los expuestos a homogenato original, los expuestos a la dilución 1:100 reducen parcialmente su actividad, mientras que los animales expuestos a homogenatos diluidos 1000 veces no difieren en sus niveles de actividad respecto al control (Fig 3.4 B).



**Figura 3.4: A.** Cambio en los niveles de actividad en renacuajos de *R. arenarum* expuestos a: agua de clorada (control), homogenato de renacuajos coespecíficos (Homog *R. arenarum*) y homogenatos de renacuajos heteroespecíficos (Homog *H. pulchellus*) (N= 18). **B.** Cambio en los niveles de actividad en renacuajos de *R. arenarum* expuestos a diluciones seriadas de homogenato de renacuajos coespecíficos (N= 35). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Un fenómeno bastante conocido entre larvas de anuros es el de “*kin recognition*”: los animales pueden reconocer mediante señales químicas a sus renacuajos hermanos, e incluso a los medio hermanos, es decir, aquellos renacuajos con los que comparten solo uno de los parentales (Waldman, 1985). Como el estímulo que hemos usado (homogenato de renacuajos enteros) es un estímulo complejo, quisimos descartar que la respuesta antipredatoria ante homogenatos coespecíficos no se deba, en realidad, a la detección simultánea de productos de desecho generales (como amonio) junto con claves químicas que indiquen parentesco, como las empleadas en el reconocimiento de hermanos. Para ello realizamos un experimento de actividad frente a homogenatos de coespecíficos pero utilizando diferentes camadas de animales no emparentados. Los resultados, resumidos en la figura 3.5, demostraron que las larvas de *R. arenarum* disminuyeron sus niveles de actividad independientemente de si el homogenato es o no realizado con animales emparentados.



**Figura 3.5:** Cambio en los niveles de actividad de renacuajos de *R. arenarum* expuestos a: agua (control), homogenato de hermanos (H) y homogenato de no hermanos (NH) (N=12). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

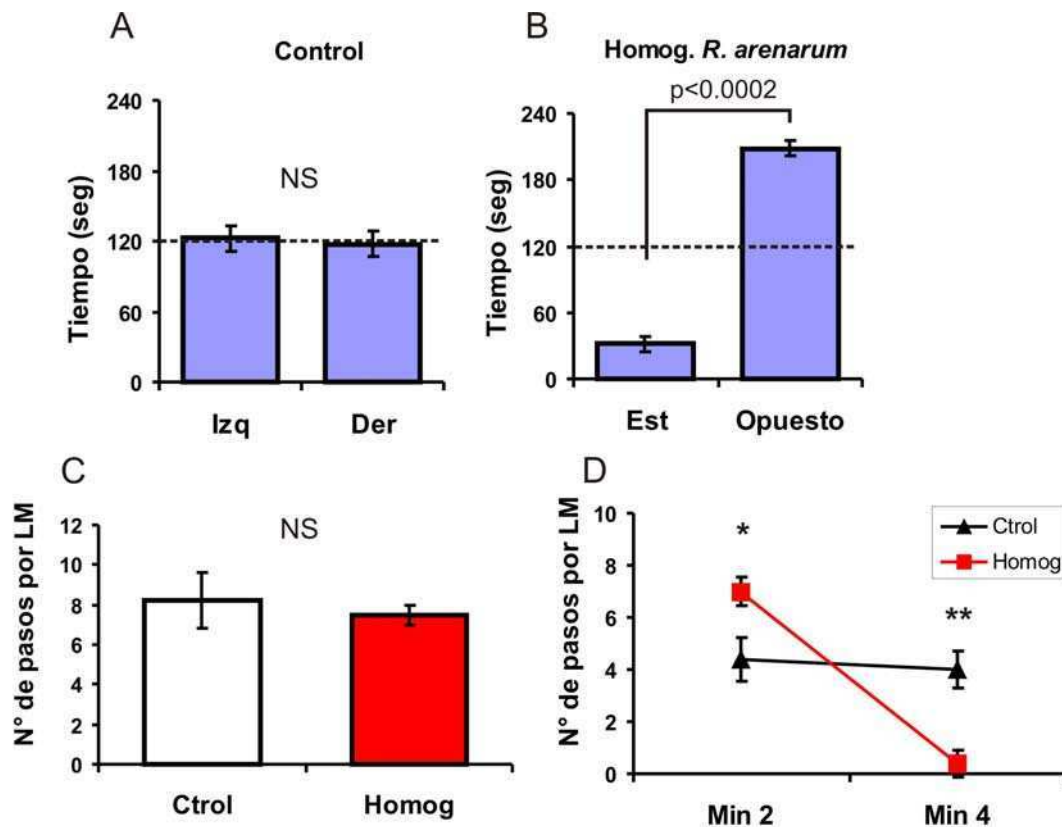
Si bien en todos los casos en que las larvas de *R. arenarum* respondieron a señales de alarma (ya sea con homogenatos de hermanos, no hermanos o diluidos) la disminución en los niveles de actividad fue muy evidente, un análisis más detallado de los videos registrados en los ensayos reveló que la respuesta comportamental parece ser un poco más compleja. Durante los primeros segundos de exposición al estímulo las larvas presentaron arranques

“explosivos” de actividad locomotora natatoria, que a simple vista superaba la velocidad de nado normal. Durante estos nados las larvas solían recorrer varias veces la totalidad de la pecera y con frecuencia cambiaban bruscamente la dirección de desplazamiento. Estas observaciones nos llevó a plantear la necesidad de pensar en otro diseño experimental que nos permitiera analizar otros aspectos de las respuestas comportamentales ante señales de alarma en *R. arenarum*.

### ***Experimentos de elección-evitación.***

Los resultados de estos experimentos mostraron que cuando las larvas fueron expuestas a la señal de alarma restringida a una zona particular de la arena, las mismas evitaron esta zona pasando significativamente mucho más tiempo en el lado opuesto ( $208.2 \pm 6.6$  seg. De los 240 seg. Totales de registro; Fig. 3.6 B). El número de cruces por la línea media nos da una idea aproximada de la actividad exploratoria de los animales. Cuando se comparó esta variable entre animales expuestos al estímulo y animales expuestos a control, tomando el tiempo total que dura el ensayo, no se observaron diferencias entre ambos grupos ( $7.5 \pm 0.5$  y  $8.2 \pm 1.3$  CxLM, respectivamente; Fig. 3.6 C). Sin embargo, al igual que lo ocurrido con los experimentos de actividad, el comportamiento durante los primeros segundos de contacto con el estímulo de alarma fue muy diferente respecto a tiempos posteriores, por lo que se decidió analizar esta variable discriminando los primeros 2 minutos del ensayo de los 2 minutos finales del mismo.

Los animales controles registraron, en promedio, la misma cantidad de CxLM en los primeros y últimos 2 minutos del ensayo ( $4.4 \pm 0.8$  y  $4 \pm 0.7$  CxLM, respectivamente). En los animales expuestos al estímulo de alarma, en cambio, casi la totalidad de los CxLM se registraron en los primeros 2 minutos del ensayo ( $7 \pm 0.6$  CxLM; siendo significativamente más altos que el control); mientras que casi no hubo actividad durante los 2 últimos minutos ( $0.4 \pm 0.5$  CxLM; siendo significativamente mas baja que el control) (Fig. 3.6 D).

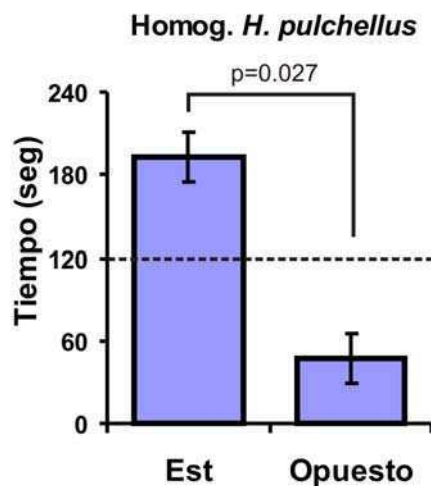


**Figura 3.6:** Experimentos de elección-evitación frente a señales de alarma. **A.** Control: se grafica el tiempo que los animales pasan en cada zona (izquierda y derecha) de la arena experimental, cuando en ambas zonas se siembra agua de clorada (N=5). **B.** Homogenato *R. arenarum*: se grafica el tiempo que los animales pasan en la zona sembrada con el estímulo químico de alarma (Est) y el tiempo que pasan en la zona sembrada con agua (Opuesto; N=5). **C.** Pasos totales por línea media (N= 10) en ambos grupos. **D.** Pasos por línea media en ambos grupos experimentales pero discriminando en: los 2 primeros y los 2 últimos minutos del experimento (Min 2 y Min 4, respectivamente). \*:  $p=0.0175$ , \*\*:  $p=0.0007$ .

En resumen, el comportamiento antipredatorio en larvas de *R. arenarum* disparado por señales de alarma presentes en homogenatos coespecíficos parece tener varios componentes: Ante el contacto inicial con el estímulo la primera respuesta parece ser de escape, los animales manifiestan una enérgica actividad locomotora de nado, cuyo objetivo sería salir lo antes posible de la zona de peligro. Luego de este comportamiento, los animales optan por permanecer en un lugar más seguro (evitan la zona donde el estímulo está

presente, o es más intenso) y finalmente detienen o reducen todo tipo de actividad locomotora.

Por otra parte, hemos analizado también mediante estos ensayos de elección-evitación la respuesta de *R. arenarum* ante homogenatos heteroespecíficos de *H. pulchellus*. Los resultados resumidos en la figura 3.7 básicamente corroboran lo observado previamente con los experimentos de actividad. Las larvas de *R. arenarum* pasaron significativamente más tiempo en la zona con homogenato de *H. pulchellus* (elijen la zona donde este estímulo esta presente; Fig. 3.7), en la cual exhibieron un claro comportamiento de ramoneo. Esto comprueba que, no sólo no detectan señales de alarma en estos homogenatos, sino que además los perciben como un posible alimento.



**Figura 3.7:** Experimentos de elección-evitación frente a estímulos provenientes de homogenatos heteroespecíficos de *H. pulchellus*. (N=4). Se grafica el tiempo que los animales pasan en la zona sembrada con homogenato de *H. pulchellus* (Est) y el tiempo que pasan en la zona sembrada con agua (Opuesto).



## **Participación del EO y el OVN en la detección de estímulos relacionados con la localización de fuentes de alimento o señales de alarma**

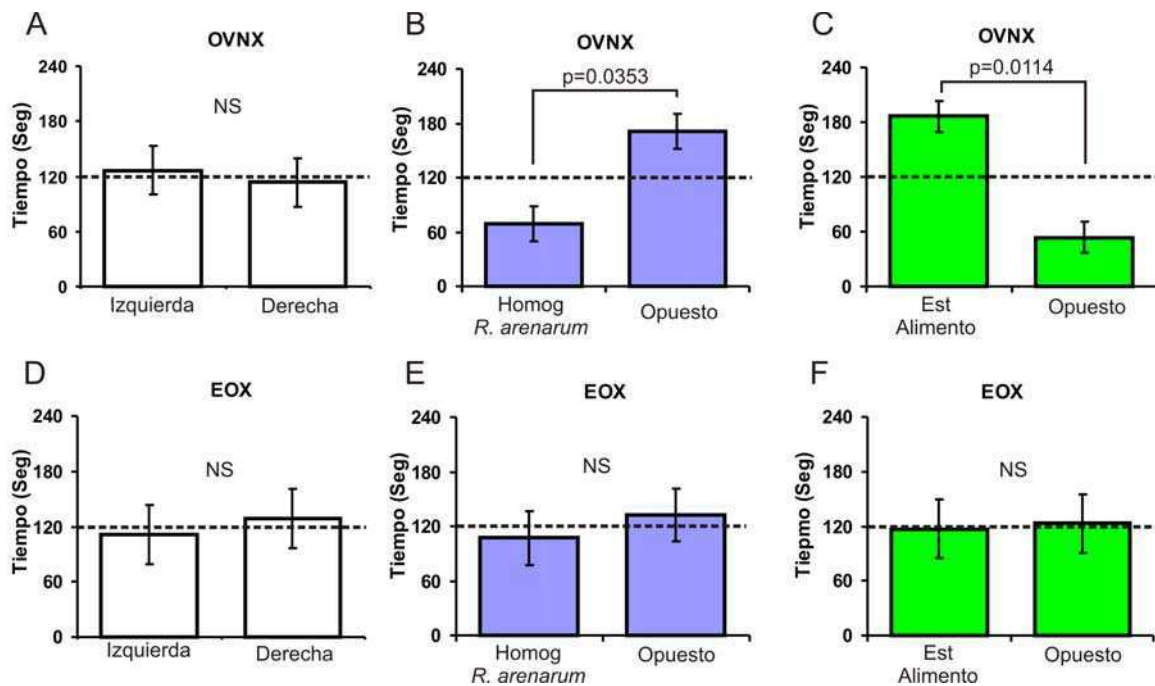
### ***Experimentos de elección-evitación realizados en animales ablacionados.***

Luego de realizar innumerables pruebas, con diversas metodologías, en decenas de animales, se logró ablacionar los órganos quimiosensoriales en larvas de *R. arenarum* de manera confiable y reproducible (para detalles metodológicos ver materiales y métodos en este capítulo). Esto nos permitió evaluar si las respuestas comportamentales disparadas por la detección de estímulos químicos se mantienen o desaparecen en ausencia de uno u otro órgano quimiosensorial, y, consecuentemente, dilucidar cuál o cuáles de estos órganos participa en la detección de estos estímulos.

Los animales ablacionados fueron analizados mediante las pruebas de elección-evitación por dos motivos fundamentales: Primero, porque esta prueba permite evaluar la respuesta tanto a estímulos de alarma como de alimento, lo cual simplifica el diseño experimental y análisis posterior; y segundo, porque el comportamiento de escape y evitación es la primer respuesta disparada ante señales de alarma (pareciera ser la primera opción de los animales), mientras que la disminución de la actividad (aunque es muy evidente) pareciera formar parte de un segundo componente de la respuesta antipredatoria.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se resumen en la figura 3.8. Tanto los animales sin OVN (OVNX) como sin EO ni OVN (EOX) pasaron la misma cantidad de tiempo en ambos lados de la arena experimental cuando fueron sometidos a estímulo control en ambas zonas (Fig. 3.8 A y D). Por su parte, cuando los animales OVNX fueron expuestos a estímulo de alarma, estos pasaron significativamente más tiempo en la zona opuesta al estímulo ( $170.9 \pm 18.8$  seg. de los 240 seg. totales de testeo; Fig. 3.8 B), mientras que los animales OVNX expuestos a estímulo de alimento pasaron significativamente

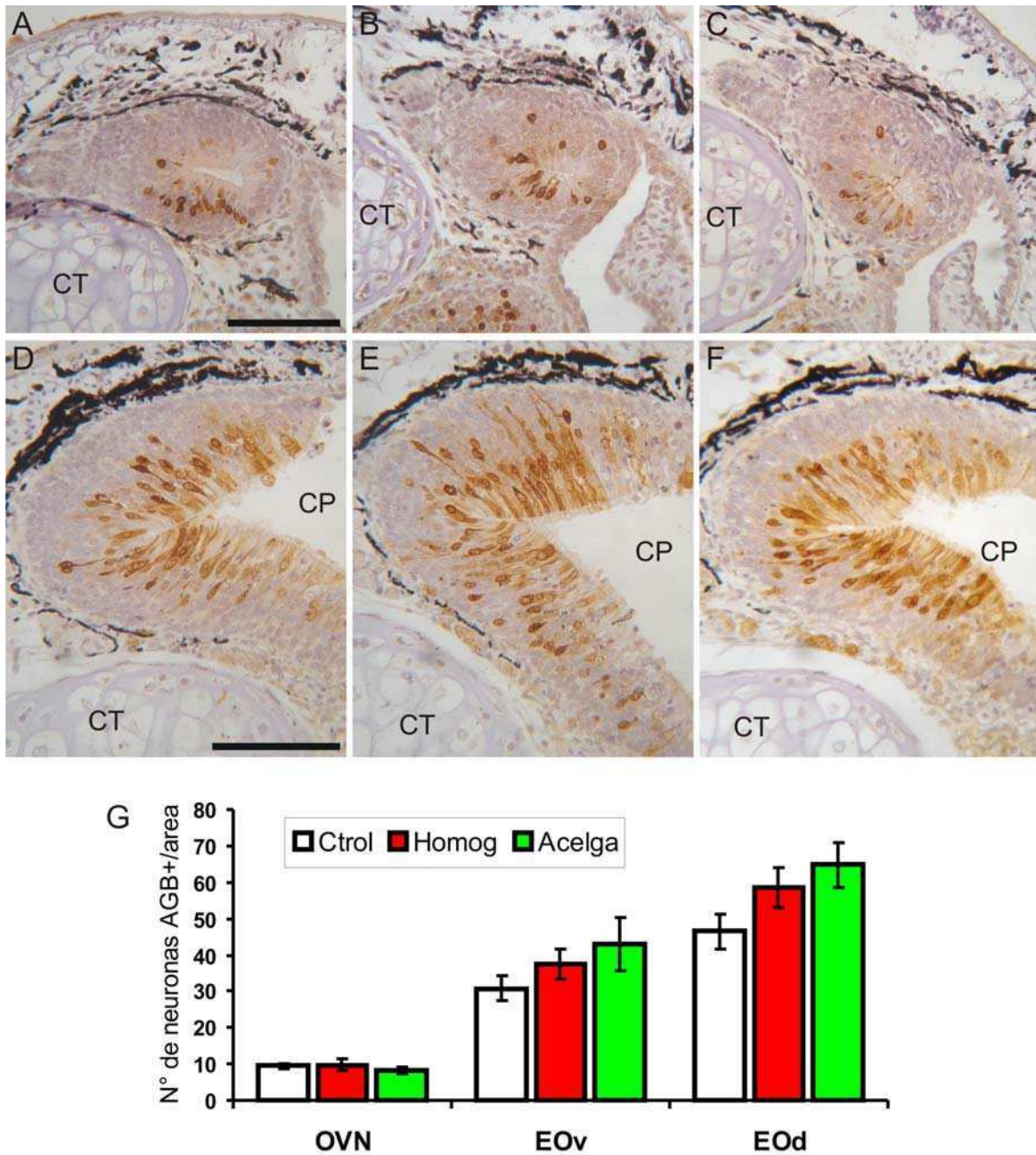
más tiempo en la zona del estímulo ( $186.16 \pm 16.9$  seg.; Fig. 3.8 C). Es decir que los animales OVNX mostraron un patrón de respuesta similar a animales no ablacionados. En cambio, cuando los animales EOX fueron expuestos tanto a estímulos de alarma como de alimento, estos pasaron, en promedio, la misma cantidad de tiempo en ambas zonas de la arena experimental, no mostrando preferencia por ninguna de ellas (Fig. 3.8 E y F).



**Figura 3.8:** Experimentos de elección-evitación en animales en que se ha ablacionado el OVN (OVNX; A, B y C) o el EO+OVN (EOX; D, E y F), expuestos a: control (A y D), homogenato de coespecificos (B y E) o estímulo de alimento (C y F). Cada grupo experimental se ha replicado 6 veces. NS: diferencias no significativas.

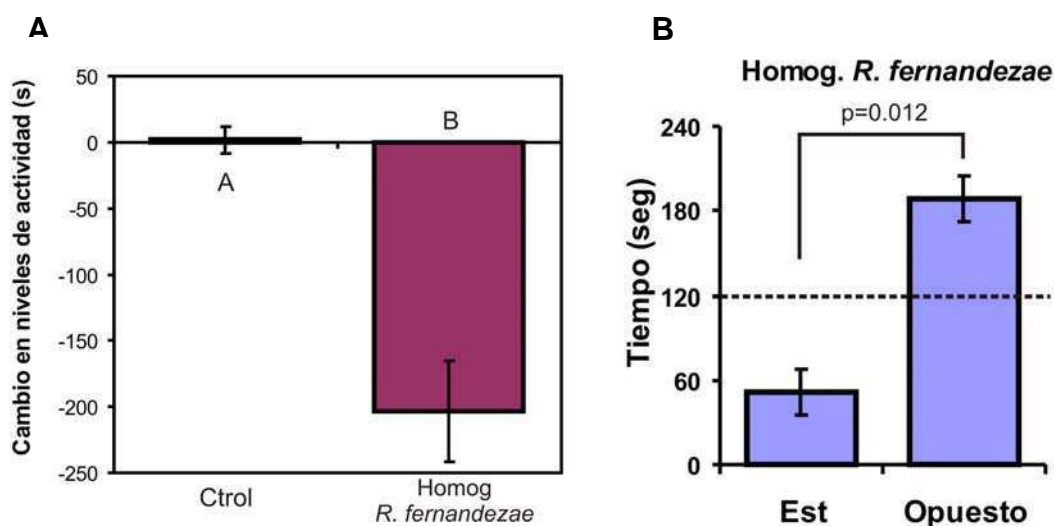
### ***Cuantificación de neuronas quimiosensoriales activadas utilizando incorporación de Agmatina (AGB)***

Los análisis realizados con AGB mostraron, en primera instancia, una cantidad considerable de neuronas marcadas (activadas) tanto en el OVN como en el EO de animales controles, expuestos solamente a AGB 3mM (Fig. 3.9 A, D y G). Este resultado inesperado probablemente obedezca a dos motivos: Primero, el AGB “*per se*” puede ser reconocido como estímulo por algunas neuronas (Michel *et al.*, 1999); y segundo, es probable que muchas neuronas sensoriales del OVN y el EO de *R. arcanrum* presenten actividad espontánea debida al activo crecimiento y desarrollo de las larvas, tal como se observa durante el desarrollo del sistema nervioso en general (Yates, 2012). En el OVN de los animales expuestos a estímulo de alimento y de alarma no se observó ninguna diferencia en el número de neuronas marcadas respecto al control (Fig. 3.9 A-C y G). Por su parte, tanto en la rama dorsal como ventral del EO se observó una aparente tendencia hacia el aumento en la cantidad de neuronas marcadas utilizando ambos estímulos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al control (Fig. 3.9 D-F y G). Seguramente, los altos niveles basales de neuronas activadas registrados con la técnica empleada impidieron ver una diferencia en los animales expuestos a los estímulos específicos.



**Figura 3.9:** Activación de neuronas quimiosensoriales en el OVN (A-C) y en el EO (D-F, se muestra sólo el EOd) medida por incorporación de AGB en respuesta a: control (A y D), homogenato de *R. arenarum* (B y E) o estímulo de alimento (C y F). El gráfico muestra los resultados de la cuantificación de neuronas AGB-ir en el OVN, la rama ventral del EO (EOv) y la rama dorsal del EO (EOd) para los distintos grupos experimentales (N=12). Barras: 100 $\mu$ m.

Hasta este punto entonces, la señal de alarma que dispara comportamientos antipredatorios en *R. arenarum* parece ser especie-específica, al igual que lo que se ha registrado en otros anuros (Hews y Blaustein, 1985; Hews, 1988; Lefcort y Eiger, 1993; Summey y Mathis, 1998), y además esta señal es detectada en el EO y no en el OVN de las larvas. Como existen algunas controversias en la actualidad respecto al tipo de estímulos que son detectados en el OVN o EO y los comportamientos que estos disparan en los animales (Baxi *et al.*, 2006), nos pareció que era necesario corroborar si efectivamente estamos en presencia de un fenómeno de comunicación intraespecífica mediado por posibles feromonas. Lo cierto es que *H. pulchellus* es una especie bastante lejana filogenéticamente de *R. arenarum* por lo cual decidimos investigar si los renacuajos de *R. arenarum* presentan esta respuesta antipredatoria cuando son expuestos a homogenatos de renacuajos de *Rhinella fernandezae*, un bufonido más cercanamente emparentado con *R. arenarum*. Los resultados mostraron que, al ser expuestas a homogenatos de *R. fernandezae*, las larvas de *R. arenarum* presentaron los mismos comportamientos antipredatorios que cuando son expuestas ante homogenatos coespecíficos. Es decir, redujeron significativamente sus niveles de actividad (Fig. 3.10 A) y evitaron la zona donde se aplicó el estímulo (Fig. 3.10 B).



**Figura 3.10:** **A.** Cambio en los niveles de actividad de renacuajos de *R. arenarum* expuestos a: agua de clorada (control) y homogenato de renacuajos de *Rhinella fernandezae* (Homog *R. fernandezae*) (N=10). Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.007$ ). **B.** Experimentos de elección-avoidance frente a estímulos provenientes de homogenatos heteroespecíficos de *R. fernandezae*. (N=5).

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La detección y localización de fuentes de alimento resulta fundamental para cualquier animal en casi todas las etapas de su ciclo de vida. En el presente capítulo hemos demostrado que las larvas de *R. arenarum* utilizan claves químicas para detectar posibles fuentes de alimento, mientras que los estímulos visuales no son relevantes en este comportamiento. Esto tiene su lógica si se observan las características de los microhábitats en que los renacuajos comúnmente se desarrollan. Estos ambientes suelen tener pobres condiciones de visibilidad debida a la turbidez del agua, la abundante vegetación, los sedimentos suspendidos y la baja luminosidad debida a la sombra que produce la vegetación. Además, se ha demostrado que los estímulos visuales en general tendrían poca importancia en la detección de objetos a gran distancia o con mucha precisión en renacuajos, ya que las características de sus lentes oculares y retinas indican que éstas producen, en el mejor de los casos, imágenes desenfocadas (Mathis *et al.*, 1988).

La utilización de claves químicas por sobre estímulos visuales en la detección y localización de fuentes de alimentos ha sido también demostrada en renacuajos de otras especies (Risser, 1914; Veeranagoudar *et al.*, 2004) y es probable que éste sea un fenómeno generalizado entre las larvas de anuros. De todas maneras creemos que posiblemente exista un componente multisensorial involucrado en la realización de esta tarea. Por ejemplo, en larvas de *R. arenarum*, observamos que las claves químicas disparan un comportamiento estereotipado de ramoneo, el cual se alterna con pequeños desplazamientos sin dirección determinada, hasta que eventualmente los animales dan con la fuente de alimento. Es probable entonces que el olfato les permita a los animales detectar la presencia de una posible fuente de alimento, mientras que la localización final de la misma estaría guiada tanto por claves químicas como táctiles.

Los experimentos de ablación y marcación de neuronas activadas demostraron que el EO pero no el OVN está involucrado en la detección de estímulos que indican la presencia de posibles fuentes de alimento. Este resultado, aunque parece trivial, no lo es en absoluto ya que, efectivamente, en otros animales el OVN está involucrado en la detección de fuentes de alimento. Por ejemplo, cuando se bloquea quirúrgicamente el acceso de estímulos químicos al OVN en la comadreja *Monodelphis domestica* los animales ya no son capaces de reconocer aquellos alimentos por los cuales mostraban preferencia antes de bloquear la entrada del OVN (Halpern *et al.*, 2005). Por otra parte, la detección de estímulos en el OVN es utilizada en comportamientos de forrajeo y localización de presas en salamandras (Placyk y Graves, 2002), lagartos (Graves y Halpern, 1990) y serpientes (Wang *et al.*, 1988; Alving y Kardong, 1996). En este último caso, una proteína de 20 kDa producida por los gusanos de tierra (presas comunes de la serpiente *Thamnophis sirtalis*) es detectada en el OVN de la serpiente, guiando al predador hacia su presa (Wang *et al.*, 1988).

Ahora bien, en nuestro caso ¿Cuál es la naturaleza química de las moléculas detectadas en la solución que se ha utilizado como estímulo de alimento? En varios animales acuáticos, tanto vertebrados como invertebrados, se ha demostrado que la detección de aminoácidos dispara comportamientos de alimentación y guía a los animales hacia las fuentes de alimento (Kiseleva, 1995; Hara, 2006; Keiichiro *et al.*, 2006; Ferrer y Zimmer, 2007). En la salamandra semiacuática *Taricha torosa* se ha demostrado que la detección de los aminoácidos: glicina, alanina y particularmente arginina (para el cual presenta una gran sensibilidad) informa a los animales de la presencia de gusanos (*Eisenia rosea*, de los cuales se alimenta) y dispara la búsqueda activa de las presas en cuestión (Ferrer y Zimmer, 2007). Por otra parte, en el caso particular de renacuajos, se ha observado en cuatro especies diferentes (*Rana temporaria*, *Rana lessonae*, *Bufo bufo* y *Pelobates fuscus*) que distintas soluciones compuestas por uno o varios aminoácidos disparan comportamientos de alimentación (ramoneo) en los animales (Kiseleva, 1995). En este sentido, estudios electrofisiológicos *ex vivo* realizados en *X. laevis*, permitieron

caracterizar los patrones de excitabilidad de neuronas sensoriales del EO al ser expuestas a varios aminoácidos, tanto aislados como combinados (Vogler y Schild, 1999). Aunque en este último caso el interés de los autores fue puesto en aspectos fisiológicos básicos del sistema sensorial y se desconoce la relevancia biológica natural que pudieran tener estos estímulos en *X. laevis*. Es probable entonces que, en nuestro caso, uno o varios aminoácidos sean liberados al agua durante la preparación del estímulo (es decir que se desprendan de la acelga durante el proceso de cocción) y sean estos los indicadores de la proximidad de una fuente de alimento para los renacuajos.

Por otra parte, en este capítulo se ha demostrado la existencia de señales de alarma en larvas de *R. arenarum*. Es decir, estímulos químicos presentes en homogenatos de otros renacuajos que advierten acerca de un riesgo inminente de predación y cuya detección dispara comportamientos antipredatorios. La disminución en los niveles de actividad es una respuesta antipredatoria común en renacuajos (Kiesecker *et al.*, 1996; Fraker, 2008b) así como en muchos otros taxa (Chivers y Smith, 1998). Las larvas de *R. arenarum* disminuyeron sus niveles de actividad cuando fueron expuestas a homogenatos coespecíficos pero no cuando fueron expuestas a homogenatos de *H. pulchellus*. Este resultado nos hizo pensar en un principio que la señal de alarma en cuestión era especie-específica. Sin embargo, los renacuajos de *R. arenarum* también presentaron respuestas antipredatorias al ser expuestos a homogenatos de *R. fernandezae*, un bufonido más emparentado con *R. arenarum*. De todas maneras, el hecho de que los comportamientos observados se disparen con homogenatos de algunas especies y no de otras, demuestra que las respuestas observadas no son una reacción aversiva frente a estímulos generales o tóxicos que pudieran estar presentes en los homogenatos, sino que las larvas están detectando alguna molécula particular (o varias) que específicamente les indica un riesgo de predación.



Al exponer a los renacuajos de *R. arenarum* a diluciones sucesivas de homogenato coespecífico observamos que la respuesta antipredatoria se manifestó de manera “dosis dependiente”. Es decir, que para determinadas “intensidades” del estímulo de alarma (en nuestro caso la dilución 1:100 del homogenato original) los animales disminuyeron sus niveles de actividad respecto a los controles, aunque esta disminución no fue tan marcada como la que mostraron los animales expuestos a dosis mayores del estímulo. Este resultado sugiere que las larvas de *R. arenarum* son capaces de evaluar, de acuerdo a la intensidad del estímulo de alarma detectado, el nivel de riesgo de predación al que están expuestas y modificar su comportamiento en consecuencia a ese nivel de riesgo. Este resultado coincide con la hipótesis de evitación de predador sensible a amenaza<sup>5</sup>, la cual propone que los animales ajustan la intensidad de sus respuestas antipredatorias de acuerdo al grado de amenaza recibida por un determinado predador (Chivers *et al.*, 2001). Esta modulación de la respuesta antipredatoria de acuerdo al grado de amenaza que representa un predador ha sido documentada en muchos sistemas predador-presa, incluyendo anfibios (Madison *et al.*, 1999; Murray y Jenkins, 1999; Puttlitz *et al.*, 1999).

Algunos experimentos previos, realizados en peces, han demostrado que éstos modulan sus respuestas antipredatorias de acuerdo a cambios en las concentraciones de las señales químicas de alarma liberadas por coespecíficos. Por ejemplo: se ha documentado que los peces goldfish (*Carassius auratus*) exhiben respuestas antipredatorias más intensas y de mayor duración a medida que la concentración de la señal de alarma aumenta (Zhao y Chivers, 2005). En este sentido, Dupuch *et al.* (2004) han demostrado que los peces de la especie *Phoxinus eos* intensifican su respuesta antipredatoria a medida que se aumenta la concentración de la señal de alarma en experimentos de campo (Dupuch *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha encontrado que algunas especies de peces presentan respuestas de tipo todo-o-nada ante cambios en la concentración de señales de alarma (Marcus y Brown, 2003).

---

<sup>5</sup> Threat-sensitive predator avoidance

Hasta hoy, ningún trabajo había demostrado que las larvas de anuros, o incluso de los anfibios en general, modulasen la intensidad de sus respuestas antipredatorias de acuerdo a cambios en las concentraciones de señales de alarma, de tal forma que nuestros resultados constituyen la primera evidencia de este fenómeno en renacuajos. Aunque otros autores han encontrado que los renacuajos de la especie *Anaxyrus americanus* presentan respuestas del tipo todo-o-nada ante variaciones en la intensidad de señal de alarma (Mirza *et al.*, 2006). Lo cierto es que la reducción en los niveles de actividad como respuesta antipredatoria, refleja en realidad un compromiso entre: por un lado, disminuir el riesgo de predación, y por otro, reducir el tiempo que se emplea en otras actividades importantes, como por ejemplo el forrajeo (Petranka, 1989; Lima y Dill, 1990). La reducción en los niveles de actividad efectivamente disminuye la tasa de encuentro con los predadores y la visibilidad de las presas, lo que aumenta la sobrevivencia de los animales, pero también reduce la toma de recursos, afectando su crecimiento y desarrollo (McNamara y Houston, 1987; Werner y Anholt, 1993). Esto sugiere que el estado nutricional de los animales debe ser un factor importante, entre muchos otros, a la hora de la toma de decisiones frente a estímulos que disparan comportamientos antipredatorios. De hecho, se ha demostrado en renacuajos de la especie *Rana clamitans* que, efectivamente, los individuos con mayor reservas energéticas presentan respuestas comportamentales antipredatorias más intensas y de mayor duración cuando son expuestos a señales químicas de un predador (Fraker, 2008b). Dado este compromiso entre comer o ser comido, es esperable entonces que durante el transcurso de la evolución se hayan desarrollado estrategias que permitan a los animales modular sus respuestas en función del grado de amenaza que les indica un determinado estímulo. Todo esto también explica por qué la detección de un estímulo de alarma en las larvas de *R. arenarum*, produjo respuestas de escape y evitación de la zona de peligro como primera reacción comportamental, mientras que la reducción de los niveles de actividad constituyó una fase posterior de la respuesta antipredatoria.

Al igual que lo observado con el estímulo de alimento, los experimentos de ablación y marcación de neuronas activadas mostraron que el SO, pero no el

SVN, participa en la detección de señales de alarma liberadas por otros renacuajos en *R. arenarum*. Estos resultados demuestran, por primera vez, cual es el sistema sensorial específico involucrado en este comportamiento en renacuajos. Sin embargo, ¿Estamos realmente en presencia de una feromona de alarma? Como mencionamos anteriormente, el hecho de que los homogenatos de *H. pulchellus* no evoquen respuestas antipredatorias en los renacuajos de *R. arenarum* indica que los estímulos detectados no son productos generales de desecho liberados durante un evento de predación. Pero también, el hecho de que las larvas de *R. arenarum* si respondan ante homogenatos de larvas de otro bufonido, nos indica que tales estímulos no son estrictamente específicos de *R. arenarum*.

La presencia de señales de alarma en larvas de anuros fue originalmente conocida en larvas de bufónidos (Eibl-Eibesfeldt, 1949). Revisando la bibliografía, encontramos que muchos trabajos posteriores utilizaban especies de anuros filogenéticamente lejanas entre si (usualmente ránidos y bufónidos) para evaluar la respuesta a señales de alarma entre co- y heteroespecíficos, encontrando consecuentemente aparentes respuestas especie-específicas (Hews y Blaustein, 1985; Hews, 1988; Summey y Mathis, 1998). Esto sería equivalente, en nuestro trabajo, a quedarnos sólo con los resultados obtenidos en *R. arenarum* expuestos a homogenatos de *H. pulchellus*. Probablemente estos hechos hayan instalado la utilización del término “feromona de alarma” en renacuajos. Aunque, curiosamente algunos trabajos ya habían demostrado reacciones cruzadas ante señales de alarma heteroespecíficas si se utilizaban larvas de diferentes especies de bufónidos (Pfeiffer, 1966). Es probable entonces, que el estímulo químico reconocido como señal de alarma por *R. arenarum* sea, en realidad, alguna molécula común al resto de las especies de la familia Bufonidae; la cual seguramente sea producida en un tipo de célula epidérmica particular, las llamadas *Reinsenzellen* o “células gigantes”, abundantes en larvas de bufónidos pero que no han sido encontradas en la epidermis de otros renacuajos (Pfeiffer, 1966).

En este punto de la discusión, creemos que hay que ser particularmente cuidadoso con las generalizaciones que puedan hacerse en torno al concepto de “señales químicas de alarma”, a fin de tener un poco más claro el alcance de nuestras conclusiones. Es decir, es probable que durante el transcurso de la evolución, y debido a factores intrínsecos de la biodiversidad de los ecosistemas y las relaciones históricas (en términos evolutivos) entre predadores y presas, las larvas de diferentes grupos de anuros hayan desarrollado estrategias antipredatorias basadas en la detección de diferentes compuestos químicos. De hecho los resultados obtenidos hasta la actualidad parecen argumentar esta diversidad. Algunas especies utilizan la liberación de amonio como señal de alarma, el cual seguramente sea liberado por el tubo cloacal durante el encuentro con un predador (Kiesecker *et al.*, 1999). Otras especies, como *R. arenarum* y otros bufónidos detectan moléculas producidas por células particulares de la epidermis, pero que sólo son liberadas si hay daño tisular producto del ataque de un predador (Eibl-Eibesfeldt, 1949; Pfeiffer, 1966; Hews y Blaustein, 1985; Hews, 1988). Mientras que otros renacuajos, como los de la especie *Rana sylvatica*, producen pequeños péptidos en células epidérmicas, en principio especie-específicos, que funcionan también como señal de alarma pero que son liberados activamente sin que haya un daño tisular asociado (Fraker *et al.*, 2009).

En este contexto, sería interesante analizar que órgano sensorial participa en la detección de la señal de alarma en renacuajos de *Rana sylvatica*. Hasta hoy, la única supuesta feromona de alarma caracterizada químicamente en larvas de anuros (Fraker *et al.*, 2009). También sería enriquecedor, en este sentido, conocer la naturaleza química del estímulo que actúa como señal de alarma en *R. arenarum* y otros bufónidos. Sin embargo, lograr este cometido puede llevar años de trabajo infructuoso y ciertamente este tipo de estudios no estaban dentro de los alcances y posibilidades de esta tesis.

Concluyendo, en este capítulo hemos demostrado que tanto la detección de estímulos que indican la presencia de una fuente de alimento como la detección de señales de alarma que indican un riesgo de predación están

mediados por el SO y no por el SVN en *R. arenarum*. Ahora bien, en el capítulo anterior demostramos la existencia de dos poblaciones neuronales en el EO de esta especie, una subpoblación G<sub>olf</sub>-ir localizada preferentemente en la mitad apical del EO y otra subpoblación G<sub>ao</sub>-ir localizada preferentemente en la mitad basal del EO. Una posibilidad entonces es que los dos estímulos evaluados en el presente capítulo estén siendo detectados diferencialmente por estas dos poblaciones neuronales presentes en el EO. Esto sería, en principio, relativamente fácil de comprobar realizando dobles y triples marcaciones con anticuerpos específicos. Lamentablemente, estos experimentos no pudieron realizarse dentro de los plazos de esta tesis por diversos problemas técnicos que no tiene sentido detallar aquí. Sin embargo, los resultados que se obtengan en el futuro con éstos y otros experimentos, sin duda aportarán un conocimiento más detallado de los sistemas quimiosensoriales de larvas de anuros y su funcionalidad.

# **Conclusiones y discusión general**

En la presente tesis se estudiaron los sistemas quimiosensoriales de larvas de anuros desde una óptica integral, tratando de abarcar tanto aspectos morfológicos como funcionales y comportamentales. Los resultados obtenidos, en principio, contribuyen al conocimiento básico general de la biología de las larvas de anuros, pero además, la evidencia aportada por estos estudios sirve como base de una línea de investigación que, a futuro, puede ayudar a comprender aspectos generales de la organización y funcionalidad de los sistemas quimiosensoriales en vertebrados.

A lo largo de esta sección iré intercalando las conclusiones más importantes que se han obtenido de este trabajo y discutiendo, desde una óptica más global, aquellos puntos que hayan quedado pendientes en las discusiones de cada capítulo.

- ✓ La presencia de un sistema “dual” de quimiodetección formado por un SO y un SVN parece ser una característica general en lavas de anuros.

En esta tesis se han analizado larvas de catorce especies de anuros, las cuales abarcan un espectro considerablemente amplio del árbol filogenético del grupo, y en todas ellas se ha encontrado tanto un SO como un SVN desarrollado. Es más, Benzekri y Reiss (2011) han descrito la presencia de ambos sistemas sensoriales en larvas de *Ascaphus truei*, el anuro viviente más basal del grupo. Con lo cual creemos que la presencia de un sistema “dual” de quimiodetección es una condición general en larvas de anuros.

- ✓ Las características morfológicas, histológicas y bioquímicas detalladas en los capítulos I y II indican que un grado importante de maduración, en lo que se refiere a diferenciación celular y tisular, se alcanza en ambos sistemas sensoriales durante la etapa larval, lo cual indica que éstos serían funcionales en renacuajos.

Sin duda, el punto más controversial respecto a la presencia de un sistema “dual” de quimiodetección en larvas de anuros radica en demostrar si el SVN es, o no es, funcional en renacuajos. Como discutiremos más adelante, la detección de los dos estímulos que hemos analizado en *R. arenarum* está mediada por el SO y no por el SVN. Sin embargo, hay que tener en cuenta que nuestro trabajo constituye la primera exploración que se realiza sobre esta temática en este grupo y todavía hay muchos estímulos potenciales que analizar. Asimismo, también es cierto que los datos en base a los cuales nosotros especulamos con que el SVN pueda ser funcional en renacuajos constituyen solo indicios y no evidencias directas de funcionalidad, la cual, en definitiva solo será confirmada cuando efectivamente se encuentre algún estímulo que active específicamente neuronas de este sistema sensorial.

Ahora bien, en los últimos años varios trabajos han demostrado que los tejidos nerviosos, incluyendo el de los sistemas sensoriales, representan un costo energético elevado para los animales, ya sea tanto durante el procesamiento de información como durante el reposo (Attwell y Laughlin, 2001; Lennie, 2003; Niven *et al.*, 2003; Nawroth *et al.*, 2007; Niven, 2007). A raíz de estos resultados, se ha propuesto que el sistema nervioso está sujeto a dos presiones selectivas en conflicto: por un lado, el sistema nervioso enfrenta la necesidad de minimizar el consumo energético, mientras que por otro debe ser capaz de generar comportamientos con valor adaptativo en condiciones ambientales fluctuantes (Niven y Laughlin, 2008). Más específicamente, existiría un compromiso en los sistemas sensoriales entre el costo energético de mantener una estructura sensorial que codifica para una modalidad sensorial particular y la cantidad de información útil y confiable que esta aporta al organismo (Niven y Laughlin, 2008). En este contexto, resulta curioso entonces que los renacuajos de todas las especies de anuros estudiadas afronten el costo energético de desarrollar un SVN tempranamente si éste sólo será funcional durante la vida adulta o en etapas postmetamórficas. En este sentido, otras estructuras quimiosensoriales que participan en la detección de estímulos ambientales durante etapas postmetamórficas en anuros se desarrollan *de novo* en etapas cercanas o durante el clímax metamórfico. Por ejemplo, los adultos



de *X. laevis* y otros pípidos poseen un epitelio quimiosensorial revistiendo la cámara media olfatoria (Paterson y Hindle, 1951). Este epitelio sensorial no está presente durante la etapa larval de *X. laevis*, sino que comienza a desarrollarse hacia el final de la misma casi llegando al clímax metamórfico (Nieuwkoop y Faber, 1994). Se ha demostrado que la presencia de este epitelio sensorial en la cámara media le permite a los animales seguir detectando estímulos químicos en el agua luego de la metamorfosis (Iida y Kashiwayanagi, 1999). Por otra parte, en los estudios de la ontogenia del SO y SVN en *R. arenarum*, presentados en el capítulo I, también hemos encontrado un epitelio sensorial que desarrolla *de novo* en el piso de la cámara principal durante el clímax metamórfico (G43). Este epitelio sensorial se corresponde con el *Recessus olfactorius* descrito en otros anuros (Helling, 1938), el cual se ha especulado que, al igual que el epitelio sensorial de la cámara media de los pípidos, permitiría a los animales seguir detectando estímulos en el agua durante etapas postmetamórficas (Helling, 1938).

A raíz de todo lo expuesto más arriba, lo que interpretamos entonces es que la aparición temprana del SVN y su posterior desarrollo y diferenciación durante la etapa larval de anuros indica, muy probablemente, que este sistema sensorial es funcional en renacuajos.

Por otra parte, los estudios comportamentales realizados con larvas de *R. arenarum* aportaron una serie de evidencias interesantes respecto a la funcionalidad de los sistemas quimiosensoriales, que resultan novedosas para esta especie en particular y para las larvas de anuros en general.

- ✓ Los renacuajos de *R. arenarum* utilizan señales químicas para detectar las fuentes de alimento y estos estímulos son detectados por el SO.
- ✓ Asimismo, el SO, pero no el SVN, participa en la detección de señales de alarma que disparan comportamientos antipredatorios en *R. arenarum*, y probablemente también en otros bufónidos.

Como mencionamos anteriormente, el hecho de que el SVN no participe en la detección de ninguno de los dos estímulos ensayados, no significa que éste no sea funcional en renacuajos, sino que es necesario evaluar otras posibilidades.


















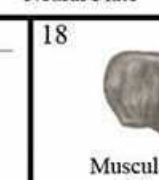
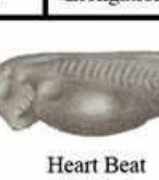




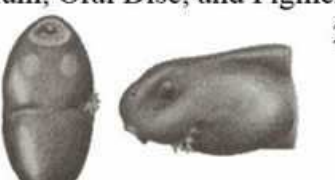

En este sentido, un comportamiento interesante para evaluar si el SVN participa en la detección de estímulos en renacuajos, es el ya mencionado *kin recognition*. Los renacuajos de muchas especies, se agrupan con sus congéneres formando “cardúmenes” de diferentes tamaños y características según la especie (Hoff *et al.*, 1999). Independientemente de los motivos que lleven a los renacuajos a formar estos grupos, que no viene al caso discutir en este punto, lo interesante es que se ha demostrado que los renacuajos utilizan claves químicas para reconocer a sus hermanos, con los cuales permanecen juntos formando el grupo (Waldman, 1985; Blaustein y Waldman, 1992). Es más, se ha demostrado específicamente que el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es el estímulo químico que los animales utilizan para reconocer a sus hermanos (Villinger y Waldman, 2008). El MHC es reconocido por sus funciones inmunológicas, pero también por participar en comportamientos sociales en vertebrados (Piertney y Oliver, 2006). Los *loci* del MHC presentan un polimorfismo extraordinario lo que le da a cada individuo algo así como su “marca química personal”, lo cual es utilizado en las interacciones sociales de numerosas especies para el reconocimiento de individuos, el estatus social, etc. (Manning *et al.*, 1992; Penn, 2002; Rajakaruna *et al.*, 2006). Lo interesante es que se ha demostrado en ratones que estos estímulos del MHC son detectados por neuronas del OVN. Es más, son las neuronas que expresan la familia de receptores V2R y la vía de señalización mediada por Gao las que específicamente detectan estos estímulos en el OVN de ratones (Leinders-Zufall *et al.*, 2004). Justamente esta población de neuronas V2R-Gao es la única población representada en el OVN de anuros (Hagino-Yamagishi *et al.*, 2004).

Para finalizar, no quisiera dejar sin plantear una consideración importante para la continuación de esta línea de investigación en el futuro. Sin duda, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto el enorme

potencial que tiene el estudio de esta temática en larvas de anuros; no tanto por las conclusiones a las que estos resultados nos han permitido llegar, sino más bien, debido a la gran cantidad de nuevos interrogantes que nos han generado. Como el estudio de los sistemas quimiosensoriales en renacuajos nunca había sido abordado antes desde una óptica integral, este trabajo de tesis estuvo orientado conocer aspectos básicos generales de estos sistemas en renacuajos. En consecuencia muchos de los resultados obtenidos permitieron plantear algunas conclusiones generales aplicables, sino a todas, por lo menos a un amplio espectro de especies de anuros. Sin embargo, es evidente que existe una diversidad considerable tanto en parámetros morfológicos, como fisiológicos, comportamentales y ecológicos, entre los diferentes grupos de anuros; lo cual, hace que la generalización “renacuajos” rápidamente encuentre su limitación. Es importante entonces, que los experimentos que se diseñen a futuro para ahondar en cuestiones más específicas en esta temática, tengan en cuenta esta diversidad.

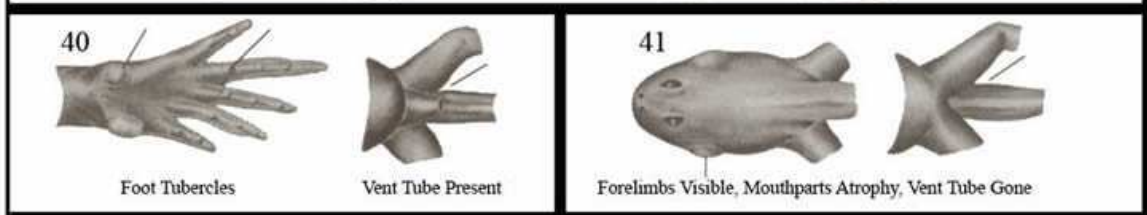
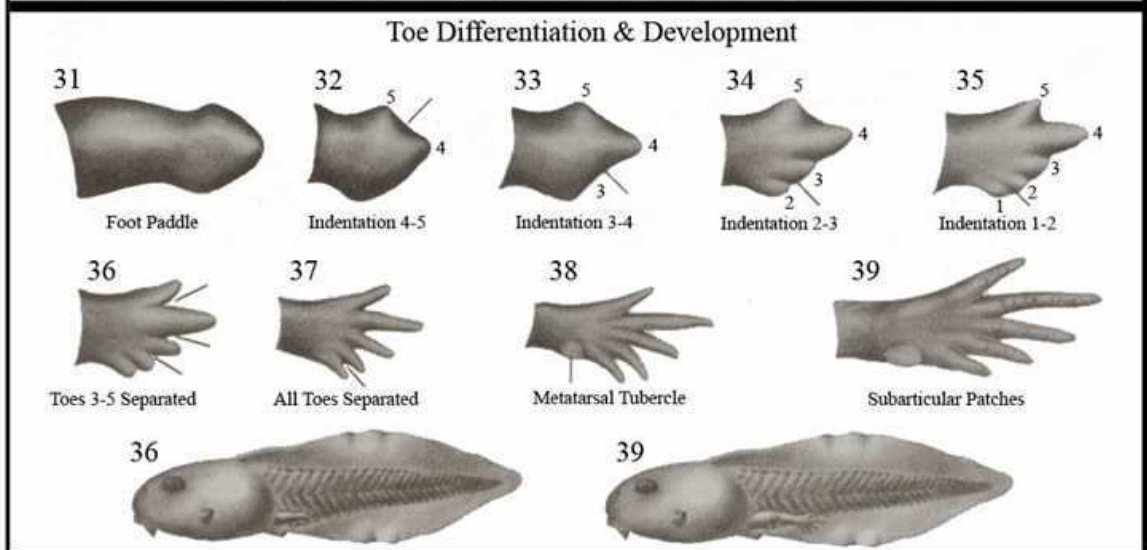
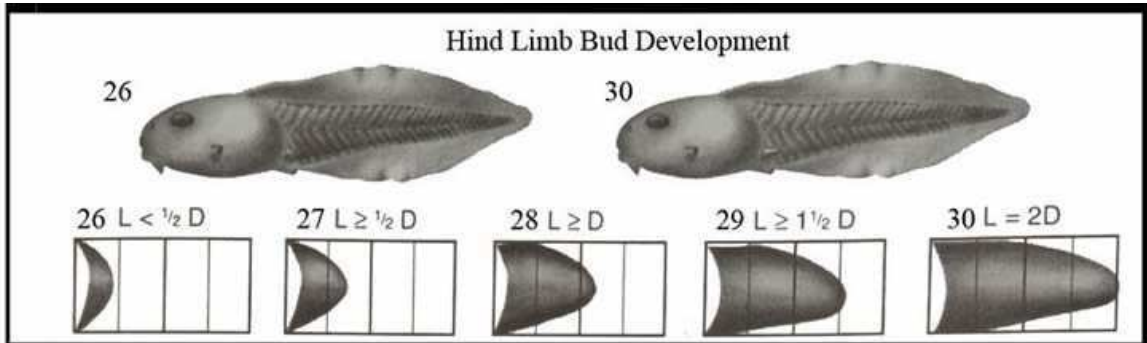
Apéndice I. Tabla de clasificación del desarrollo y metamorfosis de renacuajos exotróficos diseñada por Gosner (1960)

E M B R Y O S

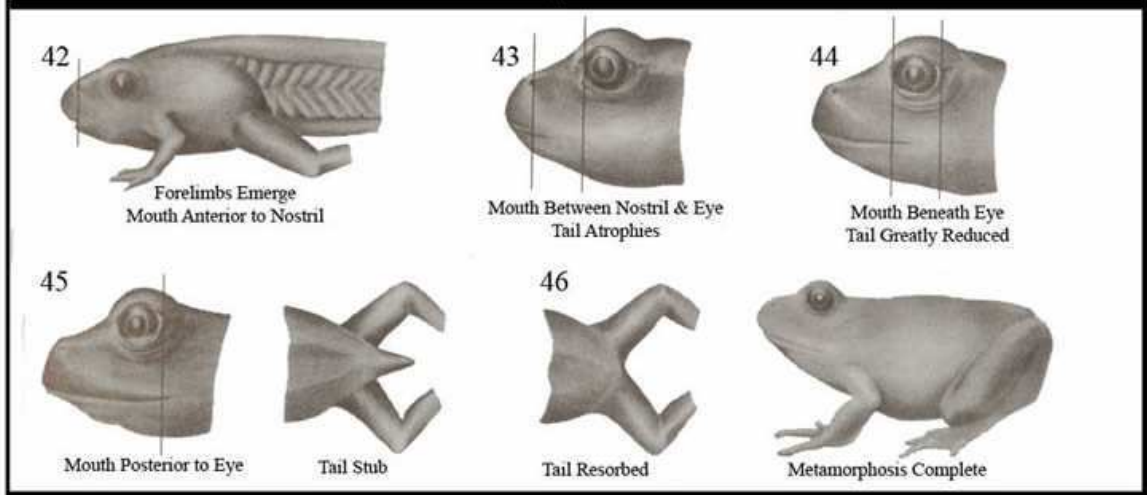
1  Fertilization	2  Gray Crescent	3  2-Cell	4  4-Cell	5  8-Cell
6  16-Cell	7  32-Cell	8  Midcleavage	9  Late Cleavage	10  Dorsal Lip
11  Yolk Plug	12  Late Gastrula	13  Neural Plate	14  Neural Folds	15  Elongation, Rotation
16  Neural Tube, Gill Plates	17  Tail Bud Adhesive Gland	18  Muscular Response Olfactory Pits	19  Heart Beat Gill Buds	
20  Gill Circulation, Tail Elongation	21  Cornea Transparent, Mouth Opens	22  Tail Fins Transparent, Fin Circulation		
Operculum, Oral Disc, and Pigmentation				
23  Labia and Teeth Differentiate Operculum Covers Gill Bases	24  External Gills Atrophy Operculum Closes on Right	25  Mouthparts Obvious Spiracle Forms on Left		

H A T C H L I N G S

L  
A  
R  
V  
A  
E



M  
E  
T  
A  
M  
O  
R  
P  
H  
S



**Apéndice II. Especímenes examinados y datos de colección.**

*Scinax acuminatus* de Laguna Yema, Formosa, Argentina. **JF1598**

*Hypsiboas curupi* de Campo Experimental INTA "Cuartel Rio Victoria", San Vicente, Departamento Guarani, Misiones, Argentina. **JF326**

*Phylomedusa sp.* de Resistencia, Chaco, Argentina. **JF1765**

*Limnomedusa macroglossa* de Misiones, Argentina. **JF220**

*Crossodactylus schmidti* de Campo Experimental INTA "Cuartel Rio Victoria", San Vicente, Departamento Guarani, Misiones, Argentina. **JF1153**

*Physalaemus sp.* de Laguna Yema, Formosa, Argentina. **JF1622**

*Dermatonotus muelleri* de Laguna Yema, Formosa, Argentina. **No clasificado**

*Lepidobatrachus llanensis* de Laguna Yema, Formosa, Argentina. **JF1498**

*Leptodactylus latrans*, localidad desconocida. **No clasificado**

## Bibliografía

- Ache BW & Young JM. 2005. Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* 48: 417-30.
- Altig R & McDiarmid RW. 1999. Body Plan: Development and Morphology. En: *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. R. W. McDiarmid and R. Altig. Chicago, EE. UU., The University of Chicago Press: 24-51.
- Alving WR & Kardong KV. 1996. The role of the vomeronasal organ in rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*) predatory behavior. *Brain Behav Evol* 48: 165-72.
- Attwell D & Laughlin SB. 2001. An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 1133-1145.
- Balmer CW & LaMantia AS. 2005. Noses and neurons: induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway. *Dev Dyn* 234: 464-81.
- Baxi KN, Dorries KM & Eisthen HL. 2006. Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? *Trends Neurosci* 29: 1-7.
- Belanger RM, Smith CM, Corkum LD & Zielinski BS. 2003. Morphology and histochemistry of the peripheral olfactory organ in the round goby, *Neogobius melanostomus* (Teleostei: Gobiidae). *J Morphol* 257: 62-71.
- Belluscio L, Koentges G, Axel R & Dulac C. 1999. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97: 209-20.
- Benzekri NA & Reiss JO. 2011. Olfactory metamorphosis in the coastal tailed frog *Ascaphus truei* (Amphibia, Anura, Leiopelmatidae). *J Morphol* 273: 68-87.
- Bertmar G. 1981. Evolution of vomeronasal organs in vertebrates. *Evolution* 35: 359-366.
- Blaustein AR & Waldman B. 1992. Kin recognition in anuran amphibians. *Anim Behav* 44, Part 2: 207-221.

- Brinkmann H, Venkatesh B, Brenner S & Meyer A. 2004. Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4900-4905.
- Buck L & Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-87.
- Buck LB. 2000. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100: 611-8.
- Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL & Mouton PR. 1996. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol* 25: 821-8.
- Carmanchahi PD, Ferrari CC, Marcos HJ, Affanni JM, Sonez CA & Paz DA. 2000. Characterisation of glycoconjugate sugar residues in the vomeronasal organ of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Xenarthra). *J Anat* 196: 357-70.
- Casco VH, Paz DA, Ruiz G, Maldonado C, Pisano A & Aoki A. 1992. Differentiation of endocrine myocardiocytes in the developing heart of the toad (*Bufo arenarum* Hensel). *Int J Dev Biol* 36: 537-542.
- Catania KC. 1999. A nose that looks like a hand and acts like an eye: the unusual mechanosensory system of the star-nosed mole. *J Comp Physiol A* 185: 367-372.
- Catania KC. 2005. Evolution of sensory specializations in insectivores. *Anat Rec Part A* 287A: 1038-1050.
- Clack JA. 2002. *Gaining Ground: The Origin and Evolution of Tetrapods*. Bloomington, Indiana University Press.
- Cooper RS. 1943. An experimental study of the development of the larval olfactory organ of *Rana pipiens* Schreber. *J Exp Zool* 93: 415-451.
- Craven BA, Neuberger T, Paterson EG, Webb AG, Josephson EM, Morrison EE & Settles GS. 2007. Reconstruction and Morphometric Analysis of the Nasal Airway of the Dog (*Canis familiaris*) and Implications Regarding Olfactory Airflow. *Anat Rec* 290: 1325-1340.



- Crossland MR, Haramura T, Salim AA, Capon RJ & Shine R. 2012. Exploiting intraspecific competitive mechanisms to control invasive cane toads (*Rhinella marina*). *Proc Biol Sci*.
- Crossland MR & Shine R. 2011. Cues for cannibalism: cane toad tadpoles use chemical signals to locate and consume conspecific eggs. *Oikos* 120: 327-332.
- Chen WR & Shepherd GM. 2005. The olfactory glomerulus: a cortical module with specific functions. *J Neurocytol* 34: 353-60.
- Chesler AT, Zou DJ, Le Pichon CE, Peterlin ZA, Matthews GA, Pei X, Miller MC & Firestein S. 2007. A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1039-44.
- Chivers DP & Mirza RS. 2001. Importance of predator diet cues in responses of larval wood frogs to fish and invertebrate predators. *J Chem Ecol* 27: 45-51.
- Chivers DP, Mirza RS, Bryer PJ & Kiesecker JM. 2001. Threat-sensitive predator avoidance by slimy sculpins: understanding the importance of visual versus chemical information. *Can J Zool* 79: 867-873.
- Chivers DP & Smith RJF. 1998. Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Écoscience* 5: 338-352.
- Danciger E, Mettling C, Vidal M, Morris R & Margolis F. 1989. Olfactory marker protein gene: its structure and olfactory neuron-specific expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8565-9.
- Date-Ito A, Ohara H, Ichikawa M, Mori Y & Hagino-Yamagishi K. 2008. Xenopus V1R vomeronasal receptor family is expressed in the main olfactory system. *Chem Senses* 33: 339-46.
- Dennis JC, Smith TD, Bhatnagar KP, Bonar CJ, Burrows AM & Morrison EE. 2004. Expression of neuron-specific markers by the vomeronasal neuroepithelium in six species of primates. *Anat Rec Part A* 281: 1190-200.

- Dorries KM, Adkins-Regan E & Halpern BP. 1997. Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain Behav Evol* 49: 53-62.
- Døving KB, Trotier D, Rosin J-F & Holley A. 1993. Functional Architecture of the Vomeronasal Organ of the Frog (Genus *Rana*). *Acta Zool* 74: 173-180.
- Dulac C. 2000. Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Curr Opin Neurobiol* 10: 511-8.
- Dulac C & Axel R. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83: 195-206.
- Dupuch AI, Magnan P & Dill LM. 2004. Sensitivity of northern redbelly dace, *Phoxinus eos*, to chemical alarm cues. *Can J Zool* 82: 407-415.
- Eibl-Eibesfeldt I. 1949. Über das Vorkommen von Schreckstoffen bei Erdkrötenquappen. *Experientia* 5: 236-236.
- Eisthen HL. 1992. Phylogeny of the vomeronasal system and of receptor cell types in the olfactory and vomeronasal epithelia of vertebrates. *Microsc Res Tech* 23: 1-21.
- Eisthen HL. 1997. Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behav Evol* 50: 222-33.
- Eisthen HL. 2000. Presence of the vomeronasal system in aquatic salamanders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1209-13.
- Eisthen HL. 2002. Why Are Olfactory Systems of Different Animals So Similar? *Brain Behav Evol* 59: 273-293.
- Farbman AI. 1990. Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 13: 362-5.
- Farbman AI. 1992. *Cell Biology of Olfaction*. New York, EE.UU., Cambridge University Press.
- Ferrando S, Bottaro M, Gallus L, Girosi L, Vacchi M & Tagliafierro G. 2007. First detection of olfactory marker protein (OMP) immunoreactivity in the olfactory epithelium of a cartilaginous fish. *Neurosci Lett* 413: 173-6.
- Ferrer RP & Zimmer RK. 2007. Chemosensory reception, behavioral expression, and ecological interactions at multiple trophic levels. *J Exp Biol* 210: 1776-85.

- Fraker ME. 2008a. The dynamics of predation risk assessment: responses of anuran larvae to chemical cues of predators. *J Anim Ecol* 77: 638-45.
- Fraker ME. 2008b. The effect of hunger on the strength and duration of the antipredator behavioral response of green frog (*Rana clamitans*) tadpoles. *Behav Ecol Sociobiol* 62: 1201-1205.
- Fraker ME, Hu F, Cuddapah V, McCollum SA, Relyea RA, Hempel J & Denver RJ. 2009. Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Horm Behav* 55: 520-529.
- Gonzalez A, Morona R, Lopez JM, Moreno N & Northcutt RG. 2011. Lungfishes, like tetrapods, possess a vomeronasal system. *Front Neuroanat* 4: 130.
- Gonzalo A, Lopez P & Martin J. 2009. Learning, memorizing and apparent forgetting of chemical cues from new predators by Iberian green frog tadpoles. *Anim Cogn* 12: 745-50.
- Gonzalo A, López P & Martín J. 2007. Iberian green frog tadpoles may learn to recognize novel predators from chemical alarm cues of conspecifics. *Anim Behav* 74: 447-453.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Graves BM & Halpern M. 1990. Roles of vomeronasal organ chemoreception in tongue flicking, exploratory and feeding behaviour of the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Anim Behav* 39: 692-698.
- Graziadei GA, Stanley RS & Graziadei PP. 1980. The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development. *Neuroscience* 5: 1239-52.
- Grus WE & Zhang J. 2006. Origin and evolution of the vertebrate vomeronasal system viewed through system-specific genes. *Bioessays* 28: 709-18.
- Grus WE & Zhang J. 2009. Origin of the genetic components of the vomeronasal system in the common ancestor of all extant vertebrates. *Mol Biol Evol* 26: 407-19.

- Hagino-Yamagishi K, Moriya K, Kubo H, Wakabayashi Y, Isobe N, Saito S, Ichikawa M & Yazaki K. 2004. Expression of vomeronasal receptor genes in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 472: 246-56.
- Hagino-Yamagishi K & Nakazawa H. 2011. Involvement of Galpha(olf)-expressing neurons in the vomeronasal system of *Bufo japonicus*. *J Comp Neurol* 519: 3189-201.
- Hagman M & Shine R. 2009. Factors influencing responses to alarm pheromone by larvae of invasive cane toads, *Bufo marinus*. *J Chem Ecol* 35: 265-71.
- Halpern M, Daniels Y & Zuri I. 2005. The role of the vomeronasal system in food preferences of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Nutr Metab (Lond)* 2: 6.
- Halpern M & Martinez-Marcos A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol* 70: 245-318.
- Hanken J. 1999. Larvae in amphibian development and evolution. En: *The Origin and Evolution of Larval Forms* B. K. Hall and M. H. Wake. San Diego, Academic Press: 61-108.
- Hansen A, Anderson KT & Finger TE. 2004. Differential distribution of olfactory receptor neurons in goldfish: structural and molecular correlates. *J Comp Neurol* 477: 347-59.
- Hansen A, Reiss JO, Gentry CL & Burd GD. 1998. Ultrastructure of the olfactory organ in the clawed frog, *Xenopus laevis*, during larval development and metamorphosis. *J Comp Neurol* 398: 273-88.
- Hansen A, Rolen SH, Anderson K, Morita Y, Caprio J & Finger TE. 2003. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish. *J Neurosci* 23: 9328-39.
- Hara TJ. 2006. Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *J Fish Biol* 68: 810-825.
- Hazlett B. 1989. Additional sources of disturbance pheromone affecting the crayfish *Orconectes virilis*. *J Chem Ecol* 15: 381-385.
- Helling H. 1938. Das Geruchsorgan der Anuren, vergleichend-morphologisch betrachtet. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 108: 587-643.

- Hews DK. 1988. Alarm response in larval western toads, *Bufo boreas*: release of larval chemicals by a natural predator and its effect on predator capture efficiency. *Anim Behav* 36: 125-133.
- Hews DK & Blaustein AR. 1985. An investigation of the alarm response in *Bufo boreas* and *Rana cascadae* tadpoles. *Behav Neural Biol* 43: 47-57.
- Hinsberg V. 1901. Die Entwicklung der Nasenhöhle bei Amphibien. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 58: 411-482.
- Hoff KS, Blaustein AR, McDiarmid RW & Altig R. 1999. Behavior: Interactions and Their Consequences. En: *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. R. W. McDiarmid and R. Altig. Chicago, EE. UU., The University of Chicago Press: 215-239.
- Hudson R & Distel H. 1986. Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 37: 123-8.
- Iida A & Kashiwayanagi M. 1999. Responses of *Xenopus laevis* water nose to water-soluble and volatile odorants. *J Gen Physiol* 114: 85-92.
- Jermakowicz WJ, 3rd, Dorsey DA, Brown AL, Wojciechowski K, Giscombe CL, Graves BM, Summers CH & Ten Eyck GR. 2004. Development of the nasal chemosensory organs in two terrestrial anurans: the directly developing frog, *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae), and the metamorphosing toad, *Bufo americanus* (Anura: Bufonidae). *J Morphol* 261: 225-48.
- Jia C, Goldman G & Halpern M. 1997. Development of vomeronasal receptor neuron subclasses and establishment of topographic projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res* 102: 209-16.
- Jia C & Halpern M. 1996. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (Gi alpha 2 and G(o alpha)) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res* 719: 117-28.
- Jurgens JD. 1971. The morphology of the nasal region of Amphibia and its bearing on the phylogeny of the group. *Annals of the University of Stellenbosch* 46A: 1-146.

- Karlson P & Luscher M. 1959. "Pheromones": a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* 183: 55-56.
- Keiichiro I, Takahashi K, Nakano T, Sato M & Omori M. 2006. Chemoreceptive foraging in a shallow-water scavenging lysianassid amphipod: role of amino acids in the location of carrion in *Scopelocheirus onagawae*. *Mar Ecol Prog Ser* 317: 193-202.
- Keverne EB. 2004. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiol Behav* 83: 177-187.
- Khalil SH. 1978. Development of the olfactory organ of the Egyptian Toad, *Bufo regularis* Reuss. I. Larval period. *Folia Morphol (Prague)* 26: 69-74.
- Kiesecker JM, Chivers DP & Blaustein AR. 1996. The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. *Anim Behav* 52: 1237-1245.
- Kiesecker JM, Chivers DP, Marco A, Quilchano C, Anderson MT & Blaustein AR. 1999. Identification of a disturbance signal in larval red-legged frogs, *Rana aurora*. *Anim Behav* 57: 1295-1300.
- Kikuyama S & Toyoda F. 1999. Sodefrin: a novel sex pheromone in a newt. *Rev Reprod* 4: 1-4.
- Kiseleva EI. 1995. Natural amino acids as effective stimuli evoking chemoreceptor-directed behavior in anuran tadpoles. *Zh Obshch Biol* 56: 329-345.
- Lee AC, He J & Ma M. 2011. Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference. *J Neurosci* 31: 2974-82.
- Lefcort H & Eiger SM. 1993. Antipredatory Behaviour of Feverish Tadpoles: Implications for Pathogen Transmission. *Behaviour* 126: 13-27.
- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, S PC, Maul-Pavicic A, Jäger M, Li X-H, Breer H, Zufall F & Boehm T. 2004. MHC Class I Peptides as Chemosensory Signals in the Vomeronasal Organ. *Science* 306: 1033-1037.
- Lennie P. 2003. The cost of cortical computation. *Curr Biol* 13: 493-7.

- Levai O & Strotmann J. 2003. Projection pattern of nerve fibers from the septal organ: Dil-tracing studies with transgenic OMP mice. *Histochem Cell Biol* 120: 483-92.
- Lima SL & Dill LM. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: A review and prospectus. *Can J Zool* 68: 619-640.
- Long JA & Gordon MS. 2004. The greatest step in vertebrate history: a paleobiological review of the fish-tetrapod transition. *Physiol Biochem Zool* 77: 700-19.
- Maddock JR & Shapiro L. 1993. Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* 259: 1717-23.
- Madison DM, Maerz JC & McDarby JH. 1999. Optimization of Predator Avoidance by Salamanders Using Chemical Cues: Diet and Diel Effects. *Ethology* 105: 1073-1086.
- Malun D & Brunjes PC. 1996. Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *J Comp Neurol* 368: 1-16.
- Manning CJ, Wakeland EK & Potts WK. 1992. Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* 360: 581-3.
- Marc RE. 1999. Mapping glutamatergic drive in the vertebrate retina with a channel-permeant organic cation. *J Comp Neurol* 407: 47-64.
- Marcus JP & Brown GE. 2003. Response of pumpkinseed sunfish to conspecific chemical alarm cues: an interaction between ontogeny and stimulus concentration. *Can J Zool* 80: 1671-1677.
- Margolis FL. 1972. A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 1221-1224.
- Mathis U, Schaeffel F & Howland HC. 1988. Visual optics in toads. *J Comp Physiol A* 163: 201-213.
- Matsunami H & Buck LB. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90: 775-84.
- McDiarmid RW & Altig R. 1999. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. Chicago, EE.UU., The University of Chicago Press.

- McNamara JM & Houston AI. 1987. Starvation and Predation as Factors Limiting Population Size. *Ecology* 68: 1515-1519.
- Meyer DL, Jadhao AG & Kicliter E. 1996. Soybean agglutinin binding by primary olfactory and primary accessory olfactory projections in different frogs. *Brain Res* 722: 222-6.
- Michel WC, Steullet P, Cate HS, Burns CJ, Zhainazarov AB & Derby CD. 1999. High-resolution functional labeling of vertebrate and invertebrate olfactory receptor neurons using agmatine, a channel-permeant cation. *J Neurosci Methods* 90: 143-56.
- Millery J, Briand L, Bezirard V, Blon F, Fenech C, Richard-Parpaillon L, Quenedey B, Pernollet JC & Gascuel J. 2005. Specific expression of olfactory binding protein in the aerial olfactory cavity of adult and developing *Xenopus*. *Eur J Neurosci* 22: 1389-99.
- Mirza RS, Ferrari MCO, Kiesecker JM & Chivers DP. 2006. Responses of American toad tadpoles to predation cues: behavioural response thresholds, threat-sensitivity and acquired predation recognition. *Behaviour* 143: 877-889.
- Moreno N & Gonzalez A. 2006. The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: new concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Prog Neurobiol* 78: 61-90.
- Moreno N & Gonzalez A. 2007. Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *J Anat* 211: 151-63.
- Moreno N, Morona R, Lopez JM, Munoz M & Gonzalez A. 2005. Lateral and medial amygdala of anuran amphibians and their relation to olfactory and vomeronasal information. *Brain Res Bull* 66: 332-6.
- Murphy FA, Tucker K & Fadool DA. 2001. Sexual dimorphism and developmental expression of signal-transduction machinery in the vomeronasal organ. *J Comp Neurol* 432: 61-74.
- Murray DL & Jenkins CL. 1999. Perceived predation risk as a function of predator dietary cues in terrestrial salamanders. *Anim Behav* 57: 33-39.



- Nakamuta S, Nakamuta N & Taniguchi K. 2011. Distinct axonal projections from two types of olfactory receptor neurons in the middle chamber epithelium of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* 346: 27-33.
- Nawroth JC, Greer CA, Chen WR, Laughlin SB & Shepherd GM. 2007. An energy budget for the olfactory glomerulus. *J Neurosci* 27: 9790-800.
- Nezlin LP & Schild D. 2000. Structure of the olfactory bulb in tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* 302: 21-9.
- Nieuwkoop PD & Faber J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland, Amsterdam.
- Niven JE. 2007. Brains, islands and evolution: breaking all the rules. *Trends Ecol Evol* 22: 57-59.
- Niven JE & Laughlin SB. 2008. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J Exp Biol* 211: 1792-804.
- Niven JE, Vähäsöyrinki M & Juusola M. 2003. Shaker K<sup>+</sup>-channels are predicted to reduce the metabolic cost of neural information in *Drosophila* photoreceptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 58-61.
- Papes F, Logan DW & Stowers L. 2010. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* 141: 692-703.
- Paterson NF & Hindle E. 1951. The nasal cavities of the Toad *Hemipipa carvalhoi* Mir. -Rib. and other Pipidae. *Proc Zool Soc Lond* 121: 381-415.
- Paz DA, Alonso DG, Pisano A, Casco VH, Knudsen KA & Peralta Soler A. 1995. Expression of isoforms of the neural cell adhesion molecule (NCAM) and polysialic acid during the development of the *Bufo arenarum* olfactory system. *Int J Dev Biol* 39: 1005-13.
- Penn DJ. 2002. The Scent of Genetic Compatibility: Sexual Selection and the Major Histocompatibility Complex. *Ethology* 108: 1-21.
- Petranka JW. 1989. Response of toad tadpoles to conflicting chemical stimuli: predator avoidance versus "optimal" foraging. *Herpetologica* 45: 283-292.

- Pfeiffer W. 1966. Die Verbreitung der Schreckreaktion bei Kaulquappen und die Herkunft des Schreckstoffes. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 52: 79-98.
- Piertney SB & Oliver MK. 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity (Edinb)* 96: 7-21.
- Placyk JS, Jr. & Graves BM. 2002. Prey detection by vomeronasal chemoreception in a plethodontid salamander. *J Chem Ecol* 28: 1017-36.
- Pozzi AG, Yovanovich CA, Jungblut L, Heer T & Paz DA. 2006. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1 in the amphibian developing principal and accessory olfactory system. *Anat Embryol (Berl)* 211: 549-57.
- Prasad BC & Reed RR. 1999. Chemosensation: molecular mechanisms in worms and mammals. *Trends Genet* 15: 150-153.
- Puttlitz MH, Chivers DP, Kiesecker JM & Blaustein AR. 1999. Threat-sensitive Predator Avoidance by Larval Pacific Treefrogs (Amphibia, Hylidae). *Ethology* 105: 449-456.
- Rajakaruna RS, Brown JA, Kaukinen KH & Miller KM. 2006. Major histocompatibility complex and kin discrimination in Atlantic salmon and brook trout. *Mol Ecol* 15: 4569-75.
- Rajchard J. 2006. Antipredator pheromones in amphibians: a review. *Veterinarni Medicina* 51: 409-13.
- Reisert J, Yau KW & Margolis FL. 2007. Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons. *J Physiol* 585: 731-40.
- Reiss JO & Eisthen HL. 2008. Comparative anatomy and physiology of chemical senses in amphibians. En: *Sensory Evolution on the Threshold: Adaptations in Secondarily Aquatic Vertebrates*. J. G. M. Thewissen and S. Nummela. Berkeley and Los Angeles, California, University of California Press: 43-63.
- Risser J. 1914. Olfactory reactions in amphibians. *J Exp Zool* 16: 617-652.

- Roppolo D, Ribaud V, Jungo VP, Luscher C & Rodriguez I. 2006. Projection of the Gruneberg ganglion to the mouse olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 23: 2887-94.
- Rössler P, Mezler M & Breer H. 1998. Two olfactory marker proteins in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 395: 273-280.
- Rowedder W. 1937. Die Entwicklung des Geruchsorgans bei *Alytes obstetricians* und *Bufo vulgaris*. *Zeitschrift fuer Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 107: 91-123.
- Ryba NJ & Tirindelli R. 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19: 371-9.
- Sato Y, Miyasaka N & Yoshihara Y. 2005. Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *J Neurosci* 25: 4889-97.
- Savage RM. 1961. *The ecology and life history of the common frog : (Rana temporaria temporaria)*. London, Pitman and Sons.
- Scalia F, Gallousis G & Roca S. 1991. Differential projections of the main and accessory olfactory bulb in the frog. *J Comp Neurol* 305: 443-461.
- Scalia F & Winans SS. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161: 31-55.
- Scarabotti PA, López JA & Ghirardi R. 2007. Behavioural responses of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae) to fish chemical cues. *Cuad Herpetol* 21: 45-52.
- Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Ginies C, Semon E & Perrier G. 2003. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424: 68-72.
- Schmidt A & Wake MH. 1990. Olfactory and vomeronasal systems of caecilians (Amphibia: Gymnophiona) *J Morphol* 205: 255-268.
- Schreider JP & Raabe OG. 1981. Anatomy of the nasal-pharyngeal airway of experimental animals. *Anat Rec* 200: 195-205.
- Schwanzel-Fukuda M, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM & Pfaff DW. 1992. Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule

- (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in mice. *J Comp Neurol* 321: 1-18.
- Shapiro LS, Roland RM & Halpern M. 1997. Development of olfactory marker protein and N-CAM expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *J Morphol* 234: 109-129.
- Shepherd GM. 2006. Behaviour: Smells, brains and hormones. *Nature* 439: 149-151.
- Shine R. 2003. Reproductive strategies in snakes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 270: 995-1004.
- Smith TD, Dennis JC, Bhatnagar KP, Garrett EC, Bonar CJ & Morrison EE. 2011. Olfactory marker protein expression in the vomeronasal neuroepithelium of tamarins (*Saguinus spp*). *Brain Res* 1375: 7-18.
- Smith TD, Rossie JB & Bhatnagar KP. 2007. Evolution of the nose and nasal skeleton in primates. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* 16: 132-146.
- Storan MJ, Magnaldo T, Biol-N'Garagba MC, Zick Y & Key B. 2004. Expression and putative role of lactoseries carbohydrates present on NCAM in the rat primary olfactory pathway. *J Comp Neurol* 475: 289-302.
- Stuelpnagel JT & Reiss JO. 2005. Olfactory metamorphosis in the Coastal Giant Salamander (*Dicamptodon tenebrosus*). *J Morphol* 266: 22-45.
- Summey MR & Mathis A. 1998. Alarm responses to chemical stimuli from damaged conspecifics by larval anurans: test of three neotropical species. *Herpetologica* 54: 402-408.
- Swann J, Rahaman F, Bijak T & Fiber J. 2001. The main olfactory system mediates pheromone-induced fos expression in the extended amygdala and preoptic area of the male *Syrian hamster*. *Neuroscience* 105: 695-706.
- Taniguchi K, Toshima Y & Saito TR. 1996. Development of the olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Japanese reddish frog, *Rana japonica*. *J Vet Med Sci* 58: 7-15.

- Tarozzo G, Cappello P, De Andrea M, Walters E, Margolis FL, Oestreicher B & Fasolo A. 1998. Prenatal differentiation of mouse vomeronasal neurones. *Eur J Neurosci* 10: 392-6.
- Touhara K. 2007. Molecular biology of peptide pheromone production and reception in mice. *Adv Genet* 59: 147-71.
- Toyoda F & Kikuyama S. 2000. Hormonal influence on the olfactory response to a female-attracting pheromone, sodefrin, in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol* 126: 239-245.
- Treloar HB, Purcell AL & Greer CA. 1999. Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 413: 289-304.
- Tsui CL. 1946. Development of olfactory organ in *Rana nigromaculata*. *Q J Microsc Sci* 87: 61-90.
- Veeranagoudar DK, Shanbhag BA & Saidapur SK. 2004. Mechanism of food detection in the tadpoles of the bronze frog *Rana temporalis*. *Acta Ethol* 7: 37-41.
- Vera Candioti MF. 2007. Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies: systematic relevance and correlation with feeding habits. *Zootaxa* 1600: 1-175.
- Villinger J & Waldman B. 2008. Self-referent MHC type matching in frog tadpoles. *Proc Biol Sci* 275: 1225-30.
- Vogler C & Schild D. 1999. Inhibitory and excitatory responses of olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles to stimulation with amino acids. *J Exp Biol* 202: 997-1003.
- Wabnitz PA, Bowie JH, Tyler MJ, Wallace JC & Smith BP. 1999. Aquatic sex pheromone from a male tree frog. *Nature* 401: 444-5.
- Waldman B. 1985. Olfactory basis of kin recognition in toad tadpoles. *J Comp Physiol A* 156: 565-577.
- Wang D, Chen P, Jiang XC & Halpern M. 1988. Isolation from earthworms of a proteinaceous chemoattractant to garter snakes. *Arch Biochem Biophys* 267: 459-66.

- Wang H, Zhao H, Tai F & Zhang Y. 2008. Postembryonic development of the olfactory and vomeronasal organs in the frog *Rana chensinensis*. *Zoolog Sci* 25: 503-8.
- Weber P, Vogel C, Lang C & Baldisserotto B. 2012. Antipredator and alarm reaction responses of silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to waterborne ammonia. *Neotrop Ichthyol* 10: 445-450.
- Wells KD. 2007. The Ecology and Behavior of Amphibians. *The University of Chicago Press, Chicago* 60637.
- Werner EE & Anholt B. 1993. Ecological consequences of the trade-off between growth and predation mortality rates mediated by foraging activity. *Am Nat* 142: 242-272.
- Wirsig-Wiechmann CR, Houck LD, Feldhoff PW & Feldhoff RC. 2002. Pheromonal activation of vomeronasal neurons in plethodontid salamanders. *Brain Res* 952: 335-44.
- Wysocki CJ, Wellington JL & Beauchamp GK. 1980. Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science* 207: 781-783.
- Xu F, Schaefer M, Kida I, Schafer J, Liu N, Rothman DL, Hyder F, Restrepo D & Shepherd GM. 2005. Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Comp Neurol* 489: 491-500.
- Yates D. 2012. Neural development: Clustering connections. *Nat Rev Neurosci* 13: 74-5.
- Yvroud M. 1966. Développement de l'organe olfactif et des glandes annexes chez *Alytes obstetricans* Laurenti au cours de la vie larvaire et de la métamorphose. *Archives d'Anatomie microscopique* 55: 387-410.
- Zhao X & Chivers DP. 2005. Response of juvenile goldfish (*Carassius auratus*) to chemical alarm cues: relationship between response intensity, response duration and the level of predation risk. En: *Chemical signals in vertebrates*. R. T. Mason, M. LeMaster and D. Müller-Schwarze. New York, Plenum Press: 334-341.

