



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Irene
Ortiz Leal

Tesis doctoral

Neuroanatomía comparada de
la comunicación química en
cánidos: un estudio de los
sistemas vomeronasal y olfativo
principal en perro, lobo y zorro

Lugo, 2024



TESIS DOCTORAL

**NEUROANATOMÍA COMPARADA DE LA
COMUNICACIÓN QUÍMICA EN CÁNIDOS: UN ESTUDIO DE
LOS SISTEMAS VOMERONASAL Y OLFATIVO PRINCIPAL
EN PERRO, LOBO Y ZORRO**

Irene Ortiz Leal

Director: Pablo Sánchez Quinteiro

Tutor: Pablo Sánchez Quinteiro

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO



Yo, Irene Ortiz Leal, autora de esta tesis doctoral titulada *Neuroanatomía comparada de la comunicación química en cánidos: un estudio de los sistemas vomeronasal y olfativo principal en perro, lobo y zorro*

, declaro que:

- Esta tesis doctoral no presenta conflictos de interés.
- Todas las imágenes incluidas son originales y de elaboración propia.

En Lugo, a 22 de febrero de 2024

Fdo: Irene Ortiz Leal

El verdadero objetivo de la ciencia es descubrir e iluminar la verdad.

Rachael Carson

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento, uno se para a pensar en todas las personas a las que agradecer su implicación y apoyo durante esta etapa larga pero fructífera. No obstante, sin lugar a duda, debo mencionar en primer lugar al principal impulsor tanto de este proyecto como de mi pasión por la investigación: mi mentor, mi amigo y compañero científico, Pablo. Es gracias a él que nace este proyecto, gracias a su pasión por la vida, por la investigación y sobre todo por la docencia. Persona trabajadora, resiliente, alegre, jovial, y amable incluso en los momentos más duros y tensos. Gracias de corazón por estar siempre ahí y por tu apoyo incondicional.

Gracias también a mis compañeros de doctorado: Mateo, Sara, y Dori, con los cuales he pasado momentos inolvidables, y que han estado siempre dispuestos a ayudarme en todo lo que he necesitado.

Gracias a todos los estudiantes que han pasado por el departamento de anatomía, bien sea para hacer el TFG, o las estancias no clínicas. Ha sido de lo más enriquecedor compartir la pasión por la investigación con las nuevas generaciones.

Gracias de corazón también a los compañeros docentes del departamento: Matilde, Patricia, Manolo, Roberto y Nuria, de los que tanto he aprendido, y a los que tengo como referencia desde el inicio de este proyecto.

Gracias a al Prof. Taekyun Shin, a Ana María López Beceiro, a Luis Eusebio Fidalgo Álvarez, a Daniel Barreiro Vázquez, a Jorge Antonio Larriva Sahd y a Víctor Vargas-Barroso por su ayuda en la realización y discusión de los artículos publicados. Es todo un honor haber colaborado con ellos en la publicación de los artículos de esta tesis doctoral.

Mención especial merece Alexandra Elbakyan, por crear y luchar por su proyecto, Sci-Hub, un asombroso acto de altruismo (o una empresa criminal masiva, según a quién se pregunte), pero que sin lugar a duda ha sido un pilar indispensable en este trabajo. Gracias por luchar de verdad por la ciencia abierta.

Gracias a mi familia por su apoyo incondicional. En particular a mi padre, que me inculcó desde pequeña el amor por la ciencia, a mi madre, por su alegría, cariño y apoyo constantes, y a mi hermana por estar siempre ahí. Gracias también a mis tíos; María Paz, Gloria, José María, Álvaro, María Dolores, Isi, Alicia y Mari Carmen, y a mis primos, por creer en mí. Gracias a mis abuelos, “El Lelo” y “La Lela”, por su amor, su cariño y su aceptación incondicional en todos los aspectos de la vida.

Gracias a todos mis amigos: en particular, a Joan, a Nuria, a Laura, a Gonzalo, a Virginia, a Aldara, a Alicia, a Max, a Mario, a Carlos y a Mercedes.

Gracias también a la Orquesta Terra Nova de Lugo, por regalarme tantos buenos momentos, risas, y buena música, que supuso un maravilloso contrapunto a los años de esfuerzo.

A mis compañeros/as de la Farmacia Santiago Sánchez Serrano, que fueron como una familia para mí. En especial, gracias a Santiago, y a Rocío.

A mis compañeros/as y alumnos/as del CIFP Politécnico de Lugo. En especial a Loli, a Vanessa, a Vania, a Tania y a Juan, por ser además de compañeros, amigos. Y especial mención a Juan José Rodríguez Prieto y a Antonio Ibáñez Burgos, por apoyarme siempre y facilitar que compaginase mis estudios de doctorado con la docencia en dicho centro, siempre que estuvo en su mano.

Finalmente, gracias a todas las personas que, a pesar de no haber nombrado, han formado parte de este proyecto y de mi vida. A todos, gracias.

ABREVIATURAS

AA: Azul Alcían	MUP: Proteínas urinarias mayores
BO: Bulbo olfativo	NSO: Neuronas sensoriales olfativas
BOA: Bulbo olfativo accesorio	NVN: Nervios vomeronasales
BOP: Bulbo olfativo principal	OMP: Proteína marcadora olfativa
BSA: Albúmina de suero bovino	OS: Órgano septal
BSI-B4: <i>Bandeiraea simplicifolia</i> isolectina B4	OVN: Órgano vomeronasal
CB: Calbindina	PAS: Ácido peryódico de Schiff
CMG: Complejo macrogglomerular	PC: Placa cribiforme
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad	PHA-E: <i>Phaseolus vulgaris</i> aglutinina-E
Con A: Concanavalina A	PHA-L: <i>Phaseolus vulgaris</i> aglutinina-L
CQS: Células quimiosensoriales	PGP 9.5: Producto del gen de la proteína 9.5
CR: Calretinina	PV: Parvalbúmina
DAB: Diaminobencidina	RO: Receptores olfativos
DBA: <i>Dolichos Biflorus</i> aglutinina	RV: Receptores vomeronasales
DSL: <i>Datura stramonium</i> aglutinina	SBA: Aglutinina del haba de soja
EOP: Epitelio olfativo principal	SG: Secretagoguina
ER: Epitelio respiratorio	SOP: Sistema olfativo principal
ES: Epitelio sensorial	STA: <i>Solanum tuberosum</i> aglutinina
FPR: Receptores de péptidos de formilo	SVN: Sistema vomeronasal
GG: Ganglio de Grüneberg	TC: Tomografía computerizada
GAP-43: Proteína 43 asociada al crecimiento	TOL: Tracto olfativo lateral
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial	TRPC2: <i>Transient receptor potential</i>
GFP: Proteína verde fluorescente	UEA: <i>Ulex europaeus</i> aglutinina
GV: Glándulas vomeronasales	V1R: Receptores vomeronasales tipo 1
HE: Hematoxilina-eosina	V2R: Receptores vomeronasales tipo 2
HRP: Peroxidasa de rábano picante	VVA: <i>Vicia villosa</i> aglutinina
LEA: <i>Lycopersicon esculentum</i> aglutinina	WGA: Lectina del germen de trigo, <i>Tricum vulgaris</i>
MAP2: Proteína 2 asociada a microtúbulos	

ÍNDICE

RESUMEN	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Comunicación química en los cánidos	12
1.1.1 Señales químicas	12
1.1.2 Etología.....	14
1.1.3 Órganos exocrinos responsables de la secreción de señales químicas	18
1.2 Sistemas responsables de detección de semioquímicos	23
1.2.1. Sistema olfativo principal	24
1.2.2. Órgano septal	24
1.2.3. Ganglio de Grüneberg (GG).....	25
1.2.4. Complejo glomerular en rosario (Necklace glomerular complex)	26
1.2.5. Neuronas guanilil-ciclasa.....	28
1.2.6. Limbo olfativo.....	29
1.2.7. Formaciones sub-bulbares	29
1.2.8 Sensibilidad del trigémino.....	29
1.3 Sistema vomeronasal	30
1.3.1 Anatomía del órgano vomeronasal.....	30
1.3.2 Receptores vomeronasales y transducción sensorial	32
1.3.3 Anatomía del bulbo olfativo accesorio	34
1.3.4 Neuroquímica del sistema vomeronasal.....	40
1.4 Diversidad morfofuncional en los distintos órdenes de mamíferos	42
1.4.1 Rodentia	42
1.4.2 Lagomorpha	45
1.4.3 Marsupialia.....	46
1.4.4 Orden Monotremata.....	47
1.4.5 Primates	47
1.4.6 Artiodactila	47
1.4.7 Perissodactyla: caballos	52
1.4.8 Chiroptera (murciélagos).....	52
1.4.9 Carnivora	52
1.5 Sistema vomeronasal de los cánidos	54

1.5.1 Anatomía macroscópica y microscópica	54
1.5.2 Estudio comparado entre cánidos salvajes y domésticos.....	57
1.5.3 Efectos de la domesticación: el modelo de la domesticación del zorro	58
2. OBJETIVOS	63
3. MATERIAL Y MÉTODOS	66
3.1 Extracción y disección de las muestras	66
3.1.1. Cavidad nasal.....	67
3.1.2 Órganos y nervios vomeronasales	67
3.1.3 Bulbos olfativos principales y accesorios	67
3.2 Procesamiento y corte de las muestras	68
3.3 Tinciones histológicas.....	68
3.3.1 Tinciones generales	69
3.3.2 Tinciones específicas	69
3.4 Tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas.....	71
3.4.1. Tinciones histoquímicas – marcaje con lectinas	71
3.4.2. Tinciones inmunohistoquímicas.....	72
3.4.3. Doble tinción inmunohistoquímica	72
3.5 Escáner con tomografía computerizada	74
3.6 Adquisición de imágenes y tratamiento digital.....	74
4. PUBLICACIONES.....	75
4.1 publicación número 1.....	76
4.2 publicación número 2.....	95
4.3 publicación número 3.....	113
4.4 publicación número 4.....	139
4.5 publicación número 5.....	160
5. DISCUSIÓN.....	190
5.1 Órgano vomeronasal en el zorro.....	190
5.2 Bulbo olfativo accesorio del zorro.....	197
5.3 Limbo olfativo del zorro	201
5.4 Órgano vomeronasal en el lobo	205
5.5 Bulbo olfatorio principal del perro, lobo y zorro.....	213
6. CONCLUSIONES	216
7. BIBLIOGRAFÍA	217

RESUMEN

Esta tesis se centra en desentrañar las bases anatómicas, histológicas y morfofuncionales de la comunicación química a través de feromonas y olores en cánidos, tanto salvajes como domésticos. Se ha puesto especial énfasis en caracterizar los sistemas olfativos, incluyendo el órgano vomeronasal y los bulbos olfativos principal y accesorio, para así poder identificar diferencias y similitudes entre especies como el perro, el lobo, y el zorro. Un objetivo adicional ha sido dilucidar cómo el proceso de domesticación ha influenciado la evolución de estos sistemas sensoriales en los perros, y si las características observadas en ellos son exclusivas o compartidas con cánidos salvajes. Para ello, hemos realizado técnicas de anatomía macroscópica y microscópica, macro y micro disecciones, y diversas tinciones histológicas, tanto de rutina (Hematoxilina-eosina, Nissl) como específicas de cada uno de los elementos estructurales que conforman el OVN (PAS, Azul Alcían, tricrómico de Gallego) y el BOA (Tolivia, Bielschowsky). Adicionalmente, realizamos una caracterización neuroquímica de ambas estructuras mediante un número considerable de marcadores histoquímicos (lectinas) e inmunohistoquímicos.

A través del análisis exhaustivo de las muestras obtenidas, hemos concluido que los órganos vomeronasales del lobo y del zorro presentan diferencias significativas en comparación con el perro doméstico, especialmente en la expresión de proteínas como la Gαo, lo cual indica una funcionalidad efectiva de los receptores vomeronasales V2R en cánidos salvajes. Esto se complementa con el hallazgo de que el órgano vomeronasal del lobo tiene un desarrollo avanzado de la bomba vascular y una notable y atípica acumulación de células en posición basal, sugiriendo mecanismos de integración de señales olfativas aún desconocidos. El bulbo olfativo accesorio del zorro demuestra un grado de diferenciación y desarrollo mucho mayor que el observado en lobos y, especialmente, en perros. Esto incluye una clara distinción entre capas y el desarrollo de células mitrales, indicando un sistema de procesamiento de señales olfativas altamente complejo. A pesar de estas diferencias, se observó una conservación en el patrón de expresión de glicoconjugados entre las tres especies, sugiriendo cierta uniformidad en los sistemas olfativos. La presencia de un limbo olfativo en el zorro, actuando como una zona de transición entre los sistemas olfativos principal y accesorio, destaca por su complejidad y especificidad neuroquímica, sugiriendo adaptaciones únicas para la percepción olfativa. Finalmente, la investigación muestra una marcada diferencia en la celularidad y estratificación del bulbo olfativo principal entre cánidos salvajes y perros domésticos, indicando variaciones en el procesamiento de información olfativa, probablemente ligadas a la domesticación.

En conclusión, la tesis revela una involución morfofuncional en el desarrollo de los subsistemas olfativos en perros domésticos en comparación con sus ancestros salvajes, probablemente como resultado de la domesticación. Este estudio no solo aporta conocimiento sobre las diferencias estructurales y funcionales entre cánidos domésticos y salvajes, sino que también ofrece información sobre la adaptación y evolución de sus sistemas olfativos, abriendo caminos para futuras investigaciones en la biología de la conservación y la comprensión de la compleja relación entre domesticación, adaptación y evolución sensorial.

RESUMO

Esta tese céntrase en desentrañar as bases anatómicas, histolóxicas e morfofuncionais da comunicación química a través de feromonas e olores en cánidos, tanto salvaxes como domésticos. Púxose especial énfase en caracterizar os sistemas olfativos, incluíndo o órgano vomeronasal e os bulbos olfativos principal e accesorio, para así poder identificar diferenzas e similitudes entre especies como o can, o lobo e o raposo. Un obxectivo adicional foi dilucidar como o proceso de domesticación influíu na evolución destes sistemas sensoriais nos cans, e se as características observadas neles son exclusivas ou compartidas con cánidos salvaxes. Para iso, realizamos técnicas de anatomía macroscópica e microscópica, macro e micro diseccións, e diversas tinguiduras histolóxicas, tanto de rutina (Hematoxilina-eosina, Nissl) como específicas de cada un dos elementos estruturais que conforman o OVN (PAS, Azul Alcían, tricómico de Gallego) e o BOA (Tolivia, Bielschowsky). Adicionalmente, realizamos unha caracterización neuroquímica de ambas estruturas mediante un número considerable de marcadores histoquímicos (lectinas) e inmunohistoquímicos.

A través da análise exhaustiva das mostras obtidas, concluímos que os órganos vomeronasais do lobo e do raposo presentan diferenzas significativas en comparación co can doméstico, especialmente na expresión de proteínas como a Gao, o cal indica unha funcionalidade efectiva dos receptores vomeronasais V2R en cánidos salvaxes. Isto complétase co achado de que o órgano vomeronasal do lobo ten un desenvolvemento avanzado da bomba vascular e unha notable e atípica acumulación de células en posición basal, suxerindo mecanismos de integración de sinais olfativas aínda descoñecidos. O bulbo olfativo accesorio do raposo demostra un grao de diferenciación e desenvolvemento moito maior que o observado en lobos e, especialmente, en cans. Isto inclúe unha clara distinción entre capas e o desenvolvemento de células mitrais, indicando un sistema de procesamento de sinais olfativas altamente complexo. A pesar destas diferenzas, observouse unha conservación no patrón de expresión de glicoconxugados entre as tres especies, suxerindo certa uniformidade nos sistemas olfativos. A presenza dun limbo olfativo no raposo, actuando como unha zona de transición entre os sistemas olfativos principal e accesorio, destaca pola súa complexidade e especificidade neuroquímica, suxerindo adaptacións únicas para a percepción olfativa. Finalmente, a investigación mostra unha marcada diferenza na celularidade e estratificación do bulbo olfativo principal entre cánidos salvaxes e cans domésticos, indicando variacións no procesamento de información olfativa, probablemente ligadas á domesticación.

En conclusión, a tese revela unha involución morfofuncional no desenvolvemento dos subsistemas olfativos en cans domésticos en comparación cos seus ancestros salvaxes, probablemente como resultado da domesticación. Este estudo non só aporta coñecemento sobre as diferenzas estruturais e funcionais entre cánidos domésticos e salvaxes, senón que tamén ofrece información sobre a adaptación e evolución dos seus sistemas olfativos, abrindo camiños para futuras investigacións na bioloxía da conservación e a comprensión da complexa relación entre domesticación, adaptación e evolución sensorial.

ABSTRACT

This thesis focuses on unraveling the anatomical, histological, and morphofunctional bases of chemical communication through pheromones and odors in canids, both wild and domestic. Special emphasis was placed on characterizing the olfactory systems, including the vomeronasal organ and the main and accessory olfactory bulbs, in order to identify differences and similarities between species such as the dog, the wolf, and the fox. An additional goal was to elucidate how the domestication process has influenced the evolution of these sensory systems in dogs, and whether the characteristics observed in them are exclusive or shared with wild canids. For this purpose, we conducted macroscopic and microscopic anatomy techniques, macro and micro dissections, and various histological stainings, both routine (Hematoxylin-eosin, Nissl) and specific for each of the structural elements that make up the VNO (PAS, Alcian Blue, Gallego's trichrome) and the AOB (Tolivia, Bielschowsky). Additionally, we carried out a neurochemical characterization of both structures using a considerable number of histochemical (lectins) and immunohistochemical markers.

Through the exhaustive analysis of the obtained samples, we concluded that the vomeronasal organs of the wolf and the fox present significant differences compared to the domestic dog, especially in the expression of proteins such as G α o, which indicates an effective functionality of the V2R vomeronasal receptors in wild canids. This is complemented by the finding that the wolf's vomeronasal organ has an advanced development of the vascular pump and a notable and atypical accumulation of cells in basal position, suggesting mechanisms of olfactory signal integration still unknown. The accessory olfactory bulb of the fox demonstrates a degree of differentiation and development much greater than that observed in wolves and, especially, in dogs. This includes a clear distinction between layers and the development of mitral cells, indicating a highly complex olfactory signal processing system. Despite these differences, a conservation in the expression pattern of glycoconjugates was observed among the three species, suggesting a certain uniformity in the olfactory systems. The presence of an olfactory limbus in the fox, acting as a transition zone between the main and accessory olfactory systems, stands out for its complexity and neurochemical specificity, suggesting unique adaptations for olfactory perception. Finally, the research shows a marked difference in the cellularity and stratification of the main olfactory bulb between wild canids and domestic dogs, indicating variations in olfactory information processing, likely linked to domestication.

In conclusion, the thesis reveals a morphofunctional involution in the development of the olfactory subsystems in domestic dogs compared to their wild ancestors, likely as a result of domestication. This study not only provides knowledge about the structural and functional differences between domestic and wild canids but also offers insight into the adaptation and evolution of their olfactory systems, paving the way for future research in conservation biology and understanding the complex relationship between domestication, adaptation, and sensory evolution.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 COMUNICACIÓN QUÍMICA EN LOS CÁNIDOS

1.1.1 Señales químicas

La supervivencia de los individuos, y por lo tanto, de la propia especie, depende en gran medida de la capacidad de adaptación de estos al medio ambiente. Para ello, la evolución ha dotado a los animales, y en particular, a los mamíferos, de los sistemas sensoriales. Estas estructuras altamente especializadas permiten la percepción de los estímulos provenientes del entorno, posibilitando la constante adaptación a éste. Los sentidos físicos, como la vista o el tacto, han gozado históricamente de una mayor popularidad y han sido más ampliamente estudiados en comparación con los sentidos químicos, como el olfato o el gusto. No obstante, los sentidos químicos, y en particular los subsistemas olfativos, gobiernan aspectos de vital importancia en los animales los cuales contribuyen a su supervivencia, tales como la comunicación entre individuos (Woszczyło et al. 2020), los comportamientos sociales (Itakura et al. 2022), la reproducción (Osakada et al. 2018) o el reconocimiento maternal (Del Cerro 1998).

La comunicación química entre individuos se basa en la producción de señales químicas denominadas semioquímicos, producidos por los organismos, liberadas al medio mediante secreciones, y reconocidos por los sistemas olfativos de los animales. Estas señales químicas son capaces de modificar el comportamiento animal e inducir respuestas relacionadas con la jerarquía social, la relación de parentesco o referentes al estado de salud y reproductivo del emisor.

Los semioquímicos pueden clasificarse en función de su rango de acción (Brown et al. 1970). Así, si ejercen la acción entre individuos pertenecientes a la misma especie se denominan feromonas. Si la acción se ejerce entre individuos que pertenecen a especies distintas, se denominan aleloquímicos. A continuación, se tratan ambos términos.

1.1.1.1. Aleloquímicos

Los aleloquímicos, dependiendo de la función que ejercen, se clasifican en kairomonas, sinomonas y alomonas. Las kairomonas son compuestos químicos secretados por una especie, pero reconocidos por individuos de una especie diferente, proporcionando un beneficio únicamente para el receptor. De esta manera, sustancias químicas secretadas por individuos de una determinada especie suponen una oportunidad para determinados organismos, que han evolucionado para interceptarlas y descifrar la información que almacenan, utilizándose, así, como kairomonas. Por otra parte, las alomonas proporcionan beneficio únicamente al emisor de la señal química, sin beneficiar al organismo que las detecta. Por último, las sinomonas proporcionan un beneficio mutuo entre el secretor y el receptor, en una relación de mutualismo

(Wyatt 2013; Bakthavatsalam 2016). Es importante señalar que estos términos no son mutuamente excluyentes, y en ocasiones los efectos pueden solaparse. Por ejemplo, existen moléculas utilizadas como feromonas por una especie determinada, pero utilizadas como kairomonas por otra especie distinta.

1.1.1.2. Feromonas

Como se ha mencionado anteriormente, los semioquímicos transmiten información entre individuos pertenecientes a la misma especie (feromonas), o a especies diferentes (aleloquímicos). Las feromonas son señales químicas intraespecíficas que fueron inicialmente definidas como “sustancias secretadas al medio externo por un individuo y recibidas por un segundo individuo de la misma especie, en la cual se desencadena una reacción específica” (Karlson y Lüscher 1959). No obstante, existe en algunos animales, como excepción a la norma, una convergencia bioquímica en el uso de feromonas entre distintas especies. Este fenómeno se ha observado en hormigas, abejas, polillas y algunos mamíferos, donde en algunos casos la misma molécula o una molécula estructuralmente similar cumple funciones análogas en distintas especies (Rasmussen et al. 1996).

La mayoría de las feromonas no son compuestos únicos, sino más bien, una combinación de moléculas en una ratio determinada, específica para cada especie animal. Esta combinación, además, atiende a los principios del sinergismo: los componentes individuales de una feromona tienen un mayor efecto en conjunto que de forma aislada. A esta combinación de moléculas se le denomina “feromona multicomponente”. Las moléculas de una feromona multicomponente no tienen por qué ser excepcionales en sí mismas, ya que es la combinación concreta de la mezcla la que aporta la especificidad. Así, la mayor parte de la especificidad de las feromonas se consigue a través de estas combinaciones únicas de compuestos, que actúan en sinergia para desempeñar su función (Wyatt, 2013).

La naturaleza química de las feromonas varía considerablemente entre especies, y depende en gran medida de la función que ejerza la feromona, y del medio en el que se libere. De este modo, la volatilidad o la solubilidad en agua de las distintas moléculas será variable: por ejemplo, las feromonas utilizadas como señales de alarma, en distintos insectos como las hormigas, poseen una naturaleza altamente volátil, diseminándose rápidamente en el ambiente una vez que el peligro ha desaparecido. En los entornos acuáticos, la solubilidad de las moléculas en agua cumple una función análoga a la volatilidad en el aire, asegurando que las señales químicas se diseminen eficazmente a través del medio (Mollo et al. 2014).

De igual manera, a diferencia de las señales visuales o auditivas, que sólo poseen efecto en el momento de su emisión, los mensajes químicos pueden perdurar en el ambiente tras su liberación. La evolución puede modular estas señales químicas, ajustando la solubilidad o volatilidad de las feromonas, modificando de esta forma su duración en el ambiente. Esto resulta en una permanencia en el ambiente que puede variar desde unos pocos segundos hasta meses e incluso años.

U Dos características prototípicas de las feromonas es que generalmente son “innatas” y “anónimas”. Por un lado la respuesta a una feromona suele ser innata, lo que implica que en la mayoría de los casos, los animales reaccionan a estas señales químicas sin necesidad de aprendizaje previo. Sin embargo, esta regla no es absoluta, ya que en algunos casos existen

feromonas que requieren un proceso de aprendizaje para su reconocimiento. Adicionalmente, las feromonas pueden considerarse “anónimas”, es decir, una determinada feromona es idéntica en todos los individuos de una misma especie para un estado fisiológico determinado, y lleva asociado un mensaje único, independiente del individuo emisor. No obstante, aunque la composición es uniforme, la cantidad de feromona producida puede variar entre individuos, o incluso dentro del mismo individuo a lo largo del tiempo (Hölldobler y Carlin 1987).

Existen dos tipos de efectos desencadenados por las feromonas: **efectos liberadores y efectos promotores**. Estos términos fueron inicialmente introducidos por Wilson y Bossert (1963) y todavía en la actualidad son ampliamente utilizados. Respecto a los efectos liberadores, las feromonas inducen un comportamiento inmediato como respuesta a la feromona, mientras que, en el caso de los efectos promotores, la exposición a las feromonas produce en el individuo receptor una modificación en el desarrollo o en la fisiología de larga duración, que a veces va acompañado de un cambio hormonal. Estos términos, no obstante, no son excluyentes, y algunas feromonas pueden desencadenar ambas respuestas. Debido, por ello, a que los efectos liberadores y cebadores a menudo se presentan en un espectro continuo, Wyatt (2013), propone la terminología de “efecto” liberador, o cebador, en contraposición a la terminología de “feromona” liberadora o promotora.

1.1.2 Etología

Como se ha mencionado brevemente, el sistema vomeronasal juega un papel crucial en la regulación de las conductas y el comportamiento socio-sexual de los animales (Wysocki y Lepri 1991). Por ejemplo, media el comportamiento agresivo en determinados animales (Chamero et al. 2007), el comportamiento maternal (Elwood y Stolzenberg 2020), o el comportamiento sexual en los mamíferos (Kimchi et al. 2007). Esta relación posee una base anatómica, ya que este sistema se vincula en el encéfalo con la amígdala y el hipotálamo, estructuras claves en la mediación del comportamiento animal (Gutiérrez-Castellanos et al. 2014).

Cabe mencionar el comportamiento de “Flehmen”. Éste es un patrón comportamental que se ha observado en prácticamente la totalidad de los ungulados y en algunos félidos, expresado cuando los individuos se exponen a determinados compuestos químicos en el ambiente, como pueden ser olores o compuestos que potencialmente puedan actuar como feromonas. Durante el flehmen, el individuo eleva el labio superior, acompañándose este comportamiento en ocasiones por la abertura parcial de la cavidad oral (Dagg y Taub 1970; Estes 1972; Hart 1983).

1.1.2.1. Comportamiento territorial

El comportamiento territorial, especialmente el expresado a través del marcaje, es un fenómeno ampliamente documentado en una gran variedad de mamíferos y otros vertebrados terrestres (Müller-Schwarze 2006; Font et al. 2012; Villafranca-Faus et al. 2021). Los mamíferos, a pesar de poseer una gran variedad de glándulas odoríferas especializadas, poseen un patrón de marcaje común que implica el uso de secreciones glandulares, orina e incluso heces, que depositan en lugares estratégicos dentro de su territorio, formando a menudo líneas, a modo de fronteras divisorias (Gosling y Roberts 2001). Es notable que los machos realizan un mayor marcaje que las hembras, y en particular, este marcaje se acentúa en machos dominantes, con una mayor intensidad durante la época reproductiva (Wolff y Sherman 2007).

Una ventaja de la señalización de territorios mediante señales químicas es que, a diferencia de otras señales, éstas permanecen en el ambiente, proporcionando su información incluso cuando el animal emisor no está cerca. Aunque en muchos casos su producción posee un gasto metabólico inferior a otro tipo de señales más comunes como las acústicas, no puede obviarse que en muchas especies el marcaje mediante señales químicas posee un coste metabólico alto (Beynon y Hurst 2004), así como un alto coste relativo al tiempo y el riesgo implicados. El marcaje con señales químicas conlleva una gran cantidad de información; como es el caso de la efectividad del individuo para marcar y mantener su territorio, su estatus social, salud y estado nutricional. No obstante, la comunicación química es también utilizada en especies no territoriales, donde puede reflejar la jerarquía social dentro del grupo, indicando dominancia y estatus reproductivo (Pallé et al. 2020).

Hay tres hipótesis principales que buscan explicar la evolución del marcaje territorial mediante señales químicas: la hipótesis de la barrera olfativa hacia posibles intrusos, la hipótesis de la coincidencia de olores y la hipótesis del mantenimiento de las fronteras con los principales rivales (Gosling y Roberts 2001). Adicionalmente, el marcaje en los territorios puede también atraer o estimular a las posibles parejas. No obstante, la hipótesis de la coincidencia de olores es la más aceptada actualmente.

La hipótesis de la coincidencia de olores (“Scent-matching hypothesis”) establece que los intrusos reconocen al propietario del territorio a través de sus huellas olfativas, de tal forma que cuando se encuentran con otro animal con un olor coincidente mostrarán un comportamiento aversivo para evitar confrontaciones que, muy probablemente, perderán (Gosling y Roberts 2001). Este comportamiento se ha observado en los ratones (*Mus musculus*) (Roberts et al. 1996), en el tejón común (*Meles meles*) (Tinneland et al. 2015), en el castor (*Castor canadensis*) (Schulte et al. 1994) o en el zorro (*Vulpes vulpes*) (Macdonald 1979).

1.1.2.2. Comunicación química entre depredador y presa

La depredación es una potente fuerza de selección que da lugar a diversas adaptaciones en las especies de presa. Los animales deben enfrentarse a menudo a los depredadores durante su vida, pues no tener éxito en esta tarea significaría inevitablemente la muerte. Por lo tanto, las especies de presa tienen que adoptar una amplia gama de adaptaciones que permiten reconocer, evitar y defenderse de los depredadores. Estas adaptaciones incluyen respuestas fisiológicas y moleculares que disminuyen el riesgo de ser depredados (Hegab y Wei 2014).

La detección quimiosensorial es un aspecto de gran importancia para la estrategia de evasión de depredadores en muchos mamíferos. Esto implica la habilidad de detectar señales químicas emitidas por los depredadores, tales como las que provienen de la piel y el pelaje, la orina, las heces y las secreciones de las glándulas anales. Estos sistemas de comportamiento antidepredador son fundamentales para la supervivencia (Apfelbach et al. 2005).

El reconocimiento de las señales químicas provenientes de los carnívoros puede provocar en sus potenciales presas comportamientos estereotipados inducidos por el miedo, modificar sus patrones de actividad y la tasa de alimentación, y afectar al sistema neuroendocrino, al comportamiento reproductivo y a la producción reproductiva (Dielenberg y McGregor 2001; Apfelbach et al. 2005; Müller-Schwarze 2006). Así, por ejemplo, Van Beeck Calkoen et al.

(2021) demostraron que las señales olfativas de grandes carnívoros, como el lince y el lobo, modifican el comportamiento del ciervo rojo y la intensidad de su ramoneo.

Existen una serie de características implícitas a las señales químicas que son compartidas a través de varias especies de depredadores (Voznessenskaya 2014). Se sabe que los roedores consanguíneos, que han sido aislados de otras especies en el laboratorio durante cientos de generaciones, responden con un comportamiento defensivo similar al miedo ante los olores de los gatos (Dielenberg y McGregor 2001; Takahashi et al. 2005). Esta respuesta innata sugiere que los mecanismos neuronales de detección en los animales receptores están genéticamente determinados. Para maximizar la especificidad de la advertencia, el receptor puede percibir amenazas potenciales detectando ligandos específicos de todos los posibles animales depredadores. Teniendo en cuenta los circuitos sensoriales necesarios para detectar y procesar cada señal y la probabilidad de que cada individuo sólo se encuentre con un pequeño subconjunto de posibles señales químicas procedentes de depredadores en su vida, esta estrategia requeriría una importante inversión genética que podría quedar en gran medida sin utilizar. Un mecanismo alternativo, más sencillo, puede implicar que los depredadores emitan una señal química común, quizá como consecuencia del metabolismo de los carnívoros, que active un circuito sensorial generalizado en la presa receptora (Fendt 2006).

Así mismo, de la misma manera que existe un mecanismo intrínseco en las presas para detectar señales químicas procedentes de sus depredadores, la generalización de las señales químicas de las presas podría haber facilitado a ciertos depredadores invasores la caza eficiente de una gama variada de especies presa (Price et al. 2020).

1.1.2.3.Reconocimiento de grupos, parientes, familias e individuos en los mamíferos

El reconocimiento de los miembros del grupo, que a menudo son parientes, es un factor importante para la conservación de la especie. Los miembros del grupo suelen verse favorecidos mediante el comportamiento cooperativo (Brennan 2004). Un ejemplo de ello es el cuidado aloparental que exhiben las hienas pardas hacia miembros de su familia, o el reparto de los limitados recursos alimenticios entre familiares observado en el ratón espinoso (Porter y Blaustein 1989). Así mismo, las hembras de ratón utilizan nidos comunales y, aunque parece que amamantan a las crías de las demás de forma indiscriminada, hay pruebas de que es más probable que aniden con individuos cuyo complejo mayor de histocompatibilidad es similar. Esto minimizaría la explotación y la entrega de recursos maternos a individuos no relacionados genéticamente (Manning et al. 1992).

Adicionalmente, la capacidad de reconocer el parentesco es importante como mecanismo para evitar la endogamia, aunque esta capacidad varía entre las especies (Pusey y Wolf 1996). La endogamia puede seleccionar alelos recesivos deletéreos en la población y reduce drásticamente el éxito reproductivo en entornos naturales competitivos (Meagher et al. 2000). Por lo tanto, la elección de una pareja genéticamente diferente tiene ventajas para el éxito reproductivo de un animal. La habilidad de los animales para reconocer el parentesco entre los individuos ha sido demostrada en una gran variedad de especies (Hauber y Sherman 2001; Mateo 2003). Por ejemplo, los lémures de cola anillada (*Lemur catta*) utilizan señales olfativas para estimar con precisión el parentesco, incluso entre parientes lejanos (Charpentier et al. 2008).

Así mismo, los mecanismos de selección de pareja diseñados para evitar la endogamia tienen más probabilidades de desarrollarse en especies en las que los parientes se encuentran cuando son adultos (Pusey y Wolf 1996). Por ejemplo, los ratones comunes (*Mus musculus*) suelen vivir en grupos sociales basados en la familia, con una alta densidad, donde la tasa de encuentro entre parientes es alta, y por lo tanto se requieren mecanismos de reconocimiento social para evitar el apareamiento entre parientes. En cambio, el ratón macedonio (*Mus macedonicus*) vive en densidades mucho más bajas donde el encuentro entre parientes es considerablemente menos frecuente que en el ratón doméstico (Sherborne et al. 2007). El mecanismo propuesto de reconocimiento de parentesco en estos ratones se basa en la variabilidad de las proteínas urinarias. Estas muestran una mayor diversidad en las especies en las que la tasa de encuentro entre parientes es mayor (Cheetham et al. 2007).

En los cánidos, especialmente en los perros, las señales olfativas también son cruciales para el **reconocimiento social** entre individuos conoespecíficos e interespecíficos (Millot 1994). Por ejemplo, los olores conoespecíficos desempeñan un papel fundamental en la señalización del estado reproductivo en los perros. Individuos de ambos sexos pueden discriminar entre los compuestos químicos orgánicos contenidos en la orina, las heces, el saco anal y las secreciones vaginales (Miklosi 2007). Además, los machos pueden reconocer la fase del ciclo ovárico de la hembra detectando señales químicas presentes en su orina (Jeziński et al. 2019).

En cuanto al papel de los olores en relaciones interespecíficas, un ejemplo notable es la reacción de los perros a los olores humanos, ya que existen pruebas claras de que los perros prefieren zonas específicas del cuerpo de los niños para la exploración olfativa, como la cara y las extremidades superiores, lo cual sugiere que los olores producidos en diferentes partes anatómicas podrían proporcionar información específica diferente (Millot et al. 1987; Brisbin y Austad 1991).

Adicionalmente al papel de la comunicación química en el reconocimiento social, las señales quimiosensoriales estimulan en los mamíferos la excitación y el comportamiento sexual de los machos. El sistema olfativo principal desempeña un papel crucial para atraer a los machos hacia las hembras en celo, y los receptores vomeronasales son importantes para la activación de las vías olfativas accesorias, desencadenando el comportamiento de apareamiento de manera sexualmente dimórfica (Keverne 2004).

1.1.2.4. Comportamiento maternal

En muchos mamíferos, la comunicación quimiosensorial es una de las principales vías por las cuales los individuos de una misma especie se influyen mutuamente en su fisiología y comportamiento (Wysocki et al. 1982). El comportamiento maternal es una conducta que precisa una integración adecuada entre los estímulos externos y los procesos internos. Una vez establecido, este comportamiento puede ser activado por una amplia diversidad de señales sensoriales (Martín-Sánchez et al. 2015). Las señales específicas que provocan respuestas maternales varían entre especies (Lévy et al. 2004). En los mamíferos, existe una íntima relación social entre la madre y su cría, necesaria para completar el desarrollo de ésta fuera del útero. En las crías, este vínculo comienza al nacer e implica los olores de su madre, de sus hermanos y de la zona de anidamiento. La madre, a su vez, aprende a reconocer los olores de sus crías. En los roedores, el sentido del olfato desempeña un papel importante en la expresión

y el mantenimiento del comportamiento social y, especialmente, en el comportamiento parental (Corona y Lévy 2015).

1.1.2.5. Agresividad

Las interacciones sociales en muchas especies incluyen manifestaciones de agresividad. La conveniencia de este comportamiento depende en gran medida de la identificación del adversario como una amenaza potencial, un competidor sexual o un intruso territorial. Este reconocimiento implica con frecuencia la detección de señales químicas percibidas por los sistemas olfativo y/o vomeronasal (Halpern y Martínez-Marcos 2003).

La implicación del sistema vomeronasal (SVN) en este reconocimiento ha sido ampliamente demostrada por varios estudios. Por ejemplo, la ablación genética del canal TRP2 impide que las feromonas induzcan potenciales de acción en la vía primaria del sistema vomeronasal. Los ratones macho con este defecto genético no muestran agresividad hacia otros ratones macho (Leypold et al. 2002). Sin embargo, las hembras mutantes muestran un comportamiento sexual típico de los machos, como intentos de monta, empuje pélvico e investigación olfativa anogenital (Kimchi et al. 2007). Además, la extirpación del órgano vomeronasal reduce notablemente el comportamiento agresivo de los ratones macho (Maruniak et al. 1986) y elimina el comportamiento agresivo de los ratones hembra lactantes (Bean y Wysocki 1989). Asimismo, se ha demostrado que las proteínas presentes en la orina actúan como feromonas que median a través del SVN las agresiones entre machos (Chamero et al. 2007) y que la subpoblación de neuronas vomeronasales que expresan *Gao* es esencial para la agresión territorial macho-macho y la agresión maternal en ratones (Chamero et al. 2011).

La implicación del SVN en el comportamiento agresivo varía según la especie, el sexo, las condiciones reproductivas y, probablemente, bajo diferentes condiciones de experimentación. Además, el SVN puede afectar al comportamiento agresivo de forma indirecta al alterar los niveles hormonales; por lo tanto, hay que ser cauteloso a la hora de interpretar estos resultados como puramente indicativos de una alteración del sistema sensorial (Halpern y Martínez-Marcos 2003).

1.1.2.6. Especiación

Por último, el estudio del SVN no sólo posee especial relevancia desde una perspectiva anatómica y fisiológica en los mamíferos, sino también para comprender los procesos de especiación originados por la acción del impulso sensorial (“sensory drive”) (Endler 1992). Según esta teoría, el aislamiento reproductivo emerge de la evolución divergente de las señales utilizadas en la selección de parejas sexuales, adaptándose a nuevos entornos donde una señal preexistente pasa a perder su eficiencia (Pincheira-Donoso & Hunt, 2017).

1.1.3 Órganos exocrinos responsables de la secreción de señales químicas

Las glándulas odoríferas, órganos tegumentarios especializados de los que emanan sustancias semioquímicas, no son más que evoluciones de las estructuras básicas de la piel. El nivel de especialización varía considerablemente, desde casos donde solo hay una concentración mayor de lo normal de glándulas sebáceas y/o apocrinas en ciertas áreas, hasta estructuras con características anatómicas o bioquímicas altamente sofisticadas. En algunos casos, se han desarrollado estructuras que promueven la actividad microbiana, potenciando así

la producción de moléculas químicas microbianas a partir de productos primarios de la piel (Albone y Shirley 1984).

La mayoría de las especies de mamíferos cuentan con grupos de glándulas cutáneas especializadas, y muchas presentan diferentes tipos de glándulas odoríferas distribuidas en varias regiones de su superficie corporal. Se ha identificado la presencia de glándulas odoríferas en 15 de los 18 órdenes de mamíferos, y cada vez que se realizan análisis minuciosos aparecen nuevos estudios. La amplia presencia de estos órganos subraya su significativa importancia para los mamíferos (Mykutowycz 1972).

La ubicación de las glándulas cutáneas de los mamíferos varía según el estilo de vida de la especie. En la cabeza, se encuentran en regiones como la frontal, occipital, temporal, bucal, retrocorneal, infraorbital, submandibular, en los labios o en la órbita del ojo. Muchas especies poseen glándulas en varias zonas de las extremidades: intradigitales, plantares, metacarpianas y metatarsales, mientras que en el tronco del cuerpo se localizan en áreas dorsales, lumbares, intercostales, supracaudales, abdominales, torácicas y anales (Mykutowycz 1972).

Muchos de estos complejos glandulares han sido descritos anatómicamente (Bradley y Stoddart 1993; Hraste y Stojković 1995; McLean 2014), y muchos patrones de comportamiento de marcaje olfativo en los que los productos de estas y otras fuentes semioquímicas se depositan en el medio ambiente han sido objeto de estudio detallado (Maras y Petrulis 2008; Jezierski et al. 2018). Adicionalmente, se han analizado varios compuestos producidos por estas estructuras, clasificándose comúnmente en categorías como ácidos grasos de cadena larga y compuestos afines; terpenoides derivados de intermediarios en la ruta biosintética del colesterol; esteroides; sustancias derivadas por acción microbiana y alcoholes (Buesching et al. 2002; McLean et al. 2012).

Concretamente, en los ungulados de los órdenes Artiodáctila y Perisodáctila, se han estudiado las fuentes de semioquímicos implicados en esta señalización química, incluyendo la orina, las heces y una gran variedad de secreciones cutáneas especializadas. Por ejemplo, en los ciervos (*Odocoileus hemionus*, subespecies *columnianus* y *hemionus*), ambas subespecies poseen glándulas odoríferas muy similares. Entre estas los órganos tarsales, metatarsales e interdigitales son los más activamente implicados en la comunicación química (Albone y Shirley 1984).

1.1.2.7. Glándula metatarsal

La glándula metatarsal es un área de piel altamente modificada, que se localiza postero-lateralmente en la región metatarsiana (Quay 1959). Diversos estudios han comprobado que la naturaleza de la secreción de esta glándula es compatible con su actividad como semioquímico. En concreto, en el ciervo “sika” (*Cervus nippon*), el análisis químico de la secreción de la glándula metatarsal evidenció 35 tipos de compuestos volátiles, incluyendo varios tipos de ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas y colesterol. Aunque algunos de estos compuestos son comunes a distintos tipos de ciervos, se encontraron compuestos únicos en esta especie, que no habían sido previamente caracterizados en ninguna especie de cérvido, indicando la posible implicación de estos compuestos en la comunicación química específica en esta especie (Wood 2003). Otro estudio del mismo autor (Wood 1997) comprobó la presencia de dos compuestos con potencial semioquímico en la glándula metatarsal del antílope *Aepyceros melampus*. Las

secreciones de esta glándula han sido asociadas con señales feromonales de alarma entre conoespecíficos (Müller-Schwarze 1971; Carroll 1998).

1.1.2.8. Glándula tarsal

La glándula tarsal de los cérvidos, muy llamativamente en el ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) está cubierta por un mechón de pelo tarsal. Los pelos centrales de este mechón son cortos y rígidos en comparación con el pelo exterior del mechón y con el resto del pelo del cuerpo del ciervo y presentan características únicas como son grandes cámaras entre las escamas cuticulares y crestas en forma de peine, facilitando la retención de lípidos y compuestos volátiles. Esto facilita la acumulación sobre ellos de una mezcla de compuestos sebáceos y urinarios de fuerte olor, y con potencial acción semioquímica. Müller-Schwarze, Volkman y Zemanek (1977) fueron los primeros en proponer el término "osmetrichia" para describir los pelos especializados en la dispersión de compuestos implicados en la comunicación química. Este término fue posteriormente utilizado por diversos autores, que encontraron pelos con características similares en otras especies, y en otras glándulas distintas de las tarsales, como en las zonas glandulares del hocico de algunos tipos de murciélagos (*Mops condylurus* y *Chaerephon pumilus*) (Bouchard 2001), en la glándula esternal del antequino pardo (*Antechinus stuartii*) (Toftgaard y Bradley 1999), o, de forma similar al ciervo de cola negra, en la glándula tarsal e interdigital del cérvido corzuela parda (*Mazama gouazoubira*) (Ajmat et al. 1999).

No se han encontrado rasgos comparables en el pelo que cubre la glándula metatarsal del ciervo de cola negra, la glándula tarsal del ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus borealis*); la glándula subauricular del berrendo (*Antilocapra americana*); en el cuero cabelludo, la axila y el vello púbico del *Homo sapiens*; o el pelo de la glándula ventral del jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*).

1.1.2.9. Glándula caudal

La glándula caudal se localiza en la cola, de la base hasta la punta, tanto ventralmente como lateralmente, y consiste en, mayoritariamente, tejido secretor apocrino, y en menor medida tejido sebáceo. Las glándulas sudoríferas apocrinas predominan tanto por su número como por su tamaño. Son numerosas y grandes en la piel ventral caudal, pero también están bien desarrolladas bilateralmente, a lo largo de ambos lados de la cola. El mayor grosor de la capa de glándulas apocrinas se observa en o cerca de la punta de la cola ventralmente (Müller-Schwarze, Quay, et al. 1977; Albone y Shirley 1984).

La glándula caudal desempeña un papel importante en cuatro ámbitos de comportamiento diferentes: encuentros sociales de individuos previamente separados, comportamiento sexual, comportamiento maternal y situaciones de alarma. En los encuentros sociales, la reacción olfativa más común es olfatear la cola de otro congénere, especialmente cuando dos individuos se reencuentran tras una separación. Esto ocurre con mayor frecuencia cuando dos individuos se reencuentran tras la separación, momento en el cual la cola es olfateada tanto por el recién llegado como por los miembros establecidos del grupo, incluso más que otras partes del cuerpo (Albone y Shirley 1984).

En el ámbito del comportamiento sexual, durante el celo, los machos suelen reunir a un grupo de hembras y mantener a otros machos a distancia. A intervalos, el macho del grupo de hembras olfateará a éstas por la cola. Generalmente, los machos olfatean a las hembras cuatro veces más a menudo en la cola que las hembras a los machos. En relación con el comportamiento maternal, las hembras suelen olfatear a su descendencia por la cola. En muchos casos, la hembra solo permite amamantar a sus crías después de haber olfateado su cola, especialmente si la lactancia se prolonga. Por último, en situaciones de alarma, los renos levantan la cola y despliegan el pelo blanco de su zona ventral. De este modo, la superficie expuesta del pelo que transporta el olor se maximiza. Es probable que la glándula caudal emita compuestos químicos como señal de alarma, particularmente porque el género *Rangifer* no posee la glándula metatarsal, la cual en ciervos del género *Odocoileus* produce una señal química de alarma, tal como se ha mencionado previamente (Müller-Schwarze, Quay, et al. 1977).

1.1.2.10. Glándula supracaudal

La glándula supracaudal, o glándula de la cola del gato suele considerarse un conglomerado de glándulas sebáceas. Sin embargo, algunos autores la consideran una glándula perianal que se abre en folículos dilatados de pelos gruesos o en grandes cisternas. Estas glándulas secretan proteínas y lípidos hidrofóbicos, tienen conductos excretores amplios, están conectadas con pelos gruesos, carecen de quistes y no presentan dimorfismo sexual (Shabadash y Zelikina 1997).

En el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) la glándula supracaudal consta de glándulas sudoríparas tubulares apocrinas y de glándulas sebáceas altamente desarrolladas. Se organiza longitudinalmente en el dorso de la cola. Esta glándula se caracteriza por un alto nivel de actividad de la hidroxisteroide deshidrogenasa y por la presencia de sebo y terpenos volátiles (Albone y Flood 1976). Mc Lean et al. (2021) caracterizaron de forma extensa los compuestos de la secreción de esta glándula en el zorro rojo. Confirmaron que contiene apocarotenoides y sulcatona, la cual le proporciona un olor floral característico. Adicionalmente, comprobaron que la secreción contiene un compuesto descrito previamente como un semioquímico en mamíferos.

Esta glándula se encuentra presente en la mayoría de las especies dentro de Canidae, aunque su tamaño varía considerablemente de especie a especie. En este sentido, dentro de los cánidos, el zorro gris presenta el mayor desarrollo de esta glándula, mientras que en el perro doméstico está funcionalmente ausente, y en el perro africano salvaje (*Lycaon pictus*) completamente ausente (Hildebrand 1952; Hepper y Wells 2015).

1.1.2.11. Sacos anales

Los sacos anales, glándulas anales, o más propiamente dicho, senos paranales (*sinus paranalís*) consisten en una bolsa cutánea lateral entre el canal anal y el esfínter anal externo. Estos sacos pueden describirse como sacos cutáneos recubiertos de glándulas apocrinas que se abre en el ano y que contiene una secreción grasa gris de olor desagradable. En los perros, el tamaño de estas glándulas varía según las razas, pero puede estimarse entre 7 y 20 mm. (Salazar et al. 1996a). Su configuración difiere entre perros y gatos: en los gatos, los sacos anales presentan glándulas apocrinas y sebáceas, mientras que en el perro solo se han

descrito glándulas apocrinas. Es interesante constatar que esta diferencia, junto con otras no tan claramente definidas, es la razón por la cual los perros poseen una predisposición especial a distintas patologías relacionadas con esta glándula. Análisis químicos han demostrado, adicionalmente, que existe un dimorfismo sexual en la composición de secreción de esta glándula en el perro (Natynczuk et al. 1989).

La función de los sacos anales parece estar asociada con el comportamiento animal, especialmente en lo que respecta a la comunicación interespecífica, el reconocimiento entre congéneres, el marcaje de los límites territoriales, y el marcaje territorial ante la presencia de depredadores (Massolo et al. 2009; Wyatt 2013; Ortiz-Jiménez y Barja 2021).

1.1.2.12. Glándulas interdigitales

Por otra parte, las glándulas interdigitales son áreas glandulares ubicadas en la zona dorsal interdigital de la piel, tanto en manos como en pies. Poseen formas que se asemejan a bolsillos entre los dedos, y contienen componentes apocrinos y sebáceos, siendo una fuente importante de liberación de semioquímicos en mamíferos (Quay 1959; Andersson et al. 1979; Albone y Shirley 1984). Sus secreciones incluyen ésteres, cetonas, triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides libres, colesterol, lanosterol, además de otros compuestos volátiles (Andersson et al. 1979; Wood et al. 1995; Gasset et al. 1996). Las secreciones de esta glándula han demostrado poseer la capacidad de evocar comportamientos como el olfateo, el lamido y la búsqueda olfativa en el suelo por parte de renos "del bosque" europeos adultos en cautividad, (*Rangifer tarandus L*) (Müller-Schwarze et al. 1978), así como comportamientos de rascado en gatos (Cozzi et al. 2013). También se ha observado que diferentes especies de ungulados utilizan estas secreciones para comunicar información social, reproductiva y territorial (Burger 2004; Parillo y Diverio 2009).

Es interesante señalar que las secreciones de estas glándulas pueden ser utilizadas por algunas especies para determinar el sexo de sus congéneres. Por ejemplo, los renos (*Rangifer tarandus*) muestra una mayor preferencia por las secreciones de individuos de su mismo sexo durante el comienzo del verano (Müller-Schwarze et al. 1978), y los osos polares (*Ursus maritimus*) invierten significativamente más tiempo olfateando las secreciones interdigitales de individuos del sexo opuesto, lo cual puede sugerir que utilizan esa información para la búsqueda de pareja reproductiva (Owen et al. 2015). Además, estudios adicionales han demostrado un dimorfismo sexual en la composición de la secreción interdigital del oso pardo (*Ursus arctos*) (Sergiel et al. 2017). En la nutria de río de América del Norte (*Lontra canadensis*), el macho posee glándulas interdigitales en las extremidades posteriores, ausentes en las hembras, lo que indica una función sexual (Kruuk 2006). En los perros, se ha sugerido que la conducta de rascado del suelo observada frecuentemente tras orinar o defecar puede estar relacionada con la deposición de secreciones procedentes de la glándula interdigital (Bekoff 1979).

1.1.2.13. Glándulas plantares

En el perro (*Canis lupus familiaris*) y en el lobo (*Canis lupus signatus*), las glándulas plantares y sus secreciones, han sido objeto de estudio por Meyer y Tsukise (1995), quienes encontraron diferencias significativas en la cantidad, calidad y localización de los compuestos producidos por la glándula entre ambas subespecies.

En cuanto a los félidos, se ha confirmado en estudios realizados en el gato doméstico (Meyer y Bartels 1989) el potencial de las secreciones de las glándulas plantares para producir señales de marcaje. De manera similar, en el puma (*Puma concolor*) (Allen et al. 2014) y en el leopardo (*Panthera pardus*) (Rafiq et al. 2020) se ha podido observar que comportamientos típicos de marcaje territorial, como orinar o defecar, frecuentemente se acompañaban del marcaje mediante rascado de superficies, sugiriendo una relevancia de las secreciones de las glándulas interdigitales y/o plantares en el marcaje territorial de estas especies. Así mismo, McClanahan y Rosell (2020) han demostrado que los perros muestran una respuesta más intensa a las secreciones interdigitales y de las almohadillas plantares de otros individuos de su mismo sexo, indicando un dimorfismo sexual también en el perro doméstico.

1.2 SISTEMAS RESPONSABLES DE DETECCIÓN DE SEMIOQUÍMICOS

El sistema olfativo de los mamíferos no está organizado de manera uniforme, sino que consta de varios subsistemas, cada uno con funciones potencialmente distintas, que implican la capacidad de captación y reconocimiento de compuestos químicos y semioquímicos (Breer et al. 2006). La división de estos subsistemas se puede realizar en función de la localización anatómica de sus neuronas sensoriales, el tipo de receptores que expresan, los mecanismos de señalización empleados para transducir los estímulos, el tipo de estímulos quimiosensoriales a los que responden y las dianas axonales de sus neuronas sensoriales en regiones del cerebro anterior olfativo (Munger 2009). Dentro de estos subsistemas se incluyen el ganglio de Grueneberg, el órgano septal, y algunos subtipos de neuronas sensoriales en el epitelio olfativo principal. Cada tipo de subsistema expresa distintas clases de quimiorreceptores y de moléculas de transducción, y por lo tanto, poseen, hipotéticamente, la capacidad para detectar distintas categorías de compuestos químicos (como feromonas y cairomonas) (Mori et al. 2014).

Los dos principales sistemas quimiosensoriales nasales, el sistema vomeronasal y el sistema olfativo principal (SOP), son entidades estructural y funcionalmente separadas. El SOP está mediado por el epitelio olfativo principal (EOP) y está estrechamente relacionado con el sistema límbico, donde se ha asociado con el recuerdo y la sensación consciente (Reep et al. 2007). En cambio, el SVN, formado por el órgano vomeronasal (OVN) y el bulbo olfativo accesorio (BOA), ha demostrado jugar un papel en comportamientos reproductivos no conscientes (Over et al. 1990; Rekwot et al. 2001), el reconocimiento materno (Del Cerro 1998) y la detección de depredadores (Brechtbuhl et al. 2013), y está especializado en la detección de feromonas y cairomonas (Holy 2018). A pesar de su proximidad anatómica, estos dos sistemas son independientes, mostrando grandes diferencias morfológicas y funcionales, lo que indica que ambos probablemente evolucionaron de forma independiente (Estes 1972; Wysocki 1979; Herrada y Dulac 1997; Halpern y Martínez-Marcos 2003; Salazar y Sánchez-Quinteiro 2009). Sin embargo, se ha cuestionado la independencia morfológica, basándose en la presencia de receptores vomeronasales en la mucosa olfativa y la presencia de receptores típicos de la mucosa olfativa en el órgano vomeronasal (Rodríguez et al. 2000; Trinh y Storm 2003; Swaney y Keverne 2009).

1.2.1. Sistema olfativo principal

En los mamíferos, el epitelio olfativo principal reviste los cornetes de la cavidad nasal posterior, los cuales poseen millones de neuronas sensoriales olfativas (NSO). De estas células sensoriales bipolares emerge una única dendrita hacia la superficie epitelial, la cual lleva asociada numerosos cilios, los cuales protruyen hacia la mucosa nasal, proporcionando una amplia superficie de interacción con los odorantes (Breer et al. 2006). La membrana ciliar contiene proteínas receptoras (Strotmann 2004) a las cuales se asocian los elementos de la cascada de transducción olfativa (Menco et al. 1992), en su conjunto elementos fundamentales para que tenga lugar la quimiorrección. Los receptores olfativos (RO) son tipos específicos de receptores acoplados a proteínas G (Buck y Axel 1991). Cada RO interactúa con una amplia gama de compuestos químicos, aunque con afinidades diferentes. Así, un solo RO puede reconocer múltiples odorantes y un odorante puede ser reconocido por varios tipos de RO. Esta estrategia combinatoria de receptores se utiliza para codificar las características de los olores (Malnic et al. 1999; De March et al. 2020). Tras este reconocimiento, todas las NSO que expresan el mismo receptor olfativo envían sus axones a glomérulos comunes en el bulbo olfativo principal (BOP) (Mombaerts et al. 1996; Mombaerts 2001). Los glomérulos son redes neuronales de interacción sináptica entre los terminales axónicos de las NSO y los árboles dendríticos de las células mitrales, las neuronas de proyección del bulbo olfativo (Mori et al. 1999; Araneda et al. 2000; Bast y Albeanu 2022). La convergencia de poblaciones de neuronas receptoras específicas en glomérulos mutuamente excluyentes genera un mapa quimioespecífico que se considera la base para un procesamiento combinatorio de entidades moleculares, que conduce a la identificación de los olores (Bozza et al. 2002; Smear et al. 2013). La información olfativa procesada por la compleja red neuronal del bulbo olfativo es transmitida por las células mitrales a regiones cerebrales superiores para la percepción del olor (Shepherd 2004; Zhou et al. 2019).

1.2.2. Órgano septal

El órgano septal (OS) observado por primera vez por Broman (1921) en ratones recién nacidos y denominado "Riechepithelinsel" constituye un área de epitelio sensorial separada del EOP por tejido respiratorio. Posteriormente, Rodolfo-Masera lo investigó con más detalle (1943) y desde entonces se le conoce también como "Órgano de Masera". A pesar de su descubrimiento hace décadas, ha permanecido relativamente inexplorado, y su función sigue siendo enigmática. Hasta ahora no se ha podido comprobar si el OS actúa como una vía quimiosensorial independiente, percibiendo diferentes compuestos químicos y proyectando a regiones distintas del cerebro, o si por el contrario complementa las funciones del sistema olfativo principal y/o del OVN. En este sentido, Weiler y Farbman (2003) propusieron que el OS es un órgano olfativo accesorio con características distintas al epitelio olfativo y al OVN, y posiblemente presente solo en especies donde el conducto nasopalatino no se abre al OVN, como en las ratas. Otros estudios sugieren que el OS posee su propio sistema quimiosensorial propio y un desarrollo temporal único (Giannetti et al. 1995). Otros autores han podido comprobar que la estructura del epitelio del órgano olfativo septal es claramente distinta del epitelio respiratorio de la cavidad nasal en términos de grosor, composición celular, así como en el aspecto de la superficie libre, e incluso observaron que carece de la estructura típica del epitelio sensorial (Kociánová et al. 2006).

El OS es una isla de tejido sensorial ubicada a cada lado del tabique nasal, caudalmente al conducto nasopalatino y rostralmente a las coanas. Las dimensiones del OS son muy variables entre los individuos e incluso pueden variar entre las superficies contralaterales de un mismo animal (Adams y McFarland 1971). En términos estructurales, el epitelio sensorial del OS es similar al del EOP. Consiste de NSO ciliadas, células basales y sustentaculares, pero posee sólo de una a tres capas de neuronas sensoriales, en comparación con las seis a ocho de la mayoría de las regiones del EOP (Schoenfeld et al. 1994). Los axones del OS proyectan al BOP de forma independiente a aquellos originados en el OVN o el EOP (Bojsen-Møller 1975). Breer et al. (2006) sugieren que el fenotipo molecular y los patrones de proyección de las células sensoriales del OS respaldan la hipótesis de que esta área de epitelio sensorial en el tabique nasal no constituye únicamente una zona ectópica del EOP o del OVN, sino una entidad quimiosensorial única.

En cuanto a la función del OS, Abo-Ahmed et al. (2021) proponen que el órgano septal pueda desempeñar un papel en la percepción del dolor en el dromedarios, funcionando como células nociceptivas. Estas células receptoras interactuarían con las células inmunitarias residentes para coordinar la señalización del dolor con la respuesta inmunitaria. Por otro lado, Breer et al. (2006) destacan la ubicación única del OS, directamente en la apertura del conducto nasopalatino que conecta la cavidad oral con la cavidad nasal. Esto le permitiría al OS detectar compuestos odoríferos procedentes de la cavidad oral, ya sean sustancias suspendidas en el aire o compuestos no volátiles transferidos por acciones como el lamido. De esta manera, el OS podría tener una doble función: ayudar en la detección de aromas alimentarios, así como en la identificación de moléculas de señalización socio-sexual.

1.2.3. Ganglio de Grüneberg (GG)

En 1973 se encontró una estructura ganglionar de función desconocida en la cavidad nasal del ratón, ubicada cerca de la apertura de las narinas (Grüneberg 1973). Esta estructura, descrita como heterogénea y compacta, se encontró situada entre grandes vasos sanguíneos. Investigaciones posteriores identificaron estructuras ganglionares similares en otras especies de mamíferos (Tachibana et al. 1990). Esta estructura se describe de forma más detallada en 2005 y 2006 (Fuss et al. 2005; Koos y Fraser 2005; Fleischer et al. 2006; Roppolo et al. 2006; Storan y Key 2006) utilizando ratones OMP-GFP (proteína marcadora olfativa-proteína verde fluorescente) genéticamente modificados, para que todas las neuronas olfativas maduras expresaran la GFP como marcador histológico bajo el control del promotor de OMP (Margolis 1972; Mombaerts et al. 1996; Potter et al. 2001). Estos estudios revelaron que el GG en los ratones OMP-GFP comienza su desarrollo embrionario alrededor del día 16 de gestación y está compuesto por dos tipos de células, neuronas y células gliales. Se observó que el GG alcanza su desarrollo completo al nacer y persiste a lo largo de la vida del ratón.

La función olfativa del GG en ratones ha sido confirmada a través de diversos estudios que abordaron la expresión de receptores olfativos putativos (Fleischer et al. 2006, 2007); la presencia de numerosos cilios (Liu et al. 2009) y las conexiones directas con el complejo glomerular en rosario del bulbo olfativo (Koos y Fraser 2005; Roppolo et al. 2006). Recientemente, se ha descubierto que el GG en ratones juega un papel crucial en el reconocimiento de señales de alarma volátiles, como las feromonas de alarma del ratón y otras

moléculas estructuralmente relacionadas presentes en los olores de los depredadores (Brechtbühl et al. 2008; Brechtbühl et al. 2013). Además, distintos estudios han demostrado que tanto estímulos químicos, incluidos aquellos asociados a señales de alarma, como estímulos térmicos pueden iniciar respuestas neuronales específicas en el GG del ratón (Brechtbühl et al. 2008, 2020; Mamasuew et al. 2008, 2011; Schmid et al. 2010; Brechtbühl et al. 2013; Mori et al. 2014).

1.2.4. Complejo glomerular en rosario (Necklace glomerular complex)

Este subsistema olfativo presenta características anatómicas y fisiológicas notables. Sus neuronas sensoriales olfativas (NSO) en el epitelio olfativo proyectan sus axones a un conjunto de glomérulos en el bulbo olfativo caudal. Estos glomérulos forman una estructura similar a "cuentas en una cuerda", por lo que se denominan "Necklace glomerular complex" o complejo glomerular "en rosario". Los primeros autores en describir estas estructuras fueron Zheng et al. (1987), quienes describieron estas estructuras como "glomérulos atípicos" del bulbo olfativo. Posteriormente, Shinoda et al. (1989) acuñaron el término "complejo glomerular en rosario" para estos "glomérulos atípicos", localizados dorsalmente en el borde medial del bulbo olfativo accesorio y en la zona ventrolateral bulbar, ligeramente rostral al núcleo olfativo anterior.

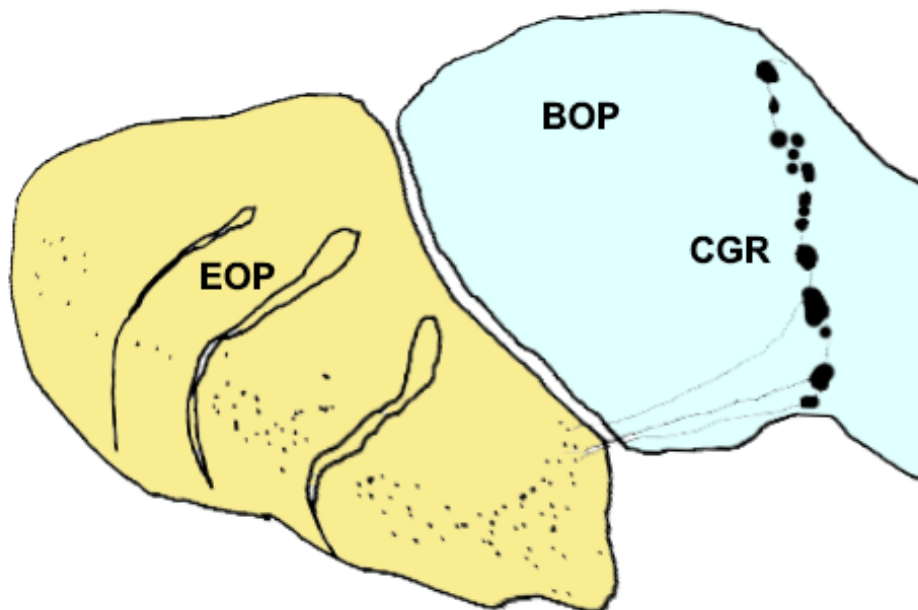


Figura 1. Representación esquemática de la organización del complejo glomerular "en rosario" (CGR). Un subtipo específico de neuronas en el epitelio olfativo principal (EOP) proyecta sus axones al complejo glomerular en rosario ubicado en la región caudal del bulbo olfativo principal (BOP). Estos axones forman una estructura que recuerda a un rosario.

Las células del GG proyectan sus axones a estos glomérulos "en rosario" (Fuss et al. 2005; Koos y Fraser 2005; Roppolo et al. 2006; Storan y Key 2006). Además de la innervación del GG (Fuss et al. 2005), los glomérulos del complejo glomerular en rosario (CGR) también reciben aferencias de las neuronas GC-D (neuronas guanilil ciclasa) del EOP y del órgano septal. A diferencia del BOP, que utiliza AMPc en su cascada de transducción de señales (Juilfs et al. 1997; Zufall y Munger 2001; Leinders-Zufall et al. 2007), el CGR se establece como un centro único para la transducción de señales de GMPc olfativo. Los glomérulos del CGR han sido también caracterizados como fosfodiesterasa positivos (PDE2A+) (Juilfs et al. 1997), debido a que expresan fosfodiesterasa 2A, y una inmunoreactividad elevada frente a acetilcolinesterasa (Luo 2008). No obstante, los glomérulos del CGR son molecularmente variados, presentando immuno-reactividad frente a diversos anticuerpos, como 2C6, MAb213 o PAX (Ring et al. 1997; Zimmerman y Munger 2021).

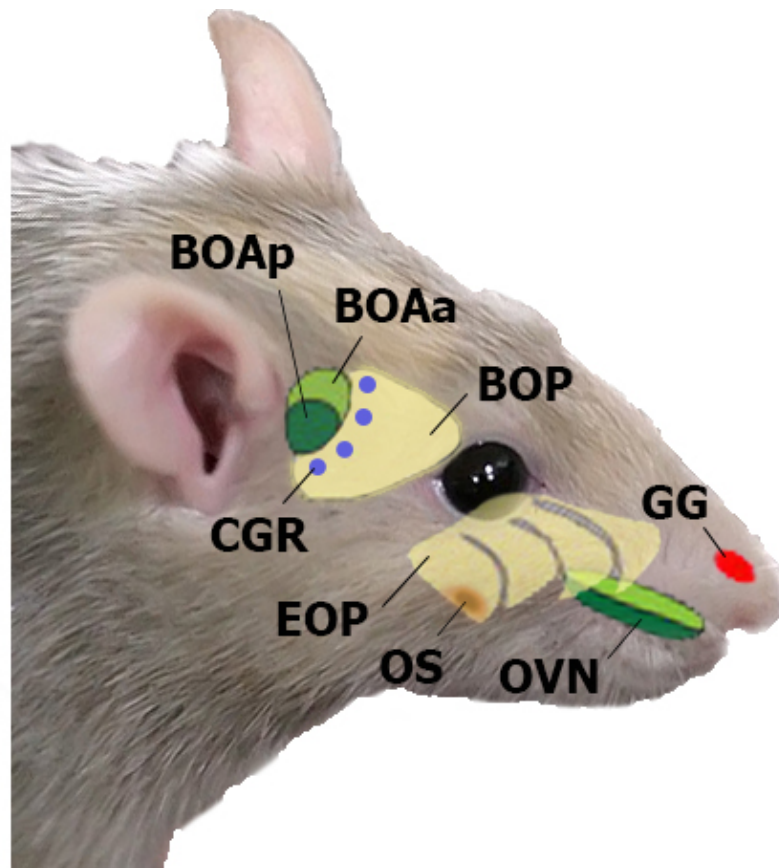


Figura 2. Dibujo esquemático que muestra la organización anatómica de los distintos subsistemas olfativos en el ratón. BOAa: bulbo olfativo accesorio anterior; BOAp: Bulbo olfativo accesorio posterior; BOP: bulbo olfativo principal; CGR: complejo glomerular en rosario; EOP: epitelio olfativo principal; BOP: bulbo olfativo principal; OS: órgano septal; OVN: órgano vomeronasal; GG: ganglio de Grueneberg.

En ratones, las neuronas olfativas del CGR se encuentran en todas las subzonas del epitelio olfativo, con una mayor concentración en las regiones ventral y caudal del EOP. La mayoría de las neuronas olfativas del CGR se localizan en los repliegues de los ectoturbinados, con una distribución aproximadamente simétrica entre los EOP bilaterales (Juilfs et al. 1997; Walz et al. 2007). Los glomérulos del CGR suelen ser simétricos bilateralmente y se concentran en ciertas zonas, aunque la ubicación exacta de cada glomérulo puede variar, sin una estandarización específica (Luo 2008).

En cuanto a las funciones del CGR, Hu et al. (2007) demostraron que las neuronas del CGR detectan la concentración de dióxido de carbono atmosférico con una alta sensibilidad. También se ha sugerido que entre sus funciones se encuentra la de mediar determinados comportamientos complejos del animal (Luo 2008).

1.2.5. Neuronas guanilil-ciclasa

Estas neuronas expresan la isoforma tipo D del receptor guanilil ciclasa. Presentan una morfología ciliada y bipolar, similar a las neuronas olfativas canónicas. Sin embargo, a diferencia de estas últimas, las neuronas GC-D no expresan la proteína marcadora olfativa (OMP ; olfactory marker protein), un marcador comúnmente utilizado para identificar neuronas olfativas maduras (Fülle et al. 1995; Cockerham et al. 2009; Kuhn 2009).

En el EOP, el 1% de las neuronas olfativas expresan guanilil ciclasa, y la fosfodiesterasa-2A (PDE2A), que es estimulada por el GMPc (Fülle et al. 1995; Juilfs et al. 1997). La mayoría de las neuronas GC-D se localizan en los recesos dorsales de los ectoturbinados, ya sea individualmente o en grupos, aunque también pueden encontrarse en los endoturbinados, en el septo y en el OS (Fülle et al. 1995; Ma et al. 2003; Hu et al. 2007).

Los axones de las neuronas GC-D abandonan la cavidad nasal a través de la lámina cribosa del etmoides y proyectan al complejo glomerular en rosario, en la porción caudal del bulbo olfativo principal (Juilfs et al. 1997; Leinders-Zufall et al. 2007; Walz et al. 2007).

Tanto las neuronas olfativas canónicas del EOP como las neuronas GC-D utilizan para la transducción de su señal nucleótidos cíclicos. Sin embargo, difieren en los componentes moleculares específicos que emplean. Como se mencionó previamente, las neuronas del EOP utilizan AMPc en su cadena de transducción, incluyendo a la subunidad G α olf de la proteína G, adenilciclasa de tipo III, y diversas isoformas de fosfodiesterasa, entre otros (Munger et al. 2010). En cambio, las neuronas GC-D expresan proteínas asociadas con señales mediadas por GMPc, incluyendo isoformas de fosfodiesterasa estimuladas por GMPc o calcio-calmodulina (Fülle et al. 1995; Juilfs et al. 1997; Hu et al. 2007).

Las neuronas olfativas sensoriales GC-D+ responden a un número limitado de estímulos quimiosensoriales. Dos de los estímulos más potentes y específicos para estas células son la guanilina y la uroguanilina, dos péptidos de la familia de la guanilina. Estos péptidos se secretan en la orina y en las heces, dos fuentes ricas en semioquímicos para los roedores, por lo que constituyen quimioseñales importantes en entornos naturales (Leinders-Zufall et al. 2007). Además, las neuronas olfativas que expresan receptores guanilil-ciclasa D son activadas ante la exposición al CO₂, activando a su vez la región del complejo glomerular en rosario del bulbo

olfativo (Hu et al. 2007). Igualmente, estas neuronas responden al disulfuro de carbono (CS₂) (Munger et al. 2010). Ambos compuestos están presentes en la respiración de los mamíferos.

1.2.6. Limbo olfativo

El limbo olfativo (LO) puede definirse como el área de transición entre el BOP y el BOA. El LO es una corteza bulbar modificada y está delimitado anteriormente por el BOP y posteriormente por el BOA. Mediante la tinción de Nissl, se puede diferenciar el LO del BOP por una disminución anteroposterior progresiva del grosor, y por la ausencia de las capas plexiforme externa y de células granulares. El LO se divide en tres áreas diferenciadas, de rostral a caudal: un área preolfativa, que carece de glomérulos; una segunda área glomerular o de collar; y una tercera área en forma de cuña o intersticial, que se encuentra recubierta por una serie de glomérulos atípicos, que podrían pertenecer al BOA. Tanto su localización como la evidencia de su actividad funcional sugieren que el LO puede estar relacionado con ambas modalidades de procesamiento (Larriva-Sahd 2012; Torres et al. 2023b).

1.2.7. Formaciones sub-bulbares

Las formaciones sub-bulbares pueden definirse como clústeres neuronales localizados en el espesor de la sustancia blanca del BOA, justo debajo de la capa granular del BOA (Villamayor et al. 2020). Estas formaciones sub-bulbares fueron descritas por primera vez por Ramón y Cajal (1904), y hasta la fecha, hay un número limitado de artículos que las describan. Uno de estos estudios, realizado en ratas, ratones y cobayas por Larriva-Sahd (Larriva-Sahd 2012), relaciona estas formaciones con el LO. En el conejo, estas formaciones están bien organizadas y poseen una organización más compleja que en las otras especies previamente mencionadas (Villamayor et al. 2020).

1.2.8 Sensibilidad del trigémino

Los sistemas olfativos y el componente sensible del nervio trigémino están estrechamente vinculados. La mayoría de los odorantes no sólo estimulan los nervios olfativos y/o vomeronasales, sino que también tienen la capacidad de estimular el nervio trigémino. La interacción entre los sistemas olfativo y del trigémino no es sencilla, pero ejerce una influencia significativa en la percepción olfativa, y actúa como un mecanismo de defensa frente a moléculas irritantes que podrían acceder a la cavidad nasal. Los individuos con anosmia muestran una reducida sensibilidad del trigémino, aunque los mecanismos subyacentes no están completamente entendidos (Doty et al. 1978; Gudziol et al. 2001; Hummel y Livermore 2002; Finger et al. 2003; Wysocki et al. 2003; Frasnelli et al. 2007). Además, la pérdida de funcionalidad del nervio trigémino disminuye la capacidad olfativa (Husner et al. 2006). No obstante, los individuos anósmicos son aún capaces de percibir sensaciones tales como quemazón, escozor, calor, frescor o picor, lo que sugiere una inervación funcional del trigémino (Hummel 2000).

Hasta el 2003, se creía que la percepción de irritantes a través del sistema del nervio trigémino ocurría mediante terminales nerviosos libres en el epitelio nasal, lo que implicaría la necesidad de difusión de las sustancias químicas a través de la barrera epitelial para activar estos receptores. No obstante, Finger et al. (2003) identificaron en el epitelio nasal de ratones y ratas una población de células quimiosensoriales solitarias que alcanzan la superficie del epitelio

nasal, y hacen contacto con las fibras nerviosas aferentes del trigémino. Demostraron además que la activación del nervio trigémino por parte de estas células induce cambios fisiológicos, como la alteración de la frecuencia respiratoria. Posteriormente, Lin et al. (2008) confirmaron que estas células responden a irritantes volátiles. Estas células quimiosensoriales solitarias desempeñan un papel crucial en la regulación del acceso de sustancias irritantes y sustancias potencialmente dañinas al OVN, restringiendo la entrada de dichas moléculas, protegiendo su epitelio altamente especializado (Ogura et al. 2010).

1.3 SISTEMA VOMERONASAL

1.3.1 Anatomía del órgano vomeronasal

La primera descripción del órgano vomeronasal fue realizada por el anatomista danés Ludvig Jacobson en 1813, al identificar un órgano en la cavidad nasal de mamíferos domésticos tales como gatos, vacas, perros, cabras, caballos, cerdos y ovejas, que hasta entonces no había sido previamente descrito por la anatomía animal. Originalmente Jacobson (1813) le atribuyó una función meramente secretora (Døving y Trotier 1998) destacando características como la doble inervación del órgano, la abundancia de glándulas asociadas y un notable suministro vascular. Posteriormente, Retzius (1894) propuso que el OVN poseía una naturaleza quimiosensorial, al señalar las similitudes entre las neuronas receptoras del OVN y las del epitelio olfativo.

Desde entonces el OVN ha sido objeto de estudio en una amplia gama de especies. Se han empleado variadas técnicas, como tinciones específicas y métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos, para revelar información valiosa sobre la morfología y función del órgano. Estos estudios han ampliado nuestro conocimiento sobre el OVN, contribuyendo significativamente a la ciencia de la biología sensorial.

1.3.1.1 Anatomía topográfica y macroscópica: Localización y comunicación

El órgano vomeronasal es un conducto, revestido por un epitelio especializado, y obliterado en uno de sus extremos, que se localiza en la mayor parte de los mamíferos se localiza en la porción anterior de la base del tabique nasal (Døving y Trotier 1998; Halpern y Martínez-Marcos 2003). Se diferencia del epitelio olfativo en que éste ocupa una posición dorsocaudal en el interior de la cavidad nasal (Wysocki 1979). El conducto vomeronasal se comunica por una diminuta apertura o bien a la cavidad nasal o, en el caso de los ungulados y los carnívoros, al conducto nasopalatino. En una sección transversal, el conducto vomeronasal posee una morfología característica de medialuna, discriminándose un grueso epitelio sensorial pseudoestratificado en su porción medial, y un epitelio no sensorial o respiratorio, más fino y ciliado, en su porción lateral. El epitelio neurosensorial alberga neuronas receptoras, que, al igual que las neuronas receptoras olfativas, poseen una vida limitada y son reemplazadas continuamente a partir de células madre basales (Brennan 2001). Las neuronas recién formadas se agrupan principalmente en los márgenes del epitelio neurosensorial, en la zona de transición con el epitelio respiratorio (Weiler et al. 1999).

1.3.1.2. Anatomía microscópica

Cápsula

El órgano vomeronasal consta de un conducto y un parénquima, ambos recubiertos por una cápsula vomeronasal de forma arriñonada. La composición de esta cápsula varía entre las especies: puede ser completamente cartilaginosa, como en los perros (Salazar et al. 2013), una combinación de cartílago y hueso, como el caso del conejo (Villamayor et al. 2018) o del capibara (Torres et al. 2020) o enteramente ósea, como en ratones o ratas (Barrios et al. 2014). Independientemente de su composición, el cartílago vomeronasal encapsula parcial o totalmente el OVN en todas las especies. La cápsula presenta en todos los casos una hendidura dorsal que facilita el acceso a la irrigación e inervación del órgano.

La cápsula vomeronasal protege las estructuras blandas del OVN y brinda soporte para prevenir el colapso del conducto bajo la presión negativa ejercida por la bomba vomeronasal. La morfología del cartílago vomeronasal, de naturaleza hialina, varía a lo largo del órgano. Sin embargo, los estudios del OVN frecuentemente se han centrado solo en sus niveles centrales (Vaccarezza et al. 1981; Salazar et al. 1995). Además, la morfología de la cápsula varía significativamente entre diferentes taxones filogenéticos, como Monotrema, Marsupialia, Edentata, Rodentia, Cetacea, Insectivora, Carnivora, Chiroptera o los Primates (Salazar et al. 1995).

Conducto: Epitelio receptor / epitelio sensorial

El OVN posee un conducto repleto de mucosidad que, tal como hemos mencionado, está revestido por dos tipos de epitelio. En su borde medial, de morfología cóncava, se halla un epitelio pseudoestratificado similar a la mucosa olfativa del EOP. Este epitelio comprende células receptoras, células de sostén y células basales. Las células basales se distribuyen a lo largo de la membrana basal, y forman clústeres en los bordes de transición con el epitelio lateral. Las células de sostén o sustentaculares, ubicadas en la zona superficial del epitelio, proporcionan apoyo mecánico y funcional a las células neurosensoriales (Khan et al. 2021). Las neuronas del epitelio neurosensorial son bipolares, al igual que en el EOP, y presentan microvellosidades apicales, en contraste con los cilios del EOP (Wysocki 1979; Dulac y Axel 1995). La distribución de las células neuroreceptoras en el epitelio varía según las especies: en roedores como ratas, ratones, castores o en lagomorfos como el conejo, se distinguen dos estratos de poblaciones neuroreceptoras (Keverne 1999; Villamayor et al. 2018; Tomiyasu et al. 2022). Por otra parte, el borde lateral del conducto vomeronasal está recubierto por un epitelio respiratorio ciliado, que facilita el tránsito de las secreciones hacia la entrada del órgano (Estes 1972; Elgayar et al. 2014; Yamagiwa et al. 2022).

En los roedores de laboratorio, como ratas y ratones, -familia Rodentia; considerada de referencia en el estudio del sistema vomeronasal de los mamíferos-, el neuroepitelio se organiza en dos zonas diferenciadas: una zona apical y una zona basal. Cada una de estas zonas expresa de forma segregada dos subunidades de la proteína G distintas, implicadas en la cadena de transducción de las señales procedentes de los receptores: las proteínas G α o y G α i2. La proteína G α o se expresa en las neuronas basales del epitelio sensorial, se asocia con la expresión de los receptores vomeronasales V2R (*type 2 vomeronasal receptor*) y receptores pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad. Los axones de estas neuronas proyectan a la zona

posterior del BOA. En cambio, la proteína *Gai2* expresada en las neuronas sensoriales apicales, se corresponde con la expresión de receptores V1R (*type 1 vomeronasal receptor*) y proyecta a la zona anterior del BOA. No obstante, en otros mamíferos como el caballo, la cabra o el perro, no se ha observado esta expresión diferencial, expresando únicamente los receptores de la familia V1R (Dulac y Axel 1995; Herrada y Dulac 1997; Rodríguez y Mombaerts 2002; Halpern y Martínez-Marcos 2003; Salazar et al. 2013).

La localización de la apertura del OVN varía considerablemente. En roedores y lagomorfos, el OVN se abre directamente a la cavidad nasal (Villamayor et al. 2018; Torres et al. 2020). En gatos, se abre rostralmente en el conducto incisivo o nasopalatino; conducto que se extiende desde la papila incisiva -localizada en la porción anterior del paladar hasta la cavidad nasal (Salazar et al. 1984).

Parénquima: Glándulas, vasos, nervios

El parénquima del OVN posee múltiples vasos con propiedad contráctil, los cuales están innervados tanto por nervios mielínicos y amielínicos, que dependen del sistema nervioso simpático. La estimulación del nervio nasopalatino, origen de dichas fibras, provoca vasoconstricción de los vasos del parénquima con la consiguiente dilatación de la luz del órgano. La presión negativa generada en el conducto produce un flujo de líquido hacia el interior del conducto vomeronasal. La subsiguiente vasodilatación, produce de forma opuesta el colapso del lumen, y el vaciado de su contenido hacia el exterior. La creación alterna de una presión negativa y positiva en el interior del conducto que provoca su vaciado y renovación de su contenido periódicamente se conoce como “bomba vomeronasal” (Meredith et al. 1980; Eccles 1982; Meredith 1994; Hamacher et al. 2024). Este mecanismo contribuye mayoritariamente a la succión de moco y moléculas del medio externo hacia el lumen del OVN. Las glándulas secretoras del parénquima reciben innervación parasimpática a través de la rama septal del nervio nasal caudal (Estes 1972).

1.3.2 Receptores vomeronasales y transducción sensorial

2.1.3.1 Receptores vomeronasales V1R y V2R

En el OVN se han identificado dos familias de receptores ligados a proteínas G (V1R y V2R), cada una de las cuales se expresa en una región distinta del OVN (Dulac y Axel 1995; Matsunami y Buck 1997). Estos receptores, formados por siete dominios transmembrana pueden reconocer ligandos muy diferentes. Los receptores V1Rs están vinculados a la proteína *Gai2*, tienen un NH₂-terminal relativamente corto y presentan una gran variedad de secuencias en sus dominios transmembrana, presumiblemente asociado al sitio de unión del ligando (Tirindelli et al. 1998; Brennan 2001). Los V2Rs están ligados a la proteína *Gao* y poseen una gran variabilidad en el dominio extracelular N-terminal, indicando que posiblemente interactúen con moléculas completamente distintas al receptor V1R. Así, se ha comprobado que los dos tipos de receptores V1R y V2R se activan mediante distintos ligandos, activándose los V2R preferentemente por péptidos y proteínas no volátiles (Keverne 1999; Brennan 2001; Chamero et al. 2007), y los receptores V1R por esteroides sulfatados y otros semioquímicos de pequeño peso molecular (Leinders-Zufall et al. 2000; Boschat et al. 2002).

Los mecanismos de transducción sensorial en las células neuroreceptoras del órgano vomeronasal (OVN) difieren de aquellos en las células neurosensoriales del epitelio olfativo principal (EOP). En el EOP, los receptores acoplados a proteínas G activan predominantemente a la adenilciclasa, lo que conduce a la apertura de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (canales CNG). Sin embargo, en el OVN, la percepción de feromonas activa la señalización mediante inositol 1, 4, 5 – trifosfato (IP₃) sin alterar los niveles de AMPc. Esto se asocia con la acción de receptores asociados a las proteínas G α 2 y G α o. En relación con esto, se ha observado la expresión de receptores rTRP2 (*transient receptor potential*), mientras que, por el contrario, no hay evidencias de la expresión de canales CNG en las células neurosensoriales del OVN, al contrario de lo que sucede en el EOP. Esto se refleja en la localización de las proteínas G α 2, G α o y el receptor rTRP2 en las microvellosidades de las células receptoras del OVN (Berghard et al. 1996; Brunet et al. 1996; Keverne 1999; Liman et al. 1999; Brennan 2001; Menco et al. 2001).

Los receptores V2R juegan un papel esencial en determinadas conductas agresivas, como la agresividad maternal y territorial en roedores (Chamero et al. 2007, 2011; Pérez-Gómez et al. 2014). Los receptores rTRP2 son necesarios para el reconocimiento de la identidad sexual de los congéneres, así como para inhibir comportamientos sexuales inapropiados de los adultos hacia juveniles sexualmente inmaduros (Leybold et al. 2002b; Stowers et al. 2002; Dulac y Torello 2003; Ferrero et al. 2013)

2.1.3.2 Receptores del péptido formilado

Adicionalmente a estos dos receptores vomeronasales V1R y V2R, ampliamente documentados, existen numerosas evidencias que sugieren la presencia de una tercera familia de receptores en el epitelio sensorial vomeronasal: los receptores del péptido formilado (FPR) (*formyl peptide receptor*). Estos receptores FPR son receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana pertenecientes a la superfamilia de la rodopsina (Boillat et al. 2021). Dentro de la familia FPR existen 7 tipos de receptores, de los cuales cinco (Fpr-rs1, rs3, rs4, rs6 y rs7) se expresan de forma mayoritaria o de manera exclusiva en subconjuntos de neuronas vomeronasales. Fpr-rs1 se co-expresa con la proteína G α o en la zona basal del epitelio vomeronasal, mientras que Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs6, and Fpr-rs7 se co-expresan junto con la proteína G α 2 en la zona apical del epitelio (Liberles et al. 2009; Rivière et al. 2009).

Se ha propuesto que una de las funciones de los receptores FPR en el OVN es la detección de bacterias, patógenos o metabolitos relacionados con la inflamación. Esto se debe a su expresión en células del sistema inmune como neutrófilos, granulocitos y monocitos. Además, los FPR pueden estar implicados en la evaluación de los congéneres o de otras especies a través de las variaciones en la flora bacteriana normal o en las proteínas mitocondriales, así como la detección de moléculas endógenas asociadas al daño celular (Liberles et al. 2009; Rivière et al. 2009; Ackels et al. 2014; Bufe et al. 2019; Boillat et al. 2021).

2.1.3.3 Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad son conocidas por su papel crucial como mediadores del sistema inmunológico. Su función principal es transferir a la superficie de la célula información sobre las proteínas intracelulares, lo que permite al sistema inmunitario responder adecuadamente a amenazas (Rammensee et al. 1999). Además de esta

función inmunológica, las moléculas del CMH desempeñan un rol significativo como estímulos sensoriales del OVN, siendo fundamentales en el reconocimiento social. Esto se debe a que proporcionan información genética sobre los individuos (Leinders-Zufall et al. 2004). En este contexto, las moléculas del CMH que se excretan en el medio externo a través de la orina o de las secreciones corporales de un individuo contienen información química compleja sobre el mismo. Esta información puede ser utilizada en la comunicación semioquímica interindividual, lo que sugiere un mecanismo sofisticado de interacción social a través de señales químicas (Singh et al. 1987).

En procesos fisiológicos como el retraso de la pubertad, la inducción del celo y la agresividad entre machos, las neuronas vomeronasales de tipo V1R (receptores vomeronasales tipo 1) responden a sustancias volátiles con actividad feromonal (Leinders-Zufall et al. 2000; Boschhat et al. 2002; Del Punta et al. 2002; Stowers y Marton 2005). Por otro lado, los receptores V2R detectan ligandos no volátiles como los péptidos del CMH clase I, que son importantes para el reconocimiento individual en la selección de pareja (Leinders-Zufall et al. 2004), el ESP1, péptido de pequeño tamaño molecular específico de los machos secretado por la glándula lagrimal extraorbital (Kimoto et al. 2005), y los MUP, proteínas urinarias mayores (Chamero et al. 2007). Estos hallazgos indican que la detección de los péptidos por los V2R es independiente del haplotipo del CMH. Además, se han encontrado que diferentes péptidos específicos para diferentes moléculas del CMH generan patrones de activación únicos de los receptores (Leinders-Zufall et al. 2004).

1.3.3 Anatomía del bulbo olfativo accesorio

El bulbo olfativo accesorio (BOA) es una estructura de integración quimiosensorial laminar, que forma parte de las áreas olfativas del cerebro de algunas especies de vertebrados, aunque no de todas. Por ejemplo, se ha observado que, en peces, anfibios, pájaros y algunos mamíferos como ballenas o delfines, esta estructura está ausente. El BOA es un componente del SVN y recibe señales aferentes del OVN. A pesar de que el BOP y el BOA comparten algunas características comunes, presentan diferencias significativas, tanto en su función como en su estructura (Meisami y Bhatnagar 1998).

1.3.3.1 Anatomía topográfica: Localización

En el SVN, los axones de las neuronas neuroreceptoras situadas en el epitelio sensorial del OVN forman el nervio vomeronasal. Este nervio es independiente del nervio olfativo y se extiende en sentido caudodorsal por la submucosa del tabique nasal para finalmente, tras atravesar la lámina cribiforme del etmoides, llegar hasta el BOA, donde establece sinapsis con sus neuronas de relevo, las neuronas mitrales. El BOA en los mamíferos se encuentra en continuidad con el BOP, en una posición caudodorsal o dorsomedial y, en menor medida, dorsolateral. Las variaciones en la localización y la relación del BOA con respecto al BOP pueden estar influenciadas por la trayectoria que recorre el nervio vomeronasal, así como con el tamaño relativo del BOP en comparación con el BOA. Así, en determinadas especies, como los perros o los erizos, el BOP desplaza la localización del BOA a un área más caudal que en otras especies (Meisami y Bhatnagar 1998).

A pesar de que el BOA está situado en la cara dorsal del BOP, ambas estructuras no intercambian fibras. Además, no parece existir ninguna relación aparente entre su grado de su desarrollo (McCotter 1912; Estes 1972).

1.3.3.2 Anatomía descriptiva: Citoarquitectura

El BOA de los mamíferos, al igual que el BOP, es una estructura cortical que presenta laminación. Sin embargo, el patrón de laminación varía notablemente, dependiendo de la especie y del tamaño del BOA. En el caso del BOP, se ha observado que un mayor tamaño se correlaciona una organización laminar más diferenciada y desarrollada. Esto es evidente en especies como roedores, erizos y cerdos (López-Mascaraque et al. 1990; Briñón et al. 2001; Brunjes et al. 2016; Schröder et al. 2020). De forma similar, en el BOA, el tamaño parece influir en el nivel de diferenciación laminar. Por ejemplo, los BOAs de mayor tamaño en roedores presentan una laminación más distinta y compleja (Salazar et al. 2006), mientras que en especies con un BOA de menor tamaño, como en los perros o los visones, la laminación tiende a ser más rudimentaria (Nakajima et al. 1998; Salazar et al. 1998).

Laminación

La primera descripción detallada de la laminación del BOA fue realizada por Ramón y Cajal (1902). Tomando como referencia el BOA de la rata, considerado un modelo de un BOA bien desarrollado, podemos diferenciar las siguientes capas, desde la más superficial a la más profunda: la capa nerviosa vomeronasal, la capa glomerular, la capa plexiforme externa, la capa de células mitrales, la capa plexiforme interna, y la capa granular interna. Este patrón de laminación es equiparable al observado en el BOP (Meisami y Bhatnagar 1998). Además, el tracto olfativo lateral (TOL) se asocia internamente a estas capas, aunque su ubicación varía entre diferentes especies (Switzer, III. et al. 1980). En un plano más interno, aunque no asociado al BOA, se encuentra la capa ependimal, que comúnmente se asocia al BOP.

La capa más superficial, la capa nerviosa vomeronasal, consta de haces de fibras nerviosas no mielinizadas que provienen de las neuronas neuroreceptoras vomeronasales. Las terminaciones de estas fibras penetran en la capa adyacente, la glomerular (Halpern 1987). Esta última contiene glomérulos, formados por un neurópilo de textura acelular, circunscrito por una circunferencia de células periglomerulares. Los glomérulos del BOA se caracterizan por tener una organización más difusa y menos definida en comparación con los del BOP. Dentro de los glomérulos se establece la conexión entre las fibras nerviosas vomeronasales de la capa nerviosa vomeronasal y las células mitrales de la siguiente capa. En este proceso, múltiples fibras vomeronasales convergen hacia un único glomérulo, y este a su vez conecta con un número reducido de células mitrales, facilitando así una convergencia de la señal desde la capa nerviosa vomeronasal hacia las células mitrales. Esta convergencia es más pronunciada en el BOP que en el BOA, donde las dendritas de cada célula mitral del BOP realizan sinapsis con un solo glomérulo, y este a su vez recibe la señal excitatoria primaria de un solo tipo de neurona receptora, produciendo de este modo un ratio de convergencia extremadamente alto para el BOP (Mombaerts et al. 1996; Meisami y Bhatnagar 1998; Luo y Katz 2004). En cambio, en el SVN, los axones de neuronas sensoriales que expresan un mismo tipo de receptor forman varios pequeños glomérulos (Belluscio et al. 1999; Rodríguez et al. 1999). Las células mitrales del BOA poseen a su vez múltiples dendritas apicales, cada una de las cuales inerva un glomérulo

distinto. Esta divergencia indica que cada célula mitral del BOA integra señales aferentes procedentes de diversos tipos de receptores (Luo y Katz 2004).

Embebidas en la capa nerviosa se identifican dos tipos de células de la glía. El primero posee una morfología similar a otras células gliales del sistema nervioso central. Como ellas, también forman pedículos alrededor de los capilares sanguíneos y forman parte de la membrana glial limitante externa. El segundo tipo de célula glial se conocen como “ensheathing cells”, o células de la glía envolvente. Estas células representan una variante morfológica de los astrocitos, presentando características mixtas entre las células de Schwann y los astrocitos. El citoplasma de las células de la glía envolvente es más denso que aquél de un astrocito tipo, y posee un menor número de filamentos, los cuales tienden a agruparse en haces. Estas células también forman parte de la membrana glial limitante en la superficie del bulbo olfativo, asociándose a los axones nerviosos, rodeándolos, y guiando a los nuevos axones formados en su crecimiento y búsqueda de células diana. Para ello, modulan el crecimiento de los axones olfativos en el seno del sistema nervioso central mediante distintas moléculas, como moléculas de adhesión o agentes quimiotrópicos (Doucette 1984, 1993).

A diferencia de lo que sucede en el BOP, en el BOA la capa glomerular es de mayor espesor y se caracteriza por tener glomérulos cuyos límites no son precisos ni nítidos. Aunque las células que se proyectan en el BOA comparten similitudes con las células mitrales del BOP, Ramón y Cajal ya en sus primeros estudios (1902) describe cómo los somas de las células mitrales rara vez adoptan la forma mitral típica, por lo que algunos autores, como Larriva-Sahd et al. (2008), sugieren evitar la utilización del término mitral en el contexto del BOA, y prefieren emplear la denominación “célula principal”.

En el bulbo olfativo accesorio, las células periglomerulares que rodean los glomérulos se encuentran en menor número en comparación con el bulbo olfativo principal. Estas células son pequeñas y poseen axones cortos, y su abundancia varía según la especie. En especies con un BOA bien desarrollado, estas células periglomerulares son más numerosas e incluso llegan a bordear glomérulos por completo. Las células periglomerulares poseen una naturaleza GABAérgica. Difieren así de las células periglomerulares del BOP, donde se ha demostrado una naturaleza tanto GABAérgica como dopaminérgica, en ambos casos con una función inhibitoria (Baker et al. 1988; Takami et al. 1992a). La falta de células periglomerulares dopaminérgicas en el BOA es notable, pues se ha comprobado que la entrada olfativa aferente al BOP ajusta la función de las células periglomerulares, haciendo que el BOP se adapte a diferentes niveles de estimulación olfativa. La ausencia de este mecanismo en el BOA sugiere una mayor robustez, y podría estar relacionada con su rol en comportamientos más instintivos (Meisami y Bhatnagar 1998).

La capa plexiforme externa en el BOA es relativamente pequeña y rudimentaria, en contraste con lo observado en el BOP. La presencia de dos capas plexiformes separadas por una capa de células mitrales y células empenachadas en el BOA es difícil de comprobar, debido a que esta última capa raramente forma una capa como tal, y se limita a unas pocas células (Ramón y Cajal 1902; Larriva-Sahd 2008). Es por ello que algunos autores (Salazar y Sánchez-Quintero 2011) proponen la utilización del término “capa mitral plexiforme empenachada” o simplemente “capa mitra-plexiforme” y otros autores como Larriva-Sahd (2008) proponen una

nueva terminología para las capas celulares que rodean al tracto olfativo lateral: capa celular externa e interna, aunque esta terminología no ha sido ampliamente adoptada.

Existen en el BOP dos tipos principales de neuronas de proyección: las células mitrales y las células empenachadas. Los cuerpos celulares de las células empenachadas se localizan principalmente en la capa plexiforme externa y en la zona periglomerular, y se han clasificado en superficiales, intermedias e internas, basándose en la localización de sus dendritas basales en esta capa (Mori et al. 1983; Ezeh et al. 1993). Por el contrario, los cuerpos celulares de las células mitrales se localizan principalmente en la capa mitral y en la capa plexiforme externa (Nagayama et al. 2014). Los axones de las células mitrales y de las células empenachadas se distribuyen por la capa plexiforme interna (García-Verdugo et al. 1986; Matsuno et al. 2017).

Adicionalmente, en el BOA se encuentran células redondas principales de proyección, las cuales se caracterizan por tener un soma redondo, de mediano tamaño. Estas células emiten dendritas que a su vez originan dendritas secundarias largas, comúnmente con ramas terminales.

La capa de células mitrales del BOP alberga los somas de estas células. Al contrario de lo que sucede en la capa plexiforme externa, donde no es habitual encontrar células empenachadas rodeadas por otras células empenachadas, en la capa mitral, los cuerpos celulares de las células mitrales suelen estar rodeadas por células mitrales adyacentes. Esta cercanía facilita una mayor interacción sináptica recíproca con las células granulares en comparación con la que se establece entre las células empenachadas. Además, se han identificado dos subtipos de células mitrales en el BOP, basados en la profundidad de sus dendritas secundarias en la capa plexiforme externa: las células mitrales de tipo I y de tipo II (Nagayama et al. 2014). Las células mitrales de tipo I y sus dendritas secundarias se localizan en la subcapa más profunda de la capa plexiforme externa. Por el contrario, las células mitrales de tipo II y sus dendritas basales pueden encontrarse en la subcapa intermedia de la capa plexiforme externa (Dryer y Graziadei 1994).

En cuanto a la morfología de los somas de las células mitrales del BOA, ésta se correlaciona con el número de dendritas glomerulares que emiten. Por lo tanto, los somas pueden poseer una morfología ovalada, triangular o poliédrica y originar dos, tres o más dendritas primarias, respectivamente. Los somas bipolares son más numerosos en las zonas adyacentes a la capa granular externa y a la capa mitral, mientras que los somas triangulares y poliédricos son más frecuentes en la capa plexiforme externa. Es importante destacar, debido a la variada distribución de las células mitrales y sus procesos en las capas plexiforme externa, mitral y granular, existe una marcada variación en la forma, de modo que las células mitrales comparables entre sí son excepciones (Larriva-Sahd 2008).

La capa granular interna del BOA se localiza entre el tracto olfativo lateral y la sustancia blanca profunda. Rostralmente se relaciona con la porción caudoventral de la capa granular interna del BOP, y caudalmente con la porción dorsal y medial del núcleo olfativo anterior. Morfológicamente, esta capa se compone de entre cuatro a seis cordones de neuronas pequeñas y redondas, interconectadas entre sí. Cada cordón horizontal se encuentra separado del adyacente por una pequeña porción de neuropilo, axones mielínicos y capilares sanguíneos (Larriva-Sahd 2008).

En la capa granular interna se localizan las células granulares. Son interneuronas inhibitorias, carentes de axones, que extienden sus dendritas hacia la capa plexiforme externa. En ella establecen sinapsis recíprocas mediante espinas dendríticas con las dendritas secundarias de las células mitrales y las células empenachadas, modulando así su señal (Nagayama et al. 2014). Las células granulares poseen un soma redondo o triangular, y emiten una dendrita primaria gruesa y ascendente. Dependiendo del número y posición de estas dendritas, las células granulares pueden adoptar formas piramidales, bipolares o de bicornio. La dendrita primaria ascendente atraviesa el tracto olfativo lateral para hacer sinapsis en la capa mitral y/o plexiforme externa (Larriva-Sahd 2008) y su grado de ramificación está correlacionado con la posición del soma, estando más ramificadas en posiciones superficiales (Valverde et al. 1989).

La capa granular posee una importancia decisiva en la capacidad regenerativa del SVN, ya que se encuentra en relación directa con la zona subventricular a la cual llega la corriente migratoria rostral. Es por tanto el punto de acceso por el cual las nuevas neuronas acceden al BOA. A diferencia de otras partes del cerebro, donde la neurogénesis se limita sobre todo a las primeras fases de desarrollo, la neurogénesis se produce durante toda la vida del animal tanto a partir de los epitelios olfativos como desde la zona subventricular. La neurogénesis continua en el sistema olfativo se atribuye a la capacidad de las células basales del neuroepitelio para generar nuevas neuronas (Brann y Firestein 2014).

Finalmente, entre las capas granulares externa e interna, en el extremo caudolateral del BOA se localiza el tracto olfativo lateral, que discurre en un sentido rostromedial. En la porción superficial de la región dorsal del núcleo olfativo anterior, este tracto es un haz relativamente compacto que alcanza la vertiente caudolateral del BOA, dividiéndose en fascículos horizontales dispuestos diagonalmente, de lateral a medial. Entre estos haces axonales se sitúan las dendritas ascendentes de las células granulares (Meisami y Bhatnagar 1998).

Circuito básico

En el BOP la señal generada en los receptores olfativos se procesa inicialmente en los glomérulos. Posteriormente, esta señal se propaga a través de la capa plexiforme externa a través de las dendritas primarias de los dos tipos de células de proyección, las células mitrales y las células empenachadas. La señal alcanza los cuerpos celulares de las células empenachadas en la capa plexiforme externa y los de las células mitrales en la capa mitral, distribuyéndose horizontalmente a través de las dendritas secundarias en la capa plexiforme externa. La señal es modificada a través de la inhibición local procedente de las células granulares, un proceso conocido como inhibición lateral, que reduce la actividad de otras células mitrales o empenachadas mediante interacciones dendro-dendríticas con células granulares u otras interneuronas próximas (Nagayama et al. 2014). Las neuronas olfativas que expresan un tipo de receptor específico convergen en un único glomérulo, y cada neurona de proyección realizará sinapsis con un único glomérulo, maximizando así la precisión y sensibilidad de la señal (Keverne 1999).

En el BOA, las fibras vomeronasales se introducen y arborizan dentro de la capa glomerular, estableciendo conexiones sinápticas excitatorias con las dendritas de las células de la capa mitral-empenachada (M/T) en los glomérulos. Las neuronas que expresan el mismo

receptor proyectan a distintos glomérulos, mientras que un único glomérulo puede recibir inputs de varios tipos de receptores. Las células mitrales del BOA, que son sus células de proyección, contactan mediante sus dendritas apicales con varios glomérulos. Las células M/T dirigen después sus axones a través del tracto olfativo lateral hacia áreas específicas de la amígdala, conocidas colectivamente como la amígdala vomeronasal, que incluyen principalmente los núcleos corticales y mediales posteromediales, así como el núcleo del tracto olfativo lateral (Winans y Scalia 1970; Jagalska-Majewska et al. 2001; Pardo-Bellver et al. 2012; Cádiz-Moretti et al. 2016).

En las regiones hipotalámicas, la información quimiosensorial vomeronasal se integra con los mecanismos neuroendocrinos reproductivos del animal, así como con sistemas neuroconductuales alojados en el hipotálamo y otras áreas límbicas. Estos sistemas controlan aspectos instintivos y aprendidos de comportamiento, como el sexo, la reproducción, la gestación, la identificación de la pareja, la conexión materno-infantil, el reconocimiento intrafamiliar e intraespecífico de los individuos, e incluso las actividades de alimentación. Similar al SOP (sistema olfativo principal), el SVN también recibe proyecciones centrífugas dirigidas a varias regiones del BOA, procedentes de la amígdala vomeronasal o del mesencéfalo (Brennan y Keverne 1997; Meisami y Bhatnagar 1998; Fan y Luo 2009; Inbar et al. 2022).

1.3.3.3 Zonación

Como se ha mencionado anteriormente, el epitelio sensorial del OVN contiene células neurorreceptoras, células de sostén y células basales. Las células neurosensoriales poseen receptores transmembrana acoplados a proteínas G (receptores vomeronasales V1R y V2R). Los receptores V1R están asociados a la proteína $G\alpha_{i2}$, y tienen un terminal NH_2 relativamente corto. Los receptores V2R están acoplados a proteína $G\alpha_0$ y se caracterizan por poseer un dominio transmembrana largo (Keverne 1999). Existen estudios que sugieren que cada neurona sensorial expresa únicamente un tipo de receptor (Dulac y Axel 1995), y por lo tanto, cada célula neurorreceptora está especializada en un tipo específico de ligando.

Existe una subdivisión en la proyección de los axones procedentes de los dos tipos de receptores vomeronasales, V1R y V2R. Así, hay una proyección zonal desde las neuronas sensoriales vomeronasales que expresan V1R, ubicadas en la región apical del epitelio, hacia la región anterior del BOA. De manera similar, las neuronas basales que expresan V2R proyectan a la porción posterior del BOA. Este tipo de proyección zonal se encuentra en una amplia variedad de especies, incluyendo ratones, ratas, cobayas, conejos y ualabíes (Keverne 1999; Larriva-Sahd 2008; Schröder et al. 2020; Villamayor et al. 2020; Torres et al. 2022). En especies que expresan únicamente V1R en sus células neurosensoriales, éstas proyectarán hacia la totalidad del BOA, como sucede en las cabras y en los perros (Takigami et al. 2000; Salazar et al. 2013). Esto ha llevado a la definición de dos tipos de modelos de proyección axonal: el modelo segregado y el modelo uniforme.

1.3.3.4 Proyecciones secundarias y aferencias

Aferencias

El BOA recibe información quimiosensorial directamente de los nervios vomeronasales. Adicionalmente, recibe aferencias centrífugas procedentes de distintos centros nerviosos, como

es el caso del núcleo lecho de la estría terminal y la amígdala vomeronasal. En ambos casos son proyecciones recíprocas al BOA, formando así un circuito de retroalimentación (Gomez y Newman 1992). Ambas proyecciones de retroalimentación al BOA están organizadas topográficamente y utilizan diferentes neurotransmisores (Fan y Luo 2009). Específicamente, las proyecciones GABAérgicas del núcleo lecho terminan en la capa celular externa, mientras que las proyecciones glutamatérgicas de la amígdala se dirigen a la capa interna de células granulares. La relevancia de esta vía ha sido confirmada desde aproximaciones morfofuncionales (Inbar et al. 2022; Pardo-Bellver et al. 2022).

Asimismo, el BOA también recibe proyecciones noradrenérgicas desde el *locus coeruleus*, las cuales se dirigen principalmente a las capas granular y plexiforme externa. Estas proyecciones son esenciales para el aprendizaje de la importancia que poseen determinadas señales químicas para el éxito reproductivo o la supervivencia. Aunque son decisivas en el aprendizaje de esta información, no lo son para la recuperación de la información previamente aprendida (Brennan y Keverne 1997, 2004). Adicionalmente, la banda diagonal de Broca es el origen de numerosas fibras colinérgicas implicadas en un aumento de la excitabilidad de las células granulares (Takahashi y Kaba 2010), mientras que desde el rafe se envían abundantes fibras serotoninérgicas a ambos bulbos olfativos que actúan de forma similar a las colinérgicas (Huang et al. 2017). Estas interacciones reflejan la complejidad de las redes neuronales involucradas en la percepción y procesamiento de la información olfativa en el BOA.

Proyecciones secundarias (eferencias)

Los estudios clásicos realizados en el BOA con trazadores, han mostrado como éste envía fibras de proyección hacia la capa plexiforme externa de núcleos corticales medial y posteromedial de la amígdala, hacia el núcleo del lecho del tracto olfativo accesorio y el núcleo del lecho de la estría terminal (Scalia y Winans 1975; Devor 1976; Davis et al. 1978; Martínez-Marcos 2009; Gutiérrez-Castellanos et al. 2014). Por lo tanto, contrariamente a lo que sucede en el sistema olfativo principal, las proyecciones eferentes del BOA no se distribuyen hacia el eje talamocortical. La vía de proyección del OVN evade por consiguiente centros cognitivos superiores, proyectando a áreas del hipotálamo medio-basal, con el fin de desencadenar respuestas comportamentales y neuroendocrinas innatas y estereotipadas (Dulac y Axel 1995; Keverne 1999; Lo y Anderson 2011). Resulta significativo observar que las vías de señalización olfativas y vomeronasales se entrecruzan en ciertas áreas, particularmente en la corteza amigdaloida y la amígdala medial. Este fenómeno sugiere la existencia de trayectos anatómicos específicos que contribuyen a una integración exhaustiva de los datos olfativos y vomeronasales (Pro-Sistiaga et al. 2007; Pardo-Bellver et al. 2012; Cadiz et al. 2013).

1.3.4 Neuroquímica del sistema vomeronasal

El estudio detallado de la diversidad morfofuncional del sistema vomeronasal ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas a partir de la década de los años 70, aunque con un avance especialmente notable a partir de la década de los años 80.

La identificación del patrón de expresión de las subunidades de la proteína G, G α 2 y G α o ha proporcionado información valiosa sobre la cascada de transducción de los principales receptores vomeronasales, V1R y V2R, en la vía vomeronasal. Este enfoque ha sido

utilizado extensivamente en el estudio del sistema (Halpern et al. 1995; Berghard y Buck 1996; Jia y Halpern 1996; Schneider et al. 2012; Kondoh et al. 2022; Torres et al. 2022).

El uso del marcador específico de la expresión de la proteína marcadora olfativa (OMP), la cual se expresa en neuronas maduras tanto del SVN como del sistema olfativo principal, ha sido crucial para el estudio de la madurez morfológica en ambos sistemas (Rodewald et al. 2016; Albeanu et al. 2018).

GAP43 es una fosfoproteína específica de las neuronas cuya expresión está asociada con el desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica, ha sido ampliamente utilizada en la identificación de neuronas de nueva generación (Verhaagen et al. 1989; Gispen et al. 1991; Dennis et al. 2003; Torres et al. 2021). En el ámbito del desarrollo y la plasticidad neuronal, es relevante el estudio de la expresión de NCAM y la neurestina. La molécula de adhesión celular neural (NCAM) desempeña un papel importante en la adhesión y comunicación entre las células nerviosas, incluidas las neuronas olfativas y las neuronas del sistema vomeronasal (Yoshida-Matsuoka et al. 2000; de la Rosa-Prieto et al. 2010). La neurestina es una proteína transmembrana cuya expresión se regula en durante el desarrollo de las neuronas (Otaki y Firestein 1999).

El uso de anticuerpos frente a GFAP, un marcador específico de células gliales, ha permitido la descripción del patrón trabecular de las capas nerviosa y glomerular del BOA principal, tal como lo delimita la glía envolvente de los nervios vomeronasales (Doucette 1984; Salazar et al. 2006). La utilización de anticuerpos Anti-MAP2 es útil para el marcaje específico de los somas y las proyecciones dendríticas de las células principales del BOA (Dehmelt y Halpain 2005; Villamayor et al. 2020).

Finalmente, el “producto génico de la proteína 9.5” (PGP 9.5) o ubiquitina C-terminal hidrolasa-L1 (UCH-L1), común en neuronas y células neuroendocrinas, se utiliza como marcador neuronal en el sistema olfativo y vomeronasal. Su función en la regulación de la función neuronal y su presencia en diversas áreas del sistema nervioso, incluidos los receptores olfativos y vomeronasales, lo convierten en una herramienta valiosa para el estudio de estos sistemas sensoriales (Witt et al. 2002; Ibrahim et al. 2015; Lee et al. 2016).

La distribución de las proteínas ligantes de calcio, como calbindina (CB), calretinina (CR), parvalbúmina (PV) y secretagoguina (SG) es crucial para la regulación de las concentraciones citosólicas de iones de calcio libre en las neuronas. Asimismo, estas proteínas se han reconocido anteriormente como marcadores neuronales muy útiles para identificar regiones cerebrales específicas y subpoblaciones neuronales discretas (Kishimoto et al. 1993; Wagner et al. 2000; Coppola y Disney 2018; Pérez-Revuelta et al. 2020; Góis Morais et al. 2021).

El estudio utilizando técnicas histoquímicas con NADPH-diaforasa, un marcador para enzimas oxidoreductasas que requieren de NADPH como cofactor, ha podido desvelar la gran heterogeneidad del SVN y olfativo (Alonso et al. 1998). La utilización de lectinas ha sido efectiva para identificar patrones de expresión de glicoconjugados en los subsistemas olfativos, evidenciando una gran heterogeneidad en la presencia de epítomos de carbohidratos en los distintas componentes del SVN. El estudio con lectinas permite diferenciar, en distintas especies, la zonación del BOA y del epitelio vomeronasal con gran precisión, por ejemplo

(Takami et al. 1992b; Torres et al. 2020). Algunas de las lectinas más empleadas debido a su utilidad en el marcaje de la vía vomeronasal y olfativa son la *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B₄) (Ichikawa et al. 1992), aglutinina de soja (SBA) (Torres et al. 2023a), aglutinina del tojo (*Ulex europaeus* I (UEA-I)) (Salazar et al. 1994b; Kondoh et al. 2017a), la aglutinina del germen de trigo (*Triticum vulgare*, WGA) (Lee et al. 2016), la lectina de tomate *Lycopersicon esculentum* (LEA) (Yang et al. 2021), *Vicia villosa* (VVA) (Park et al. 2012), o la lectina de la patata, *Solanum tuberosum* (STA) (Keller et al. 2022).

1.4 DIVERSIDAD MORFOFUNCIONAL EN LOS DISTINTOS ÓRDENES DE MAMÍFEROS

1.4.1 Rodentia

Los roedores de laboratorio, particularmente las ratas y los ratones, representan el grupo de mamíferos en el que el estudio del OVN ha sido más exhaustivo y detallado. Estos animales son modelos de investigación biomédica y biológica establecidos, seleccionados por su tamaño manejable, su corto ciclo de vida y la facilidad con la que pueden ser criados y mantenidos en entornos controlados. Esta accesibilidad ha permitido acumular un amplio conocimiento sobre su anatomía y fisiología, incluyendo aspectos muy detallados del OVN. Otro aspecto relevante es la genética manipulable de los roedores de laboratorio. Los ratones, en particular, tienen genomas que pueden ser alterados para crear modelos genéticos específicos. Esto ha permitido investigar el papel de genes concretos en la función del OVN, utilizando, por ejemplo, ratones knockout para estudiar los efectos de la eliminación o modificación de genes específicos.

El estudio del OVN de los roedores ha sido clave para descifrar el papel de las feromonas en comportamientos como la agresión, el apareamiento y las conductas maternas. Asimismo, comprender cómo los roedores detectan y responden a las feromonas puede influir en el desarrollo de estrategias para el control de plagas o en la investigación de trastornos del comportamiento humano.

El OVN en la rata (*Rattus norvegicus*) es una estructura tubular que muestra diferentes características a lo largo de su eje longitudinal. En la porción rostral, el OVN tiene una morfología aplanada lateralmente, mientras que caudalmente adquiere una forma de medialuna y adquiere un mayor tamaño (Vaccarezza et al. 1981). El OVN rota a lo largo de su eje longitudinal, de tal forma que en su extremidad caudal la pared medial se convierte en inferior y la lateral en superior. En su extremidad caudal el órgano disminuye de tamaño y finaliza en ramificaciones glandulares. En cuanto a su funcionalidad durante su desarrollo, Garrosa et al (1992) indican que existe actividad funcional al nacer, y que, además, el desarrollo del órgano continúa durante las primeras tres semanas posnatales para finalmente adquirir su plena capacidad funcional.

Histológicamente, la porción rostral se caracteriza por un epitelio pseudoestratificado que envuelve el lumen, conteniendo células basales, neuronas bipolares y células de sostén (Vaccarezza et al. 1981; Weiler 2005). Este epitelio se diferencia de un epitelio respiratorio propiamente dicho, de tal forma que algunos autores recomiendan evitar este término para referirse al mismo, reemplazándolo por términos como “epitelio no sensorial” o “epitelio libre de receptores” propuesto por Breipohl et al (1979).

El segmento medio del OVN presenta en su pared lateral un epitelio pseudoestratificado similar al descrito anteriormente, mientras que en la pared opuesta se encuentra el epitelio neurosensorial vomeronasal. Con el microscopio óptico es posible distinguir las características morfológicas diferenciales entre ambos epitelios, por ejemplo, la diferencia de grosor. El segmento más caudal del OVN exhibe un epitelio columnar simple que se continúa con el de los conductos glandulares.

Un examen más detallado del epitelio neurosensorial vomeronasal muestra como está formado por tres tipos de procesos celulares que se entremezclan, cada uno de los cuales muestra características particulares: microvellosidades procedentes de dendritas de células bipolares y microvellosidades procedentes de células de sostén. La superficie del epitelio vomeronasal muestra una distribución y disposición irregular de estos procesos. Adicionalmente, en el epitelio neurosensorial pueden encontrarse capilares sanguíneos intraepiteliales, los cuales están ausentes en el epitelio respiratorio vomeronasal (Vaccarezza et al. 1981; Mendoza 1993).

La microscopía electrónica revela con detalle la estructura de los cilios del epitelio no sensorial, compuesto por dos segmentos, uno corto proximal y uno largo distal. Las dendritas de las neuronas del epitelio sensorial acceden al lumen del OVN mediante numerosos microvilli ramificados, embebidos en una capa mucosa (Mendoza 1993).

La cápsula vomeronasal en ratas adultas es de naturaleza ósea, mientras que en los juveniles, es ósea externamente y cartilaginosa internamente. En individuos muy jóvenes la cápsula es enteramente cartilaginosa. Estos cambios en la naturaleza del tejido no son el resultado de la osificación del cartílago, sino del desplazamiento físico del cartílago por la expansión de los huesos vómer e incisivo (Salazar y Sánchez Quinteiro, 1998b).

El sistema vascular en el OVN posee una especial relevancia, ya que juega un papel importante en el llenado y vaciado del conducto vomeronasal, y por tanto en la funcionalidad del OVN (Meredith et al. 1980). En ratas, la sangre accede al OVN a través de una rama de la arteria esfenopalatina, y drena en una vena asociada. Dentro del propio órgano, una única vena destaca por su gran tamaño, pero se acompaña de numerosas venas de menor tamaño, las cuales presentan conjuntamente una nítida distribución heterogénea (Salazar y Sánchez Quinteiro 1998b). En cuanto a la comunicación del conducto vomeronasal, éste se abre directamente a la cavidad nasal en los roedores (Wysocki 1979).

En la rata, el epitelio vomeronasal expresa doblemente los receptores V1R y V2R, tal como demuestra la inmunoreactividad frente a los anticuerpos anti-Gai2 (en la zona apical del epitelio sensorial) y Gao (en la zona basal del epitelio sensorial) (Matsuoka et al. 2001). A nivel del BO, la proteína Gai2 se localiza casi exclusivamente en el BOA, pues está presente solo en niveles muy bajos en el BOP. El patrón único de inmunorreactividad específica para Gai2 y Gao dentro de los glomérulos del BOA y los resultados de los inmunoensayos indican que el BOA se divide en dos partes: la región anterior es rica en Gai2, mientras que la región posterior es rica en Gao. Estos hallazgos sugieren que el BOA tiene dos especializaciones funcionales diferentes. Además, se sabe que la concentración de Gai2 en el BOA aumenta durante la pubertad y hasta la adultez, mientras que en el BOP permanece constante. En contraste, las concentraciones de Gao en el BOA y el BOP aumentan de forma similar.

Estos hallazgos sugieren que *Gai2* es una proteína clave en la transducción de señales en el BOA, y que su incremento está relacionado con la madurez sexual (Shinohara et al. 1992).

La proteína PGP 9.5 se expresa en el OVN de ratas desde una etapa temprana del desarrollo embrionario, manteniéndose en células receptoras y fibras nerviosas durante toda la vida adulta de las ratas. Esto sugiere que PGP 9.5 juega un papel fundamental en el desarrollo y la función del OVN, lo que podría tener implicaciones importantes para la percepción y el procesamiento de feromonas y señales químicas en estos animales (Johnson et al. 1994). Además, se ha investigado la presencia de la proteína marcadora olfativa (OMP) en el OVN de la rata encontrándose que esta se encuentra principalmente en los cilios y dendritas de las células sensoriales. Además, se ha observado que las glándulas vomeronasales contenían gránulos secretorios positivos para OMP. Estos hallazgos sugieren que el OVN de las ratas contiene neuronas sensoriales y posiblemente células sensoriales secundarias, y que la OMP podría ser liberada en las secreciones vomeronasales (Rodewald et al. 2016).

El SVN de los roedores se ha estudiado también mediante la utilización del marcaje histoquímico con lectinas; aglutininas, mayoritariamente de origen vegetal, que muestran alta especificidad hacia glicoconjugados (Lis y Sharon 1998). En el BOA de la rata, la lectina *Bandeiraea simplicifolia* se une específicamente a los nervios vomeronasales y capas glomerulares del BOA (Ichikawa et al. 1992). Otras lectinas como UEA y LEA se unen a estas regiones, así como al BOP (Lee et al. 2012). La fitohemaglutinina de soja mostró un patrón similar, pero con algunas diferencias. Tampoco las lectinas VVA y *Erythrina cristagalli* son específicas para el SVN, aunque se unen al mismo. Frente a ellas, la lectina *Dolichos biflorus* no muestra ninguna afinidad hacia los tejidos vomeronasales de la rata. Estos hallazgos sugieren amplias diferencias en la afinidad de las lectinas con las diversas partes del SVN de las ratas (Salazar y Sánchez Quinteiro 1998a).

En el ratón, *Mus musculus*, las neuronas olfativas se distribuyen en diferentes tipos de epitelio a lo largo de las distintas regiones de la cavidad nasal (Barrios et al. 2014). Las neuronas sensoriales vomeronasales se encuentran en el epitelio receptor, situado en la porción interior medial del conducto vomeronasal. Estas neuronas no tienen contacto con la mucosa de la cavidad nasal. En el ganglio de Gmeberg, situado en el vestíbulo nasal, se encuentra una pequeña población de neuronas sensoriales olfativas adyacentes al epitelio, pero no en su seno. Con la excepción del ganglio de Gmeberg, todos los tejidos que expresan la proteína marcadora olfativa (OMP), incluyendo las cuatro regiones nasales mencionadas, los nervios olfativos vomeronasales y principales, y el BOA y el BOP, son también marcados por la lectina LEA. Por otra parte, al igual que en la rata, la lectina UEA marca específicamente todos los tejidos que expresan la proteína *Gai2*. Esto incluye a las neuronas sensoriales apicales del OVN, sus axones y sus proyecciones glomerulares en el BOA anterior (Barrios et al. 2014). No obstante, un estudio posterior utilizando la lectina UEA en el SVN del ratón pone en duda la utilidad de esta lectina para discernir la zonación en esta especie (Kondoh et al. 2017a).

El epitelio sensorial del OVN está en continua renovación en la capa de células de soporte, en los límites entre el epitelio sensorial y el no sensorial y en la región epitelial basal del OVN (Barber y Raisman 1978; Giacobini et al. 2000). La diferenciación de las neuronas sensoriales del epitelio en neuronas que expresan los receptores vomeronasales de la familia V2R depende de la expresión del receptor Notch1, indicando por tanto que la

señalización a través de Notch desempeña un papel fundamental en la iniciación de la dicotomía de diferenciación binaria en el OVN de los roedores (Katreddi et al. 2022).

En el caso del OVN de la rata topo desnuda (*Cryptomys hottentotus* y *Fukomys damarensis*), se observa un epitelio neurosensorial de un menor volumen del esperado, lo que podría sugerir un desarrollo deficiente. Se ha estudiado el OVN de la rata todo desnuda mediante anticuerpos anti- Ki67, revelando un epitelio sensorial mitóticamente activo. Además, los estudios con GAP43 indican neurogénesis, dado que el estudio con anticuerpos anti-OMP muestra células positivas, aunque en menor número en comparación con las células GAP43, lo que señala una intensa renovación neuronal del epitelio sensorial (Dennis et al. 2020).

El sistema vomeronasal desempeña un papel crucial en el comportamiento sociosexual de los roedores, tal como sucede en el reconocimiento de las crías o de la pareja sexual por parte de los machos (Mennella y Moltz 1988; Brennan 2004), en el comportamiento de acicalamiento que las madres muestran hacia las crías en la región anogenital durante los primeros días de vida (Del Cerro 1998; Brouette–Lahlou et al. 1999), en la detección de señales de alarma intraespecíficas dentro de la especie (Fortes-Marco et al. 2013; Kiyokawa et al. 2013; Fortes-Marco et al. 2015), en la transmisión de información relacionada con el género (He et al. 2008), en los comportamientos de agresión o comportamientos sexuales (Clancy et al. 1984; Martín-Sánchez et al. 2015) o en la regulación del ciclo ovárico (Beltramino y Taleisnik 2008).

La gran mayoría de los estudios del SVN en roedores se han centrado en ratas y ratones, principalmente en especies altamente domesticadas, como los roedores de laboratorio. Sin embargo, el estudio de un roedor sin domesticar, como es el capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), proporciona una perspectiva distinta sobre el SVN en roedores, y ayuda a determinar si los hallazgos en ratas y ratones son representativos de toda la familia Rodentia. En el capibara se expresan las dos familias de receptores vomeronasales, V1R y V2R, identificadas mediante el estudio de la expresión de proteínas G (Suárez et al. 2011b). La expresión de estas proteínas presenta una zonación anteroposterior, idéntica a la encontrada en la rata o el ratón. Al igual que en estas especies, esta zonación también se puede distinguir mediante el uso de la lectina UEA. El estudio del SVN en el capibara reveló que esta especie presenta un grado de desarrollo de este sistema muy avanzado en etapas tempranas de su desarrollo (Torres et al. 2020).

1.4.2 Lagomorpha

El SVN de los conejos (*Oryctolagus cuniculus*) muestra un desarrollo avanzado, compartiendo características similares con el de los roedores. La comunicación entre el conducto vomeronasal y la cavidad nasal en los conejos es análoga a la encontrada en los roedores, estableciendo por tanto una comunicación indirecta con la cavidad oral mediante un conducto nasopalatino funcional. Un aspecto específico de los lagomorfos la presencia de una doble envoltura, ósea externamente y cartilaginosa internamente, junto con senos venosos prominentes. Estas características subrayan el papel crucial que desempeña en esta especie el mecanismo de bombeo que facilita la introducción de las señales químicas en el conducto vomeronasal. Las propiedades funcionales del órgano se ven confirmadas por la presencia de un neuroepitelio bien desarrollado y un profuso tejido glandular rico en mucopolisacáridos neutros. La expresión de las dos familias de proteínas G en el OVN del conejo sitúa a los

Lagomorpha, junto con los roedores, marsupiales e insectívoros, en el pequeño grupo de mamíferos que siguen el modelo de dos vías de transducción. En su conjunto, todos estos hallazgos apoyan la noción de que el conejo posee un OVN muy desarrollado, con características morfológicas únicas, lo que resalta la significancia de la quimiocomunicación en esta especie (Luckhaus 1969; Schaal et al. 2003; Elgayar et al. 2014; Villamayor et al. 2018; Mahdy et al. 2019).

El patrón de expresión de proteínas G se mantiene en el BOA, mostrando un patrón anteroposterior idéntico al encontrado en los roedores. No obstante, el conejo presenta una serie de clústeres neuronales sub-bulbares en la materia blanca. Dos de estas formaciones no han sido previamente caracterizadas en ninguna especie (Villamayor et al. 2020). Se desconoce el significado funcional de estos agregados neuronales, pero su presencia es indicadora de como el procesamiento de las señales feromonales y olfativas puede llegar a ser altamente sofisticado.

1.4.3 Marsupialia

La infraclase Marsupialia se clasifica en dos superórdenes: Ameridelphia, que incluye a los marsupiales de América, y Australidelphia, correspondiente a los marsupiales de Australia. Dentro de Ameridelphia, el superorden que incluye a las zarigüeyas, se encuentran dos órdenes: Didelphimorphia, con 108 especies, y Paucituberculata, con 7 especies.

Los marsupiales destacan por poseer un desarrollo altamente avanzado del SVN, dentro de la Clase Mammalia (Wöhrmann-Repenning 1984). Presentan aproximadamente 90 genes V2R intactos, mientras que otras especies como los chimpancés, macacos, vacas o perros, poseen un elenco más reducido (Young y Trask 2007). Además, los marsupiales muestran una alta conservación del sistema vomeronasal en comparación con otros mamíferos. Todos disponen de un órgano vomeronasal y un conducto nasopalatino, carecen de cartílago en el conducto nasopalatino, presentan ausencia o desarrollo incipiente del cartílago palatino, y la estructura general del suelo de la cavidad nasal es uniforme en todas las especies (Sánchez-Villagra 2001).

Las cavidades nasal y oral en los marsupiales están conectadas mediante el conducto nasopalatino, el cual se abre a la cavidad oral a través de una abertura en la papila incisiva. A su vez, el conducto vomeronasal se comunica con el conducto nasopalatino (Kratsing 1982).

Aunque el sistema vomeronasal del ualabí se propuso inicialmente como un tercer modelo en la organización de la expresión de proteínas G en el SVN, identificado como un modelo intermedio (Schneider et al. 2008), recientemente se ha demostrado que el ualabí exhibe un marcaje inmunohistoquímico canónico para los anticuerpos anti-G α i2 y G α o, tanto en el OVN como en el BOA, caracterizado por una zonación anteroposterior en el BOA (Torres et al. 2022).

Además, se ha evidenciado la relevancia del sistema vomeronasal en aspectos como la preferencia alimentaria en la zarigüeya (*Monodelphis domestica*) (Halpern et al. 2005), y se ha observado que en algunas especies de marsupiales se producen adaptaciones estacionales en el OVN (Aland et al. 2016).

1.4.4 Orden Monotremata

Los monotremas son el único grupo de mamíferos que ovipositan en lugar de dar a luz crías vivas. Este grupo incluye a los subgrupos Ornithorhynchidae y Tachyglossidae, que se corresponden con el ornitorrino y el equidna, respectivamente. En el caso del ornitorrinco (*Ornithorhynchus sp.*), se observa una llamativa particularidad anatómica. La entrada al OVN no se encuentra en la porción anterior de la cavidad nasal, como es común en otros mamíferos. Por el contrario, la entrada se localiza cerca de la mitad de la longitud del OVN, abriéndose directamente a la cavidad oral, en lugar de hacerlo al conducto nasopalatino o a la cavidad nasal (Wysocki 1979).

El bulbo olfativo del ornitorrinco es de un menor tamaño que aquel del equidna, y esto se correlaciona a su vez con el número de receptores olfativos de cada especie (Ashwell 2006, 2012; Ashwell y Phillips 2006). A pesar de que las diferencias en el tamaño del bulbo olfativo influyen en la capacidad de estas especies para percibir a sus presas, el ornitorrinco posee un BOA de mayor tamaño comparado con el equidna (Zhou et al. 2021). En consonancia con esto, es reseñable que el ornitorrinco posee el repertorio más grande de genes V1R (262) y casi el mayor repertorio combinado de genes V1R y V2R entre los vertebrados (Grus et al. 2007). Este hecho cuestiona la teoría de que el olfato, y en particular el sistema vomeronasal, no es importante para los mamíferos semiacuáticos, y subraya la necesidad de más estudios en este ámbito. Además, este dato sugiere una diversificación notable de estos dos subsistemas olfativos en los monotremas.

1.4.5 Primates

Tradicionalmente se ha considerado que el órgano vomeronasal de los primates, está bien desarrollado en los monos del Nuevo Mundo, mientras que en los monos del Viejo Mundo y los grandes simios está ausente en el adulto (Bhatnagar y Meisami 1998). El OVN de los monos del Nuevo Mundo muestra una considerable variación en la extensión del epitelio sensorial. El chimpancé (*Pan troglodytes*) posee un OVN similar al de los humanos, lo cual sugiere que existe una amplia variabilidad en el OVN entre los primates haplorrinos, equiparable a la observada en los quirópteros (Smith et al. 2001).

Sin embargo, investigaciones recientes han revelado la presencia de un sistema vomeronasal desarrollado en prosimios y monos del Viejo Mundo, como los Estrepsirinos, llegando incluso a compararlo con el SVN de los roedores (Garrett et al. 2013; Smith et al. 2015). Además, hay indicios de que el sistema vomeronasal ha evolucionado de manera independiente varias veces entre los primates. Entre los prosimios y los primates platirrinos, se ha encontrado que este órgano está bien desarrollado, aunque con variaciones en su grado de desarrollo. En cambio, entre los primates catarrinos, la pérdida del órgano vomeronasal parece haber ocurrido solo una vez, ya que tanto el OVN como la vía de transducción vomeronasal suelen estar ausentes en estos primates (Bhatnagar y Meisami 1998; Zhang y Webb 2003).

1.4.6 Artiodactila

Los Artiodáctilos constituyen un orden de mamíferos ungulados que abarca los subórdenes Tylopoda, Suina, Ruminantia y Whippomorpha, este último incluyendo a los hipopótamos (*Hippopotamidae*) y a los cetáceos. Estos mamíferos se caracterizan por tener extremidades

terminadas en un número par de dedos, apoyando en el suelo al menos dos de ellos. Una excepción notable son los cetáceos, que han evolucionado aletas en lugar de extremidades. Dentro del suborden Tylopoda, actualmente se reconoce una sola familia vigente: los Camelidae. Los camélidos se distinguen por poseer un OVN bien desarrollado. El órgano presenta en los camélidos una cápsula cartilaginosa parcial en su porción lateral, carece de una cápsula ósea, y muestra un desarrollo discreto del epitelio vomeronasal (Arnautovic et al. 1970; Karimi et al. 2014; Ibrahim et al. 2015; Emam et al. 2016).

El suborden Suina incluye a los cerdos (familia Suidae) y a los pecaríes (familia Tayassuidae). Los cerdos poseen un OVN funcional y anatómicamente bien desarrollado. Éste posee una cápsula íntegramente cartilaginosa, que se cierra por completo, excepto en la parte más dorsal de la región más caudal. Su epitelio sensorial exhibe características morfológicas típicas de un epitelio sensorial funcional. Además, el OVN se comunica efectivamente tanto con la cavidad nasal como con la oral a través del conducto incisivo. En su parénquima presenta una abundancia de nervios vomeronasales y ramas del nervio nasal caudal, junto con una extensa red venosa capilar asociada al epitelio sensorial. Se han identificado numerosas glándulas vomeronasales PAS y azul-alcián positivas, las cuales se abren al lumen vomeronasal (Salazar et al. 1995, 2000; Salazar et al. 2003b; Park et al. 2012; Brunjes et al. 2016; Parkash et al. 2016). Por otro lado, en lo que respecta a los tayasuidos (familia Tayassuidae), hasta la fecha no se han reportado estudios específicos acerca de su sistema vomeronasal.

El suborden Ruminantia engloba mamíferos como las vacas, las cabras o las ovejas, en los cuales se ha estudiado extensamente el sistema vomeronasal. Este suborden se divide en dos infraórdenes: Tragulina y Pecora. En los tres géneros que se incluyen en el infraorden Tragulina, hasta nuestro conocimiento no se han realizado estudios específicos sobre el sistema vomeronasal.

En el infraorden Pecora se integran cinco familias; Antilocapridae (antilocápridos), Giraffidae (jirafa y okapi), Cervidae (cérvidos), bovidae (bóvidos), y Moschidae (mosquidos, comúnmente conocidos como ciervos almizcleros). De la familia Antilocapridae únicamente ha sobrevivido a la extinción una especie, la *Antilocapra americana*, o antílope americano. Aunque no se han realizado estudios anatómicos del SVN en esta especie, existen investigaciones comportamentales que evidencian la funcionalidad del mismo (Moodie y Byers 1989). De la familia Giraffidae se han realizado múltiples estudios en la jirafa, aunque ninguno en el okapi. El OVN de la jirafa presenta una cápsula cartilaginosa completa alrededor del parénquima vomeronasal (Kondoh et al. 2017b) similar a la encontrada en cabras, ovejas o ciervos (Besoluk et al. 2001; Salazar et al. 2007; Vedin et al. 2010; Park et al. 2014). El parénquima presenta glándulas vomeronasales PAS y azul alcián positivas, además de numerosas venas vomeronasales asociadas al epitelio neurosensorial, el cual es positivo para OMP (Kondoh et al. 2017b). A diferencia de los roedores, en la jirafa, el OVN se comunica con la cavidad oral a través de la papila incisiva, una característica compartida con la mayoría de las especies de Ruminantia. Algunos estudios han observado comportamientos, como el *flehmen* en jirafas, que sugieren que el OVN en esta especie es funcional y juega un papel importante en su fisiología (Hart y Hart 2023).

La familia Cervidae, compuesta por los cérvidos, se divide en tres subfamilias: Capreolinae, Cervinae e Hydropotinae, abarcando veinte géneros y cuarenta y ocho especies actuales. La subfamilia Capreolinae incluye géneros como *Alces* (alces euroasiático y americano), *Capreolus* (corzos), *Hippocamelus*, *Odocoileus*, *Ozotoceros* y *Rangifer* (reno o caribú). En el género *Alces*, a pesar de que el alce exhibe una nariz distintiva que podría sugerir diferencias anatómicas en la cavidad nasal, no se observan divergencias significativas en el OVN. La morfología del OVN del alce es similar a la del resto de cérvidos, como el reno (Bertmar 1981). En los alces, el OVN se comunica con la cavidad oral a través del conducto nasopalatino, una característica compartida con el *Ozotoceros bezoarticus*, o “Venado de las Pampas”, cérvido de la subfamilia capreolinae (Lacava Melgratti y Stirling Santos 2017), así como con bóvidos como las vacas o las ovejas. En las cabras, sin embargo, el conducto vomeronasal se abre directamente a la cavidad nasal (Melese-d’Hospital y Hart 1985). El OVN en los alces presenta una gran cantidad de venas y arterias en el parénquima, similar a lo observado en las vacas (Salazar et al. 2008), además de numerosas glándulas vomeronasales serosas y de apariencia tubular, predominantes en las zonas dorsal, lateral y ventral del parénquima (Vedin et al. 2010).

En lo que respecta al género *Capreolus* (corzos), la cabra coreana (*Capreolus pygarsus*) posee un OVN y un BOA bien desarrollados. El parénquima del OVN está rodeado por una cápsula cartilaginosa y alberga numerosas glándulas que drenan su contenido principalmente a las porciones dorsal y ventral del lumen. En el corzo coreano, el neuroepitelio vomeronasal es positivo a una diversidad de lectinas: *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B₄), aglutinina de soja (SBA), aglutinina del tojo (*Ulex europaeus* I (UEA-I)), y a la aglutinina del germen de trigo (*Triticum vulgare*, WGA) (Park et al. 2014; Shin et al. 2017). EL BOA en esta especie posee cuatro capas que incluyen la capa nerviosa vomeronasal, la glomerular, la mitral-plexiforme y la granular (Park et al. 2014). Las capas nerviosa y glomerular del BOA en el corzo coreano muestran reacción positiva ante BSI-B₄, SBA y WGA con diferente grado de intensidad. Este hecho está correlacionado con la reactividad del neuroepitelio sensorial del OVN en esta especie, tal como se reporta en el mismo estudio (Park et al. 2014).

Existe un pequeño estudio en el género *Hippocamelus* que indica la existencia en este género del OVN y documenta el comportamiento de *flehmen* (Barrio 2013). En cuanto al género *Odocoileus*, los estudios se han centrado en observar el comportamiento de *flehmen* (Henderson et al. 1980) y en analizar los compuestos químicos en la orina que activan esta respuesta (Crump et al. 1984). Respecto al género *Ozotoceros*, los estudios se han limitado a análisis morfológicos macroscópicos de la nariz, la cavidad nasal y la laringe. Estos estudios han confirmado la presencia de un OVN con una conexión a la cavidad oral a través del conducto incisivo (Barrios Bermúdez et al. 2015; Lacava Melgratti y Stirling Santos 2017; Vazquez et al. 2018). Finalmente, en el género *Rangifer*, el único estudio significativo fue realizado por Bertmar (1981) quien estableció que el OVN del reno (*Tarandus tarandus*) es relativamente grande en tamaño, sugiriendo su importancia en la vida del animal. Bertmar detalla que el OVN posee una cápsula cartilaginosa y se comunica con la cavidad oral a través del conducto nasopalatino, a la cual se abre a través del agujero incisivo. Este estudio también reveló la presencia de un epitelio sensorial medial y un epitelio no sensorial lateral, y múltiples glándulas de morfología tubular que se abren al lumen.

En la subfamilia Cervinae sólo se ha estudiado una especie el ciervo Cica, del género *Cervus*. Esta especie presenta un OVN con abundantes glándulas vomeronasales, positivas presente a la tinción de azul alción y PAS, y una variedad de vasos sanguíneos lo que sugiere una alta funcionalidad del órgano (Matsubara et al. 2019; Kondoh et al. 2020). Por otro lado, no se han realizado estudios morfológicos sobre el SVN en la subfamilia Hydropotinae.

En la familia Bovidae, se ha estudiado el SVN en las subfamilias Alcelaphinae, Antilopinae (como la gacela dama, *Nanger dama*), Bovinae, Caprinae (las cabras) y Cephalophinae. Así, existen artículos que indican que la subfamilia alcelaphinae carece de un órgano vomeronasal y no exhibe *flehmen* (Cotterill 2003). Otros autores indican que individuos de esta subfamilia carecen de la papila incisiva, y por tanto de conexión del OVN con la cavidad oral, y que además carecen de *flehmen*. No obstante, demuestran la presencia del OVN mediante secciones histológicas del mismo (Hart et al. 1988).

En Antilopinae, específicamente en la gacela dama (*Nanger dama*), se ha observado un desarrollo considerable del OVN, incluyendo su componente vascular, epitelio sensorial y glandular (Torres et al. 2023a). Estos autores caracterizaron por vez de primera la expresión neuroquímica a lo largo de todo el conducto vomeronasal, hallando importantes diferencias. Estos resultados aconsejan realizar estudios similares de forma rutinaria en todas las especies. De esta subfamilia, únicamente se ha estudiado adicionalmente la cavidad nasal de la *Saiga tatarica*, especie del género *Saiga*. No obstante, en el único estudio que existe hasta la fecha de esta subfamilia no se menciona el hallazgo de ninguna estructura que se asemeje a un órgano vomeronasal (Clifford y Witmer 2004).

La familia Bovinae comprende un grupo de diez géneros, incluyendo a las vacas, bisones y búfalos. Del género *Bubalus*, el búfalo doméstico de agua o búfalo común, *Bubalus bubalis*, presenta un OVN bien desarrollado, con un epitelio sensorial medial, positivo frente al anticuerpo S-100 (Saksena y Chandra 1980; Kumar et al. 1981; El-Zoghby 2012; Emam et al. 2016). El OVN del búfalo presenta comunicación con la cavidad oral y nasal mediante el conducto incisivo. Las glándulas del parénquima son positivas frente a PAS, serosas, y secretan su contenido al lumen del OVN (Kassab y El-Shafey 2012). Se ha observado la manifestación del *flehmen* en esta especie, lo que indica la funcionalidad del OVN (Rajananarayanan y Archunan 2004; Barman et al. 2022).

En relación al género *Bos*, específicamente *Bos taurus* (la vaca), y avanzando hacia la familia Caprinae (que incluye las cabras del género *Capra* y las ovejas del género *Ovis*), se observa que estos animales poseen un sistema vomeronasal caracterizado por receptores vomeronasales del tipo V1R, asociados exclusivamente a la proteína G α i2. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado la presencia de genes para receptores V2R en vacas, cabras, ovejas y cerdos (Kondoh et al. 2022). En lo que respecta al OVN, se ha encontrado que las glándulas vomeronasales en la vaca, la cabra y la oveja reaccionan positivamente a las tinciones PAS y azul alción. Esto demuestra la composición ácida y neutra de sus mucopolisacáridos (Salazar et al. 1997a; Kondoh et al. 2020; Jang et al. 2021). El OVN de la vaca se caracteriza por tener un epitelio respiratorio lateral y un epitelio sensorial medial, además de un componente vascular que probablemente facilita la captación de señales químicas ambientales (Salazar et al. 2008). El cartílago posee forma de C, y rostralmente

contiene al conducto incisivo (Jacobs et al. 1981; Salazar et al. 1995). La funcionalidad del OVN en el ganado bovino es evidente, ya que la obliteración del mismo produce cambios sustanciales en la jerarquía social del grupo (Klemm et al. 1984).

Con respecto a la respuesta del OVN a distintas lectinas, Yang et al. (2021) comprobaron que *Bos Taurus*, la vaca, presenta una reacción positiva frente lectinas que reaccionan a N-acetylglucosamina (como la lectina del trigo, de *Datura stramonium*, *Lycopersicum esculentum*, *Solanum tuberosum*), frente a manosa (*Canavalia ensiformis*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*), frente a galactosa/N-acetilgalactosamina (aglutininas de *Ricinus communis*, *Vicia villosa*, *Dolichos biflorus*, *Glycine max*, *Sophora japonica*, *Astocarpus integrifolia*, *Arachis hypogaea* y *Eytrina cristagalli*), frente al complejo tipo N-glycano (*Phaseolus vulgaris*), y frente a fucosa (*Ulex europaeus*-UEA).

En la oveja (*Ovis orientalis aries*) el OVN fue descrito por Kratzing (1971), detallando que posee un epitelio sensorial medial y un epitelio pseudoestratificado lateral, y numerosas glándulas en el parénquima que drenan su contenido al lumen. La funcionalidad del OVN en la oveja fue claramente comprobada por el trabajo realizado por Booth y Katz (2000) quienes comprobaron que el OVN juega un papel crucial en el reconocimiento maternal de las crías, influenciando por tanto su aceptación por parte de la madre. Igualmente, Salazar et al (2003a) hipotetizan en su trabajo sobre el desarrollo del epitelio vomeronasal sensorial que probablemente sea funcional incluso en la etapa fetal. Respecto a la anatomía del OVN en las ovejas, el BOA se localiza en posición ventral en la cara medial del BOP. El BOA muestra una clara definición en sus capas. Un estudio con lectinas sobre esta estructura indicó que no hay una reacción positiva frente a la UEA ni a BSI-B₄ (*Bandeiraea simplicifolia* subunidad B₄) (Salazar et al. 2000). Investigaciones posteriores revelaron que en la oveja, a diferencia de lo que se puede observar en la rata y en el ratón, no existe una zonación anteroposterior en el BOA (Shinohara et al. 1992; Salazar et al. 2007). El análisis del OVN de las ovejas mediante el uso de lectinas reveló diferencias en los tipos y cantidades de glicoconjugados presentes. Las lectinas aglutinina *Dolichos biflorus* (DBA) y la lectina *Datura stramonium* (DSL) reaccionan a células específicas del epitelio sensorial, mientras que lectinas como Concanavalina A (Con A), *Phaseolus vulgaris* aglutinina-E (PHA-E) y *Phaseolus vulgaris* aglutinina-L (PHA-L) se unen a células basales tanto del epitelio sensorial como del epitelio lateral respiratorio (Ibrahim et al. 2013). En cuanto al patrón inmunohistoquímico en la oveja, las células del epitelio neurosensorial muestran un patrón positivo frente a PGP 9.5 y OMP (Ibrahim 2018).

En lo que respecta al género *Capra*, el OVN se caracteriza por presentar dos tipos de epitelio, uno neurosensorial medial y uno respiratorio lateral (Ichikawa et al. 1999). El epitelio vomeronasal de la cabra expresa únicamente receptores vomeronasales V1R, no expresando receptores V2R, un patrón que se replica en el BOA (Takigami et al. 2000). Adicionalmente, algunos autores indican que existen en esta especie dos subpoblaciones de células neurorreceptoras, la primera expresa la proteína G α i2, OMP y GAP43, y la segunda únicamente G α i2 (Wakabayashi et al. 2007).

Con respecto a los cefalófinos (subfamilia Cephalophinae), como los duikers o cefalofos, solo hay un estudio relevante. Este describe un OVN con una cápsula cartilaginosa que rodea

completamente al parénquima vomeronasal y presenta ambos tipos de epitelios bien diferenciados (Ibokwe y Okpe 2009).

En cuanto al orden Artiodactyla, específicamente en el infraorden Cetacea, no se han encontrado evidencias morfológicas de la existencia de un OVN en esta familia (Pihlström 2008; Berta et al. 2014). No obstante, existe un estudio que indica que la ballena gris (*Mysticeti Eschrichtiidae*) posee papila incisiva, lo cual podría indicar, según los propios autores, la presencia de un OVN vestigial (Berta et al. 2015).

1.4.7 Perissodactyla: caballos

El orden Perissodactyla incluye dos superórdenes principales: los Hipomorfos (Hippomorpha), que abarcan a la familia Equidae, y los Ceratomorpha, que actualmente comprenden a las familias Rhinocerotidae (rinocerontes) y Tapiridae (tapires). Los équidos actuales se incluyen dentro del género *Equus*, el cual engloba a los caballos (*Equus ferus caballus*), la cebra (*Equus quagga*, *Equus zebra* y *Equus grevyi*). El OVN de los caballos destaca por poseer un componente glandular particularmente desarrollado (Taniguchi y Mikami 1985) y por poseer un gran desarrollo de nervios en la porción rostral del parénquima vomeronasal, a diferencia de lo que se observa en cerdos o vacas (Salazar et al. 1997a). En cuanto a su patrón inmunohistoquímico, el epitelio sensorial, así como determinadas zonas del epitelio no sensorial ofrecen un patrón positivo frente al inmunomarcaje con PGP9.5 (Chun et al. 2023). Adicionalmente, el epitelio sensorial ofrece un patrón positivo frente a OMP y a la proteína G α i2, pero no frente a la proteína G α o (asociada con el receptor vomeronasal V2R). También se observa positividad frente a 20 tipos de lectinas, incluyendo UEA, SBA, VVA, DBA (con una marcada reacción en células neuroreceptoras), pero no a BSI-B₄ (*Bandeiraea simplicifolia*) (Lee et al. 2016). Estudios han sugerido que el aumento de N-acetilglucosamina durante el desarrollo postnatal en caballos podría estar relacionado con la funcionalidad del OVN en adultos (Chun et al. 2023).

1.4.8 Chiróptera (murciélagos)

Los murciélagos pueden ser el único grupo en el que el SVN es extremadamente variable, desde la ausencia total (incluso en el embrión) hasta poseer un desarrollo considerable con numerosas fases intermedias (Bhatnagar y Meisami 1998). Aunque muchos murciélagos parecen carecer de un SVN funcional, diversos estudios han demostrado la conservación de genes para los receptores V1R (Yohe et al. 2019). Sin embargo, la presencia de pseudogenes de TRPC2 y la falta de genes TRPC2 funcionales en dos subórdenes de Chiroptera (Zhao et al. 2011), sugieren una ausencia de sensibilidad vomeronasal, correlacionándose con la falta anatómica del OVN en estos animales (Yohe et al. 2018).

1.4.9 Carnivora

Encontramos en el Orden Carnivora el suborden Feliformia, y el suborden Caniformia. En el suborden feliformia se encuentran en la actualidad la familia Nandiniidae (civeta africana de las palmeras), el infraorden Feloidea, donde se encuentran la familia Prionodontidae y la familia Felidae; y el infraorden Viverroidea, donde se encuentran la familia Viverridae (civetas, ginetas...), y la superfamilia Herpestoidea (familias Hyaenidae, Eupleridae y Herpestidae).

En el suborden feliformia, existen pocos estudios anatómicos sobre los subsistemas olfativos, y estos se han realizado únicamente en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*) y en la superfamilia Herpestoidea, en el suricata (Torres et al. 2021). En concreto, en el gato doméstico, Kociánová et al. (2006) estudiaron el órgano septal de Maserá en el gato. De la misma forma, Salazar et al. estudiaron el órgano vomeronasal del gato, así como su vascularización y la naturaleza de su cápsula cartilaginosa (Salazar et al. 1995; Salazar 1996b; Salazar et al. 1997b; Salazar y Sánchez-Quinteiro 2011), encontrando un gran desarrollo del mismo en comparación con el perro, pero un menor desarrollo en comparación con distintas especies de roedores (Salazar y Sánchez Quinteiro 1998b; Salazar et al. 2001, 2006; Jia y Halpern 2003; Barrios et al. 2014). También Torres et al. (2021) encontraron un gran desarrollo del sistema vomeronasal en el suricata. Otro estudio (Bininda-Emonds et al. 2001) constata la naturaleza intraespecie de las moléculas semioquímicas, así como su utilidad como marcador filogenético en la familia Felidae.

La importancia de los sistemas olfativos y de las señales químicas en el orden carnívora es reseñable. Aunque no existan hasta la fecha estudios de la anatomía de estos subsistemas en los félidos salvajes, sí existen numerosos estudios que evidencian su importancia. Por ejemplo, se ha visto que las señales químicas de los grandes carnívoros modifican el comportamiento del ciervo (van Beeck Calkoen et al. 2021), y algunas señales químicas han demostrado ser de importancia para el lince (*Lynx lynx*) en el comportamiento de caza (Vogt 2015), e incluso se han utilizado señales químicas en la conservación de esta especie (Vogt et al. 2016). Así mismo, Jones et al. (2017) identificaron señales químicas con influencia en la reproducción en el lobo de crin (*Chrysocyon Brachyurus*).

Existen estudios que evidencian que los félidos, por otra parte, poseen en cierta medida unas capacidades olfativas reducidas en comparación con los cánidos, y que podría reflejar una mayor dependencia de otros sentidos como la visión (van Valkenburgh et al. 2014). No obstante, la información relativa a las características anatómicas de los subsistemas olfativos, en concreto del sistema vomeronasal, no respaldan esta hipótesis, al poseer el gato doméstico (*Felis silvestris catus*, como representante de los félidos) un mayor desarrollo del sistema vomeronasal (Salazar et al. 1996b; Salazar y Sánchez-Quinteiro 2011) comparado con el perro doméstico (*canis lupus familiaris*) (Salazar et al. 1984, 2013; Dennis et al. 2003).

El sistema vomeronasal de los cánidos principalmente ha sido estudiado en el perro (*Canis lupus familiaris*), y en el perro salvaje africano (*Lycaon pictus*). El SVN del perro se encuentra discretamente desarrollado en comparación con otras especies e incluso en comparación con los félidos. Posee grandes senos venosos a ambos lados del conducto vomeronasal, un receptor neurosensorial de moderado desarrollo y un epitelio respiratorio lateral. El epitelio receptor posee células basales, sustentaculares y células receptoras ciliadas (Adams y Wiekamp 1984). En el siguiente apartado se proporcionan más detalles del SVN de los cánidos desde un punto de vista morfofuncional.

Desde el punto de vista fisiológico, existen numerosas evidencias de la funcionalidad del sistema vomeronasal en el orden Carnívora. Se han identificado proteínas urinarias (MUP) con capacidad bioactiva en la orina del Caracal (*Caracal caracal*) (Goitom 2017). Igualmente, se ha asociado el volumen del bulbo olfativo en carnívora con la filogenia y la ecología de la

especie, tal y como la dieta, la actividad, el hábitat, la sociabilidad o el tamaño del grupo (Gittleman 1991). Este estudio identificó que las especies con hábitat acuático (nutria - (*Anihlonys cinerea*, *Pteronura*, *Lutra lutra*; *Enhydra lutris* y el gato pescador – *Prionailurus viverrinus*) poseen un menor volumen del bulbo olfativo, potenciando la hipótesis de que en ambientes semiacuáticos este sistema se encuentra disminuido.

Por último, comentar que hasta la fecha no se ha podido demostrar la presencia del órgano vomeronasal en los peces y las aves. Así mismo, tampoco no se encuentra en los cocodrilos y camaleones, pero está presente y su importancia puede ser incluso mayor que el sistema olfativo principal en algunos otros reptiles. Por ejemplo, el OVN está bien desarrollado en las serpientes (Døving y Trotier 1998).

1.5 SISTEMA VOMERONASAL DE LOS CÁNIDOS

1.5.1 Anatomía macroscópica y microscópica

En el suborden Caniformia se encuentran la familia Canidae, la familia Ursoidea, y las superfamilias Pinnipedia (focas) y Musteloidea. Dentro de la familia Canidae, se han llevado a cabo estudios detallados sobre el perro (*Canis lupus familiaris*), el perro salvaje africano (*Lycaon pictus*) y de forma rudimentaria el zorro (*Vulpes vulpes*), estudio a partir del cual no se pueden extraer conclusiones (Karimi et al. 2016). Se ha observado que tanto en el perro como en el perro salvaje africano, los órganos vomeronasales (OVN) y los bulbos olfatorios accesorios (BOA) están menos desarrollados en comparación con los roedores y, sorprendentemente, con el gato (Adams y Wiekamp 1984; Salazar et al. 1984, 1994b, 2013; Dennis et al. 2003; Yilmaz et al. 2008). No obstante, el perro salvaje africano muestra un desarrollo del BOA más avanzado que el perro doméstico, con una laminación más definida, aunque ambos tienen un tamaño similar de este órgano (Chengetanai et al. 2020).

En lo que respecta a la familia Ursoidea, el estudio del oso pardo (*Ursus arctos*) (Tomiyasu et al. 2017) ha revelado similitudes con el OVN del perro, pero con un desarrollo más pronunciado del componente glandular del parénquima vomeronasal y del componente glandular intraepitelial. Esto sugiere posibles diferencias en las características funcionales de su sistema vomeronasal en comparación con otros cánidos.

Por otro lado, la superfamilia Pinnipedia, que incluye a las familias Odobenidae (cuya única especie no extinta es la morsa – *Odobenus rosmarus*), Otariidae (que abarca a los otarios, osos marinos y leones marinos), y Phocidae (focas verdaderas), no ha sido objeto de estudios morfológicos exhaustivos sobre su sistema olfativo o vomeronasal. Sin embargo, investigaciones recientes que aplican técnicas de TC y microTC sugieren que los bulbos olfatorios en la familia Otariidae están más desarrollados en comparación con otras especies de Pinnipedia (Loza et al. 2023). Además, otros estudios resaltan la importancia de la comunicación quemosensorial en las interacciones sociales y reproductivas de las familias Otariidae y Odobenidae (Charrier 2021).

La superfamilia Musteloidea incluye mamíferos carnívoros de las familias Ailuridae (con una única especie viva, el panda rojo - *Ailurus fulgens*), Mustelidae (comadreja, nutrias, martas y tejones), Procyonidae y Mephitidae.

La superfamilia Musteloidea agrupa a mamíferos carnívoros pertenecientes a las familias Ailuridae, Mustelidae, Procyonidae, y Mephitidae. Entre ellas, la familia Ailuridae destaca por incluir únicamente al panda rojo (*Ailurus fulgens*) como su única especie viva. Aunque no se han realizado estudios morfológicos detallados sobre sus subsistemas olfativos, las referencias bibliográficas subrayan la funcionalidad de estos sistemas y su importancia en el comportamiento y fisiología de la especie (Roberts y Gittleman 1984; Conover y Gittleman 1989; Reid et al. 1991).

De la familia Mustelidae, el hurón (*Mustela furo*) posee un OVN bien desarrollado, con una notable presencia de componentes vasculares y nerviosos, situados en la porción medial de su parénquima vomeronasal (Kelliher et al. 2001). Tanto el hurón como la comadreja poseen un BOA, aunque en el caso del hurón, este no ha sido descrito en detalle (Meisami y Bhatnagar 1998). Sin embargo, en la comadreja, se ha identificado una eminencia en la porción dorsal del bulbo olfatorio principal (BOP), con una laminación definida y un alto desarrollo celular, aunque la descripción carece de imágenes de alta calidad (Crosby y Humphrey 1939). El OVN del visón (*Mustela vison*) se caracteriza por una conexión directa con la cavidad oral, con su cartílago envolviendo completamente al parénquima, el cual contiene glándulas PAS positivas (Salazar et al. 1994a).

Aunque no se han identificado estudios morfológicos que confirmen la existencia de un SVN funcional en las nutrias, investigaciones recientes que demuestran la importancia de la quimiocomunicación en esta especie. Así, Zellmer et al. (2021) y Kean (2012) describen que las nutrias discriminan los olores, pueden determinar el sexo y el estado reproductivo del depositante del olor e incluso sugieren que poseen una glándula vomeronasal, que puede detectar feromonas que transmiten señales sociales o sexuales que influyen en el comportamiento y la fisiología reproductiva. De manera adicional, Especies específicas de nutria (*Enhydra lutris nereis*) han mostrado la respuesta de flehmen (Island et al. 2017), lo que indica un potencial en la comunicación quimiosensorial. Además, estudios sobre nutrias y focas de la familia Phocidae revelan que la inactivación del gen TRPC2 se correlaciona con la ausencia de un OVN funcional (Yu et al. 2010; Hecker et al. 2019). Recientemente se han demostrado indicadores de relajación en la selección purificadora de los genes ancestrales V1R (ancV1R) en ciertos grupos de animales, como focas o nutrias. Estas señales sugieren que estos genes, relacionados con la detección de feromonas, pueden haber experimentado menos presión evolutiva para mantener su funcionalidad óptima. Este fenómeno está vinculado al debate en curso sobre la existencia y funcionalidad del OVN en estos grupos particulares (Zhang y Nikaido 2020).

En el tejón (*Meles meles*), se ha observado el uso de secreciones anales y subcaudales para comunicar información relacionada con la individualidad, sexo, y pertenencia al grupo social (Buesching et al. 2016; Noonan et al. 2019), así como para el marcaje territorial (Buesching y Macdonald 2001). Sin embargo, aún no se han realizado estudios morfológicos que describan su sistema vomeronasal.

Dentro de la familia Procyonidae, se encuentran especies como los mapaches (*Procyon*), cacomistles (*Bassariscus*), coatíes (*Nasua*), kinkajous (*Potos*), olingos (*Bassaricyon*), y olinguitos (*Bassaricyon neblina*) y la familia Mephitidae (mofetas – *Mydidae* y zorrillos – *Mephitidae*). Hasta la fecha, no se han realizado estudios morfológicos que confirmen la existencia de un sistema vomeronasal funcional en las especies de estas familias.

En contraste con esta información morfológica disponible, la importancia funcional del olfato y el uso de señales químicas es bien reconocida dentro de la familia Canidae. Estos mecanismos juegan roles cruciales en el establecimiento y mantenimiento de relaciones interindividuales, en el marcaje territorial, en la caza, y en la transmisión de información relativa al estado reproductivo entre individuos de la misma especie. La eficacia de estas funciones olfativas y quimiosensoriales es fundamental para la supervivencia de las especies de cánidos (Doty 2012; Bidder et al. 2020; Kokocińska-Kusiak et al. 2021; Serwańska-Leja et al. 2023).

1.5.1.1 Inmunohistoquímica

En el ámbito de la familia Caniformia, los estudios inmunohistoquímicos se han centrado en especies de la familia Canidae, específicamente en el perro, así como en el visón y en el oso (*Ursus arctos*). En el caso del perro, se ha observado que las células basales del epitelio vomeronasal muestran inmunoreactividad ante anticuerpos contra la citoqueratina y contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Además, en el epitelio sensorial y en los fascículos axónicos de la lámina propia, se ha detectado inmunoreactividad hacia los receptores de estrógenos (Yilmaz et al. 2008). Otros estudios han encontrado inmunopositividad hacia NCAM, la molécula de adhesión celular neuronal, la beta tubulina específica de neuronas y el producto génico de la proteína 9.5 (PGP 9.5). La subunidad α de la proteína G, específicamente Gai2, mostró inmunoreactividad en la capa de células sensoriales, mientras que existe un debate sobre la reactividad ante la proteína Gao. Las investigaciones de Dennis et al. (2003) sugieren la presencia de neuronas reactivas a anticuerpos anti-Gao en el epitelio neurosensorial vomeronasal, aunque se plantea la posibilidad de falsos positivos debido a técnicas de recuperación antigénica. Posteriormente, Salazar et al. (2013) indicaron que tanto el epitelio vomeronasal como el BOA no reaccionan ante la proteína Gao.

Respecto al oso (*Ursus arctos*), se ha demostrado que las prolongaciones dendríticas de las células receptoras del epitelio son reactivas a la subunidad anti-G de la proteína alfa-i2 (Gai2), pero no a la subunidad anti-G de la proteína alfa-o, indicando una preferencia por la vía V1R-Gai2 en el sistema vomeronasal de los osos, en línea con otros carnívoros (Tomiyasu et al. 2017).

En el visón, se ha encontrado inmunoreactividad en los nervios vomeronasales y en el epitelio vomeronasal del órgano vomeronasal ante anticuerpos anti-enolasa neuroespecífica (Salazar et al. 1994a).

1.5.1.2 Marcaje con Lectinas

La utilización de técnicas histoquímicas con lectinas es crucial para explorar la hipótesis de que el perfil del fluido mucoso secretado por las glándulas asociadas al OVN juega un papel significativo en su funcionalidad. En estudios realizados en perros, la positividad observada

frente a las lectinas UEA y LEA en el epitelio neurosensorial y en el BOA sugiere un patrón de secreción similar en el complejo mucomicroviliario del epitelio neurosensorial y en las capas nerviosa y glomerular del BOA (Salazar et al. 1992). La única diferencia entre ambas lectinas es que la LEA muestra una marcación más específica en la porción basal del epitelio en comparación con otras áreas (Salazar et al. 2013).

En la familia Mustelidae, se ha descubierto que la lectina de soja (SBA) marca intensamente las capas nerviosa y glomerular del BOA tanto en el hurón (Kelliher et al. 2001) como en el visón (Salazar et al. 1998). En esta última especie, ambas capas eran igualmente marcadas por las lectinas UEA, BSI-B₄ y VVA (Salazar et al. 1998). Aunque Kelliher et al. (2001) sugieren la funcionalidad del SVN en el hurón, la confirmación de esta funcionalidad se obtuvo mediante la extirpación del OVN, demostrando su papel en el comportamiento de marcaje territorial (Woodley et al. 2004).

El OVN del oso pardo contiene un componente glandular particularmente desarrollado (Tomiyasu et al. 2017), que secreta fluido mucoso rico en glicoconjugados a la luz del OVN. El OVN del oso contiene dos tipos de glándulas, las glándulas vomeronasales de la submucosa y las glándulas multicelulares intraepiteliales. El estudio de Tomiyasu et al. (2018) con lectinas reveló diferencias en el patrón de marcaje histoquímico entre las glándulas asociadas a la mucosa olfativa y aquellas del OVN, destacando una distinción en el perfil de glicoconjugados de sus secreciones. Lectinas como *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I y *Sophora japonica* resultaron positivas en las glándulas intraepiteliales, mientras que *Datura stramonium* marcó positivamente las secreciones de las glándulas de la submucosa vomeronasal, pero no las intraepiteliales.

1.5.2 Estudio comparado entre cánidos salvajes y domésticos

Hasta el momento, los estudios sobre el sistema vomeronasal se han limitado a dos especies de cánidos salvajes: el perro salvaje africano (*Lycaon pictus*) y el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), aunque en este último de manera rudimentaria y con limitaciones en sus aportaciones. En el estudio de (Chengetanai et al. 2020), se observó que tanto el SOP como el BOA poseen una organización típicamente observada en otros mamíferos, aunque con variaciones de interés. Dentro del bulbo olfatorio principal, el tamaño de los glomérulos se sitúa en el extremo superior del intervalo observado en los mamíferos. Además del mayor tamaño de los glomérulos, se observó también un mayor número de glomérulos del bulbo olfatorio principal. Los autores proponen que en el bulbo olfatorio principal del perro salvaje africano se produce un procesamiento periférico mejorado de una amplia gama de odorantes comparado con otros mamíferos. Con respecto al BOA, los autores indican que el aspecto de los glomérulos no parece distinto a lo observado en otros mamíferos, pero que, en cambio, forman una disposición homogénea similar a lo observado en el perro doméstico. Además, la organización laminar de las capas más profundas del BOA era indistinta, quizá como consecuencia de la arquitectura alterada de los glomérulos. Esta disposición de los glomérulos indica que, en lugar de compartimentar periféricamente el procesamiento de los semioquímicos, éstos se procesan de forma más matizada y combinada en la periferia, lo que permite respuestas conductuales más rápidas y precisas, como requiere la estructura de grupo altamente social que se observa en el perro salvaje africano.

En el caso del zorro rojo (Karimi et al. 2016), los autores realizan una descripción superficial del OVN utilizando únicamente la tinción de hematoxilina-eosina, y sin poder por tanto aportar ninguna información morfofuncional del OVN. La calidad de las imágenes histológicas presentadas limita la interpretación de los hallazgos, resultando en una contribución preliminar que, aunque confirma la presencia del OVN en el zorro rojo, deja abierta la necesidad de investigaciones más profundas y detalladas.

1.5.3 Efectos de la domesticación: el modelo de la domesticación del zorro

El perro, reconocido como el primer animal domesticado por los seres humanos, presenta un caso de estudio fundamental para entender el proceso de domesticación, el cual, sin embargo, aún no cuenta con una definición consensuada en la comunidad científica. Tradicionalmente, la domesticación ha sido descrita como un proceso prolongado donde los humanos, mediante la selección dirigida, han modificado características fisiológicas y comportamentales de ciertos animales a lo largo de generaciones (Galibert et al. 2011). Algunas definiciones toman al ser humano como objeto activo y central del proceso de domesticación (Clutton-Brock 1994, 2014), minimizando su contexto biológico, y también marginalizando otros procesos de domesticación llevados a cabo por especies no humanas; y otras definiciones incluso llegan a proponer que la especie domesticada manipuló al ser humano, inconsciente, a entablar relaciones que proporcionaron al domesticado una ventaja evolutiva, a expensas de la destreza humana (Morey 1994; Zeder 2012a). Esta definición ha sido ampliada en los últimos años, enfatizando que la domesticación se trata de un proceso coevolucionario que nace de un mutualismo especializado, en el cual una especie controla determinadas características de otra con el fin de obtener recursos o servicios, es decir, ambas partes obtienen un beneficio de la relación (Zeder 2012a; Purugganan 2022). No obstante, Zeder (2012a) exhibe un punto de vista importante: las relaciones basadas en un mutualismo son el producto de procesos evolutivos extendidos en el tiempo, y guiados por fuerzas de selección en ambas partes. La relación coevolutiva entre los humanos y los lobos, es decir, la especie domesticada, estuvo mayormente guiada por la capacidad humana de seleccionar determinados comportamientos para maximizar el beneficio esperado, y, más relevantemente, en favorecer esas características en la descendencia. Este tipo de característica difiere del tipo de mutualismo observado en la naturaleza. Ambas partes obtienen un beneficio, pero la capacidad humana del aprendizaje social juega un papel dominante hacia un mutualismo asimétrico (Zeder 2012a).

Es importante diferenciar la domesticación del “adiestramiento” o “doma”, que se define como la habituación de un individuo animal a la presencia humana. La domesticación por la contra altera las características tanto genéticas como morfológicas de una población, y, al contrario del adiestramiento, estos cambios son heredables a futuras generaciones del animal (Serpell 2017).

Tras haber establecido una definición clara del proceso de domesticación, dirijamos nuestra atención hacia el perro. Hasta no hace mucho tiempo, la comunidad científica se encontraba dividida y sin un acuerdo claro respecto al origen de este compañero milenar del ser humano. Ante la notable diversidad fenotípica presente en los perros, la discusión principal se ha enfocado en determinar si los perros descendieron de una sola especie, ya sea el lobo, el chacal o incluso una especie extinta, o si, en cambio, derivaron de una variedad de especies salvajes.

Los avances en la investigación, que integran el análisis de comportamientos, vocalizaciones, estructuras morfológicas y, de manera destacada, estudios de biología molecular, han consolidado la teoría de que el lobo gris (*Canis lupus lupus*) constituye el principal ancestro, si no el único, de los perros domésticos (Vilà et al. 1997; Galibert et al. 2011; Thalmann et al. 2013). Investigaciones genéticas subrayan esta relación, revelando que perros y lobos comparten hasta un 98% de su ADN mitocondrial, en marcado contraste con la similitud genética de apenas un 7,5% entre lobos y coyotes (*Canis latrans*), su pariente salvaje más próximo (Vilà et al. 1997).

Hallazgos arqueológicos han desvelado que el lobo moderno evolucionó en Eurasia hace aproximadamente 3-4 millones de años, colonizando Norte América hace aproximadamente 500 000 años. Establecer un inicio al proceso de domesticación del lobo hacia el perro es complicado, aunque estimaciones basadas en hallazgos arqueológicos y estudios del ADN mitocondrial indican que el proceso comenzó hace aproximadamente entre 16,000 y 12,000 años (Larson et al. 2012). Aunque otros autores (Druzhkova et al. 2013; Thalmann et al. 2013) datan el inicio de la domesticación hace 18,800 – 32,100 años. Galibert et al. (2011) hablan de un proceso de proto-domesticación, datado hace 35,000 años, y lo distinguen del proceso de domesticación propiamente dicho, datado aproximadamente hace 14,000 años. El estatus taxonómico del perro sigue en debate, por una parte considerándolo una especie independiente del lobo, (*Canis familiaris*), y otra postura lo considera una subespecie del lobo (*Canis lupus familiaris*) (Serpell 2017).

La domesticación se manifiesta en múltiples aspectos, tanto en la parte animal, como en la contraparte humana. Estos cambios implican la expresión fenotípica de cambios genéticos que transforman al animal desde su fenotipo salvaje hacia su fenotipo doméstico. La selección artificial humana para dichos caracteres es tan solo una de las fuerzas de selección que pueden modificar el fenotipo. Entre otras fuerzas de selección se encuentran la relajación de la selección natural una vez nuevas fuerzas de selección están actuando bajo la influencia humana. También están involucradas fuerzas relacionadas con el azar, mediante el aislamiento de determinadas poblaciones. Otro factor en el animal domesticado incluye el incremento de dependencia del mismo en relación a la parte humana (Zeder 2012a).

Efectos genéticos

A pesar de que los rasgos distintivos de la domesticación ya eran notables hace 15,000 años, la dispersión global de los perros en todos los continentes se completó hace aproximadamente 1,400 años. Fue entonces cuando estas especies alcanzaron regiones como Suramérica y Suráfrica. Desde aquel momento, las poblaciones caninas han visto una reducción debido a la migración humana y el comercio, generando fluctuaciones genéticas y una tendencia hacia la homogeneización en su población (Larson et al. 2012). Resulta fascinante que la mayoría de las razas de perros modernos se desarrollaron en los últimos 150 años, a partir de una base genética que, si bien relativamente homogénea, es el resultado de milenios de migración humana y la mezcla de distintos linajes caninos que antes evolucionaban de forma independiente (Larson et al. 2012).

En un estudio comparativo del genoma de zorros salvajes y domesticados, llevado a cabo durante el experimento de la “granja rusa de zorros”, Kukekova et al. (2018) identificaron un

gen crucial para el comportamiento de domesticación: el SorCS1. Este gen codifica la principal proteína transportadora de receptores de glutamato AMPA y neurexinas, subrayando la importancia de la plasticidad sináptica en la domesticación de los zorros. Además, se hallaron otras regiones genómicas vinculadas a trastornos neurológicos en humanos, como el síndrome del espectro autista y el trastorno bipolar, comportamientos agresivos en ratones y la domesticación de perros.

De manera particular, se ha establecido una conexión entre el sistema inmunológico y el proceso de domesticación, tanto en perros como en lobos. Los mismos genes y receptores de interleucina encontrados en la región 52 del VVU8 en zorros también se localizaron en el cromosoma 17 de los perros, en una región que diferencia a los perros de los lobos (Vonholdt et al. 2010). La asociación entre el sistema inmune y la domesticación también fue observada por Kukekova et al. (2018), lo cual sugiere un papel de los genes inmunitarios tanto en la domesticación del perro como en la del zorro.

Cambios morfológicos

La domesticación lleva asociada una serie de cambios morfológicos notables en los animales. Algunos de los cambios más significativos son la reducción en el tamaño corporal, en el volumen del cerebro y en el tamaño de los órganos de los sentidos (Kruska 1988, 1996, 2005, 2007; Balcarcel et al. 2022). Existe además una correlación positiva entre el grado de encefalización (masa cerebral superior a la relacionada con la masa corporal del animal) y la reducción del tamaño del cerebro durante la domesticación. Los mamíferos con cerebros más grandes parecen haber experimentado el mayor grado de reducción del tamaño del cerebro, mientras que los mamíferos con cerebros más pequeños pueden experimentar poca o ninguna reducción general del tamaño del cerebro durante la domesticación (Kruska 1988). En el caso de los carnívoros, esta reducción varía entre el 20% y el 30%; el visón presenta una reducción del 20%, el gato del 27,6%, el perro del 29%, y el hurón del 29,4%. Cabe destacar que no todas las partes del cerebro se afectan por igual bajo las presiones selectivas de la domesticación; existiendo variaciones específicas en el grado de reducción de diferentes áreas cerebrales (Kruska 1988, 1996; Trut 1999; Zeder 2012a).

En el caso de los cerdos, las áreas cerebrales encargadas del procesamiento de estímulos auditivos y olfativos presentan una menor reducción en comparación con las estructuras visuales. Esto sugiere que las funciones esenciales para la supervivencia de las especies ancestrales podrían ser menos susceptibles a la reducción del tamaño cerebral resultante de la domesticación, en contraste con aquellas funciones consideradas menos vitales (Plogmann y Kruska 1990). Aunque en la mayoría de los mamíferos domésticos es el telencéfalo — responsable de los procesos de pensamiento superior y la percepción sensorial— el que experimenta una mayor reducción, en el visón doméstico se observa que el mesencéfalo y el cerebelo, encargados de los movimientos corporales, muestran las reducciones más significativas. Esto se interpreta como una adaptación a las limitaciones espaciales del cautiverio, particularmente en una especie de mustélido tan activa como el visón (Kruska 1996).

Por regla general, las partes filogenéticamente más jóvenes del cerebro están más profundamente afectadas que las estructuras "más antiguas" (Kruska 1988). Mientras algunos expertos ven este patrón como evidencia de una "evolución regresiva" en animales domésticos,

otros argumentan que estas estructuras son más plásticas y, por tanto, más susceptibles a adaptarse a las nuevas condiciones de vida, donde los humanos mitigan las necesidades de respuestas complejas al entorno (Zeder 2012a). Sin embargo, esta tendencia no se aplica al sistema límbico, uno de los más antiguos tanto embriológica como filogenéticamente. A pesar de su antigüedad, el sistema límbico, que regula el comportamiento y la memoria, se asocia con una reducción en la reactividad emocional, un rasgo comportamental clave en animales domesticados (Kruska 1988; Price 2002).

Los cambios observados en el encéfalo han sido propuestos como desencadenantes de los cambios comportamentales asociados a la domesticación. Diferentes autores han descrito de varias formas el comportamiento relativamente generalizado de los animales "mansos" o "dóciles". Wilkins et al. (2014) destacan la disminución de la "agresividad" y el "miedo". Del mismo modo, Agnvall et al. (2018) y Albert et al. (2008) hablan de un "menor miedo a los seres humanos" y de una "ausencia de reacciones agresivas y defensivas hacia los humanos", respectivamente. En general, se cree que estos cambios hacia una "domesticación", sea cual sea su definición, se deben a cambios en el sistema nervioso y la función neuroendocrina de los animales domésticos (Albert et al. 2008; Wilkins et al. 2014). Otros autores destacan la disminución del sistema límbico, ya sea como parte de una reducción general del tamaño del cerebro (Kruska 1988, 2005) o como cambios relativos en distintas áreas cerebrales (Brusini et al. 2018). También se ha propuesto que el aumento de la estructura social atenúa la agresividad de los animales domésticos, especialmente a través de una regulación alterada de la oxitocina (Herbeck et al. 2017; Kikusui et al. 2019). Por último, Hemmer (1990) describió la domesticación como un "declive general de la apreciación del entorno", vinculando diversas adaptaciones físicas -como el deterioro del oído y la vista- con una disminución en la sensibilidad de los animales a posibles estresores ambientales.

Adicionalmente a la reducción en el tamaño del encéfalo, es común observar en los animales domesticados otros cambios morfológicos, como cambios de pigmentación, relativamente ubicuos (Groves 1999; Zeder 2012b; Wilkins et al. 2014; Lord et al. 2020).

“Síndrome de domesticación”

Al conjunto de cambios producidos en animales domesticados en contraposición a sus relativos salvajes se le ha denominado “síndrome de domesticación”. Este fenómeno ha sido citado por multitud de autores, empezando por Darwin (1868), que lo describía como una “variación con correlación” de determinadas características en animales domésticos. Posteriormente, otros autores se refirieron a este fenómeno como a una serie de “generalidades” presentes en todos los animales domesticados (Zeuner 1963; Clutton-Brock 1981). Se trata de un fenómeno bien estudiado y documentado por distintos autores (Belyaev 1979; Price 1984; Groves 1999; Jensen 2006), aunque se define como altamente variable, ya que dos individuos domesticados difícilmente presentarán las mismas características alteradas (Lord et al. 2020).

El término de “síndrome de domesticación” fue inicialmente introducido en la esfera de la botánica (Faagri 1981; Hammer 1984; Wilkins et al. 2014), extendiéndose posteriormente a la zoología durante la década de los 80 (Faagri 1981). Este síndrome engloba tanto características de domesticación “inconscientes”, como “características de mejora”. Las “características de domesticación inconscientes” emergen a través de una selección no deliberada durante las

etapas iniciales de la domesticación, mientras las “características de mejora” se desarrollan mediante una selección consciente, aplicada frecuentemente a subpoblaciones específicas de la especie doméstica o a razas particulares (Larson y Fuller 2014; Gleeson y Wilson 2023).

Entre las características atribuidas al síndrome de domesticación destacan la manejabilidad, la pérdida de estacionalidad en la reproducción, cambios en el color de la capa, en la forma de las orejas, la cola y la morfología craneofacial (Darwin 1868; Zeuner 1963; Clutton-Brock 1981; Hemmer 1990; Lord et al. 2020). Sin embargo, la descripción de estas características ha variado considerablemente entre diferentes investigadores, lo que ha complicado la definición precisa de los atributos morfológicos vinculados a este síndrome (Lord et al. 2020).

Diversas teorías han sido propuestas para explicar el “síndrome de domesticación”. Estas incluyen conceptos como el ligamiento genético o “linkage”, el efecto de arrastre o “hitchhiking”, y la pleiotropía. En el ligamiento, se estima que determinados genes ubicados cerca uno del otro en el mismo cromosoma han de ser heredados conjuntamente más frecuentemente de lo que se esperaría por azar. Este fenómeno es parecido al del “Hitchhiking”, donde existe un aumento en la frecuencia de un alelo debido a su asociación con un alelo cercano que está experimentando una selección positiva (Kukekova et al. 2018). En la pleiotropía, se considera que un solo gen puede tener distintos y diversos efectos en el fenotipo de un organismo, afectando a varias características fenotípicas diferentes (Lord et al. 2020). La hipótesis de la cresta neural propone que la domesticación está impulsada por cambios pleiotrópicos en las células de la cresta neural – precursoras del desarrollo de casi todas las características observadas en el síndrome de domesticación, considerando al síndrome de domesticación como una forma leve de neurocristopatía (Le Douarin y Kalcheim 1999; Bronner y LeDouarin 2012; Wilkins et al. 2014). Según la teoría de la cresta neural, muchos genes implicados en la cresta neural son pleiotrópicos, es decir, participan en múltiples procesos de desarrollo. Sin embargo, para que la hipótesis de la cresta neural pueda sostenerse, tiene que haber alelos pleiotrópicos, seleccionados durante la domesticación, que afecten a múltiples rasgos de domesticación a través de su efecto sobre la cresta neural. Johnsson et al. (2021) alegan que existen varias debilidades de esta teoría; (1) la primera de ellas es que varios de los rasgos clave que podrían explicarse por los mecanismos de las células de la cresta neural no forman parte de un síndrome de domesticación universal. (2) En la medida en que existe un síndrome de domesticación, eso no implica un mecanismo genético universal. Por último, (3) incluso si postulamos un mecanismo genético universal, la evidencia de que este mecanismo es la proliferación y migración de las células de la cresta neural es indirecta y débil. Por otro lado, la teoría de la pedomorfosis (o “neotenia”) plantea que la domesticación altera el ritmo de desarrollo, de modo que los adultos conservan un conjunto de características juveniles (Coppinger et al. 1987). La hipótesis del ritmo tiroideo propone que la domesticación está impulsada por cambios en la liberación de la hormona tiroidea, lo que altera el crecimiento, la maduración y la respuesta ambiental (Crockford 2006; Lord et al. 2020). Por último, otros autores alegan que este síndrome surge de la disrupción compartida de los regímenes reproductivos naturales (Gleeson y Wilson 2023). Sin embargo, algunos expertos cuestionan la validez de la teoría del síndrome de domesticación, argumentando la escasez de evidencia empírica, la variabilidad de las características definitorias, y la dificultad para distinguir entre rasgos específicos de la domesticación y aquellos propios de razas particulares (Lord et al. 2020).

2. OBJETIVOS

La comunicación química mediada por feromonas y olores juega un papel crucial en la biología y el comportamiento de los cánidos, tanto en especies salvajes como en las domésticas. Estas señales olfativas no solo modulan interacciones sociales complejas, sino que también son esenciales para la supervivencia, ya que intervienen en la alimentación, la reproducción y el reconocimiento de territorios. A pesar de su importancia, la mayoría de la información disponible sobre los sistemas olfativos de los cánidos se ha centrado en los perros domésticos, y aún así, comprender la estructura y función de estos sistemas no es una tarea sencilla, muy especialmente en lo referente al sistema vomeronasal.

La caracterización del sistema vomeronasal del perro, objeto de estudio de nuestro grupo de investigación a lo largo de las últimas décadas, ha revelado una evolución sorprendente de dicho sistema en comparación con el sistema olfativo principal, mostrando una reducción significativa en su complejidad estructural. Este hallazgo plantea interrogantes fundamentales: ¿Es el patrón observado en los perros representativo de los cánidos en general, o estamos ante un caso particular resultado de la domesticación? Para abordar estas interrogantes, se hace imprescindible profundizar en la investigación de los sistemas olfativos de los cánidos salvajes, poniendo especial énfasis en aquellos con mayor cercanía filogenética al perro, tales como el lobo y el zorro. Esta aproximación permitirá discernir si las características observadas en el perro son un fenómeno único vinculado a su proceso de domesticación o si, por el contrario, constituyen una tendencia evolutiva compartida por otros miembros de la familia canina.

En base a lo aquí comentado el **objetivo general** de esta tesis es profundizar en el conocimiento de las bases anatómicas, histológicas y morfofuncionales de la comunicación química mediada por feromonas y olores en los cánidos, tanto salvajes como domésticos, centrándonos en la caracterización morfológica y funcional de los sistemas olfativos. Este objetivo implica un análisis detallado del órgano vomeronasal y del bulbo olfativo, con un especial interés en identificar diferencias y similitudes entre especies domésticas y salvajes, como el perro, el lobo y el zorro. De esta manera, se busca esclarecer en qué medida el proceso de domesticación ha incidido en la evolución de estos sistemas sensoriales en el perro. Ampliando nuestra comprensión, no solo se pretende identificar las posibles diferencias estructurales y funcionales entre los caninos domésticos y sus contrapartes salvajes, sino también entender cómo estas variaciones pueden reflejar adaptaciones a entornos específicos o a diferentes estilos de vida.

De este objetivo general nacen los siguientes **objetivos específicos**, los cuales están alineados con las cinco publicaciones presentadas:

1. Análisis morfológico exhaustivo del órgano vomeronasal del zorro.

Esta investigación propone llevar a cabo un estudio detallado y sistemático de la estructura del órgano vomeronasal en el zorro, utilizando un conjunto de técnicas histológicas y microscópicas. Mediante el uso de análisis inmunohistoquímicos y marcajes histoquímicos con lectinas, se pretende caracterizar los componentes estructurales esenciales del órgano.

Este enfoque permitirá no solo una comprensión profunda de la organización celular y tisular del órgano vomeronasal, sino también una identificación precisa de las moléculas de señalización y los receptores implicados en los procesos olfativos específicos de esta especie. El objetivo final es aportar una visión integral de la morfología funcional del órgano vomeronasal en el zorro, contribuyendo así al conocimiento sobre los mecanismos sensoriales subyacentes a la comunicación química y el comportamiento social en esta especie de cánido salvaje.

2. Estudio del bulbo olfativo accesorio del zorro.

Este objetivo se centra en realizar una caracterización minuciosa del centro integrador de la información sensorial feromonal, el bulbo olfativo accesorio, en el zorro, con el propósito de establecer comparaciones directas con las estructuras análogas observadas en los perros. A través de un análisis detallado y comparativo, se busca identificar diferencias morfológicas significativas que puedan indicar variaciones en la capacidad y función olfativa entre estas dos especies de cánidos.

Se pretende no solo esclarecer las particularidades estructurales del bulbo olfativo accesorio en el zorro, sino también inferir posibles implicaciones funcionales de las diferencias encontradas. Este estudio pretende aportar nueva luz sobre la evolución de los sistemas olfativos en cánidos y cómo estas adaptaciones morfológicas reflejan distintas estrategias sensoriales y de supervivencia entre especies.

3. Comparación del sistema olfativo principal entre lobo, perro y zorro.

Este objetivo se centra en la exploración de las diferencias estructurales y morfológicas del bulbo olfativo principal entre el lobo, el perro y el zorro. El propósito de este estudio es discernir si las variaciones identificadas en el sistema vomeronasal son fenómenos aislados o si, por el contrario, estas diferencias se extienden también al sistema olfativo principal, que se caracteriza por una mayor conservación a lo largo de la evolución filogenética.

Se buscará obtener una visión detallada de la estructura y citoarquitectura de los sistemas olfativos principales en estas especies. Este enfoque permitirá no solo establecer comparaciones directas en cuanto a la estructura y posiblemente la función olfativa, sino también aportar

evidencia sobre cómo la adaptación y la selección natural han moldeado los sentidos olfativos en el contexto de la evolución de los cánidos. Este estudio tiene el potencial de revelar aspectos fundamentales sobre la diversidad sensorial dentro de este grupo, esclareciendo el papel de la domesticación y la diversificación ecológica en la evolución de los sistemas olfativos.

4. Estudio detallado de la zona de transición entre el bulbo olfativo principal y accesorio en el zorro.

Este objetivo propone una descripción exhaustiva de la región de interconexión entre el bulbo olfativo principal y el bulbo olfativo accesorio en el zorro. Se enfocará en elucidar las características únicas de esta zona de transición, evaluando su desarrollo y especialización en comparación con otros mamíferos.

Mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica de doble marcaje, aplicadas a secciones histológicas seriadas, se buscará detallar la estructura, organización celular y expresión de marcadores específicos que puedan indicar un papel diferencial en la integración de señales olfativas. Este análisis pretende revelar las complejidades de cómo se procesan y se integran las señales olfativas en el zorro, proporcionando una visión más amplia sobre las adaptaciones evolutivas que permiten a esta especie responder de manera eficaz a su entorno. La investigación de esta zona de transición no solo arrojará luz sobre los mecanismos subyacentes a la percepción olfativa en el zorro, sino que también podría ofrecer pistas sobre las bases neurales de la integración sensorial en mamíferos, abriendo nuevas vías para comprender la evolución de los sistemas olfativos complejos.

5. Evaluación del sistema vomeronasal en el lobo.

Caracterizar el sistema vomeronasal en el lobo para identificar diferencias significativas con respecto a lo observado en perros y zorros, y analizar las posibles implicaciones evolutivas de estas diferencias en el contexto de la domesticación.

Mediante la consecución de estos objetivos, la tesis se propone no solo desentrañar los interrogantes que rodean la biología olfativa de los cánidos, sino también dilucidar el impacto profundo que ha tenido la domesticación en el modelado de estos complejos sistemas sensoriales. Al hacerlo, se espera proporcionar un análisis exhaustivo que no solo enriquezca nuestro conocimiento sobre las diferencias y similitudes entre las especies domésticas y salvajes, sino que también ofrezca una valiosa perspectiva comparativa. Asimismo, se busca contribuir al campo de la biología de la conservación, aportando datos cruciales que podrían ser fundamentales en la elaboración de estrategias para la preservación de la biodiversidad canina. En última instancia, este trabajo aspira a arrojar luz sobre la compleja interrelación entre domesticación, adaptación y evolución, sentando las bases para futuras investigaciones en este fascinante ámbito.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La procedencia de las muestras utilizadas ha sido distinta en función de la especie objeto de estudio. Se analizaron nueve especímenes de zorro, ocho de ellos obtenidos a través de cacerías reguladas y organizadas por la "Federación Galega de Caza", con la autorización del "Consello Galego de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible" de la Xunta de Galicia, contando con todas las autorizaciones pertinentes. El espécimen número nueve fue incorporado con posterioridad tras haber sido adquirido por personal del Departamento de Anatomía, procedente de un atropello.

En el caso de las muestras de lobo, se dispuso de cinco especímenes de lobo adulto, machos. Los individuos de lobo procedieron de centros de recuperación en la provincia de Galicia, viéndose implicados en accidentes automovilísticos mortales. Únicamente se recogieron aquellos especímenes de muerte reciente y que no presentaban traumatismos craneoencefálicos. Todas las muestras se utilizaron con los permisos correspondientes emitidos por el "Consello Galego de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible" de la Xunta de Galicia (Nº EB-009/2020 y EB-007/2021).

Los tres perros utilizados eran individuos adultos mesaticéfalos que procedían del Departamento de Ciencias Clínicas de nuestra Escuela, donde fallecieron por condiciones clínicas. Se trataba de dos pastores alemanes y un mastín. Las cabezas estaban intactas y no mostraban evidencia clínica o postmortem de enfermedad neurológica.

3.1 EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras recibir el cuerpo del individuo, en todos los casos se procedió a la inspección visual externa del cráneo, en búsqueda de traumatismos craneoencefálicos que pudiesen afectar a las muestras, o de malformaciones que puedan afectar al sistema olfativo. Los individuos afectados de traumatismo craneoencefálico de consideración fueron excluidos del estudio. Tras la inspección visual se procedió a la separación de la cabeza del cuerpo, se extrajeron la piel, la mandíbula, los planos musculares de cara y cráneo, la lengua y los ojos. A continuación, se realizó con la ayuda de una sierra rotatoria y un cincel, un amplio orificio en la bóveda craneana, próxima a los bulbos olfativos, ampliándola hacia la porción dorsolateral de la cavidad nasal, de forma que se facilita la penetración del fijador hacia el interior del cráneo y hacia las estructuras de interés, como los órganos vomeronasales y los bulbos olfativos. Para la fijación se emplearon dos tipos de fijadores; el formol al 10% sobre la preparación comercial (4% concentración real), y el líquido de Bouin recién preparado. Para la preparación de 1050 ml del líquido de Bouin se emplean soluciones de ácido pícrico saturado (750 ml), formol a concentración comercial (250 ml), y ácido acético glacial (50 ml).

El uso del fijador de Bouin se recomienda especialmente en la investigación del sistema nervioso debido a su destacada capacidad de penetración en los tejidos y su contribución a la consistencia del tejido, simplificando así su procesamiento. Además, preserva la integridad de los tejidos blandos y delicados, lo que lo convierte en una opción valiosa para las muestras de tejido nervioso. En el contexto de las tinciones inmunohistoquímicas, presenta la ventaja adicional de mantener eficazmente los epítomos antigénicos en los tejidos. Esto se logra mediante la formación de enlaces cruzados entre los compuestos presentes en la solución de Bouin y las proteínas en los tejidos, estabilizándolos y preservando su estructura original. Este beneficio elimina la necesidad de recurrir a técnicas de recuperación antigénica.

Después de un período de veinticuatro horas, las muestras se transfirieron a una solución de etanol al 70 % para su adecuado mantenimiento. Previo a la fijación, se lleva a cabo la evaluación funcional del canal incisivo, que conecta las cavidades oral y nasal, mediante una canulación a través de la papila incisiva. Una vez se ha detallado esta característica anatómica vinculada al sistema nervioso, se procede a la extracción de las siguientes estructuras anatómicas: los órganos vomeronasales (OVN) y los bulbos olfativos (BO).

3.1.1. Cavidad nasal

Se procedió a la separación de la cavidad nasal del cráneo mediante una incisión transversal realizada en la región rostral a la fosa etmoidal. Este enfoque se implementó con la precaución de evitar posibles daños en los bulbos olfativos al utilizar la sierra rotatoria. En algunos casos, la muestra resultante se destinó al análisis de los cambios macroscópicos y microscópicos en la topografía de los órganos vomeronasales a lo largo de la cavidad nasal. Con este propósito, la cavidad nasal fue sometida a un proceso de descalcificación para facilitar su estudio posterior mediante análisis histológico en serie.

3.1.2 Órganos y nervios vomeronasales

En los individuos no descalcificados, se llevó a cabo un procedimiento centrado en la identificación y extracción de ambos órganos vomeronasales de manera íntegra. En esta situación, se realiza una apertura lateral de la cavidad nasal, seguida de la extracción de los cornetes nasales. Este método facilita la visualización completa del tabique nasal, sobre el cual se realizaron las disecciones de los nervios vomeronasales y se detalló su recorrido hacia los bulbos olfativos accesorios (BOA). De igual manera, una vez que se identificaron los órganos vomeronasales (OVN) a ambos lados de la base anterior del tabique nasal, se extrajeron con la asistencia de un microscopio quirúrgico (Zeiss OPMI 1 Ent), debido a su reducido tamaño y su estrecha conexión con el hueso vómer.

3.1.3 Bulbos olfativos principales y accesorios

Con el propósito de llevar a cabo un estudio macroscópico de las áreas cerebrales vinculadas al sentido del olfato, se procedió a la extracción completa del cerebro y los bulbos olfativos. Para lograr esto, se retiraron los huesos de la bóveda craneal utilizando una sierra rotatoria y una pinza gubia, permitiendo así el acceso a los hemisferios cerebrales. La extracción se inició en la parte caudal para aprovechar la menor resistencia en esta área. Posteriormente, se realiza una disección meticulosa de los bulbos olfativos desde su posición oculta en la fosa etmoidal. Dado que estos son extremadamente delicados y están firmemente anclados a la

duramadre por los nervios olfativos y vomeronasales que atraviesan la lámina cribosa del etmoides, se comienza con la extracción del hueso de la fosa orbitaria que recubre lateralmente los bulbos olfativos. Una vez expuestos ambos bulbos, se utiliza un bisturí para la disección de la duramadre y los nervios olfativos, con el objetivo de liberar estas estructuras de la lámina cribosa etmoidal. Finalmente, se procede a la sección de los nervios ópticos, las arterias carótidas internas, el tallo pituitario y los nervios craneales que emergen de ambos lados del tronco encefálico, dejando así libre el encéfalo.

3.2 PROCESAMIENTO Y CORTE DE LAS MUESTRAS

Se optó por realizar el procesamiento histológico de todas las muestras mediante la inclusión en parafina, generando varios bloques que contienen las cavidades nasales, los órganos vomeronasales y los bulbos olfativos. Por otro lado, las cavidades nasales destinadas al estudio en serie fueron sometidas previamente a un proceso de descalcificación utilizando una solución descalcificadora (Shandon TBD-1 Decalcifier, Thermo, Pittsburgh, PA, EE. UU.), manteniéndolas en continua agitación durante el tiempo necesario. El propósito es garantizar que la cuchilla pueda seccionar la parte ósea de la cavidad nasal sin dificultad. La duración del proceso de descalcificación varía según la especie, la edad del individuo y el tamaño de la muestra, pudiendo oscilar entre un día y más de una semana.

Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua corriente durante dos horas, y se llevaron a cabo cortes transversales equidistantes en las cavidades nasales desde el extremo rostral hasta el extremo caudal del cartílago vomeronasal, resultando en varios bloques que fueron fotografiados. Cada bloque contiene un nivel del órgano vomeronasal, permitiendo así la obtención de información detallada sobre las características anatómicas y las relaciones topográficas a lo largo de toda la cavidad nasal. Una vez completado este proceso, los bloques fueron embebidos en parafina.

En cuanto al corte histológico de las muestras, se utilizó el micrótopo Leica Reichert Jung para obtener secciones con un espesor de 5 a 8 μm . Para el caso de los órganos vomeronasales, se optó por cortes más finos, mientras que para el estudio de los bulbos olfativos se realizaron cortes de mayor grosor, facilitando así una mejor visualización de los procesos nerviosos y gliales. Las secciones resultantes se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina con el objetivo de asegurar su adhesión durante la totalidad de su procesamiento. Adicionalmente, los órganos vomeronasales y los bulbos olfativos se cortaron tanto en planos sagitales como transversales, proporcionando así una visión más completa y facilitando la identificación del bulbo olfativo accesorio en el bulbo olfativo.

3.3 TINCIONES HISTOLÓGICAS

La mayoría de los tejidos animales son, en su mayoría, incoloros, a excepción de aquellos que contienen pigmentos como la melanina en la epidermis o la hemoglobina en la sangre. Por lo tanto, para lograr la visualización de las diversas estructuras en una sección histológica, es esencial generar un contraste artificial y diferencial entre los distintos componentes del tejido. En este sentido, hemos aplicado varias tinciones generales y específicas que destacan los elementos tisulares con diferentes coloraciones.

Entre las tinciones generales empleadas se encuentran la hematoxilina-eosina (HE), el ácido peryódico de Schiff (PAS) y el azul alcían (AA). Asimismo, utilizamos tinciones

específicas como el tricrómico de Gallego, el Nissl, la tinción de Tolivia y la tinción de Bielschowsky. Estas técnicas permiten realzar y diferenciar los distintos componentes tisulares, proporcionando así una mejor apreciación de las estructuras presentes en las secciones histológicas.

3.3.1 Tinciones generales

Hematoxilina-eosina (HE)

La tinción de hematoxilina-eosina se emplea como tinción histológica general, estando compuesta por dos colorantes; la hematoxilina, de naturaleza básica, confiere un tono azul violáceo profundo a las estructuras basófilas (ácidas), principalmente el ADN o el ARN. El otro colorante, la eosina, de carácter ácido, se utiliza como tinción de contraste, y tiñe de color rosa las estructuras acidófilas (básicas) tales como el citoplasma y las estructuras extracelulares. De esta manera, se logra una imagen nítida y diferenciada de la histología celular.

Ácido periódico de Schiff (PAS)

La tinción de PAS es ampliamente utilizada para evidenciar la presencia de mucopolisacáridos de naturaleza neutra. Para ello, se utiliza un colorante, inicialmente sin color, la leucofucsina, que vira hacia un color magenta en contacto con los polisacáridos del tejido.

El método de realización de la tinción comienza con la desparafinación y posterior hidratación de las secciones en parafina. A continuación, se sumergen en ácido periódico durante cuarenta y cinco minutos. Posteriormente se lavan los cortes en agua destilada y se sumergen en reactivo de Schiff durante una hora. Tras lavar las muestras en agua corriente, se deshidratan y se montan.

Azul alción

Colorante de naturaleza ácida, empleado para la tinción de carbohidratos. Su característico color azul proviene del cobre presente en el colorante, permitiendo diferenciar mucopolisacáridos de naturaleza ácida.

Para realizar esta tinción, tras desparafinar e hidratar las secciones, se sumergen los cortes durante 30 minutos en la solución de AA. Tras lavarlos con agua corriente, se deshidratan y se montan.

3.3.2 Tinciones específicas

Éstas se emplean con el fin de diferenciar características particulares del tejido, a diferencia de las tinciones generales.

Tricrómico de Gallego

Se trata de una tinción que permite distinguir distintos tipos de tejido, como los componentes del tejido conjuntivo. En muestras que no han sido expuestas a un proceso de descalcificado, los eritrocitos se tiñen de verde, las fibras musculares y el colágeno de azul claro, el epitelio y el tejido glandular de rojo, el hueso de azul oscuro y el cartílago de violeta.

En muestras descalcificadas, el tejido glandular y el cartílago se tiñen de azul claro, mientras que las fibras musculares se tiñen de verde, y los epitelios de azul (Ortiz-Hidalgo 2011).

Tinción de Nissl

La tinción de Nissl es ampliamente utilizada en la preparación de secciones de tejido nervioso, con objeto de visualizar tanto el soma neuronal como el inicio de los procesos neuronales con mayor facilidad que con otras técnicas. El principal agente colorante utilizado en esta técnica es el violeta de cresilo, caracterizado por su alta afinidad para teñir los cuerpos de Nissl. Estas estructuras consisten en conglomerados de retículo endoplasmático rugoso que se encuentran en el citoplasma de las neuronas.

Tinción de Tolivia

Esta técnica constituye otra de las tinciones ampliamente utilizadas para el análisis del tejido nervioso. En el caso de la tinción de Tolivia, las fibras nerviosas mielínicas adquieren una coloración oscura, mientras que los somas neuronales son teñidos de color rosado. Este enfoque facilita una visualización más detallada de la arquitectura nerviosa presente en el tejido objeto de estudio.

El protocolo empleado se detalla a continuación. Con el objetivo de optimizar la fijación de los colorantes, las secciones fueron inmersas en una solución de amonio ferroso ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$) al 2,5% durante una hora. Posteriormente, las muestras fueron sumergidas durante dos horas y media en una solución recién preparada, específica para la tinción de mielina. Esta solución se compone de 5 ml de hematoxilina al 20%, 10 ml de carbonato de litio (Li_2CO_3) al 1%, y 50 ml de etanol (EtOH) al 50%. A continuación, se llevaron a cabo tres lavados con agua corriente, cada uno con una duración de cinco minutos, seguidos de la inmersión de los portaobjetos en un baño de solución de pironina al 0,2% en formaldehído al 20% durante cinco minutos. Finalmente, las muestras fueron sometidas a procesos de deshidratación, aclaramiento y montaje.

Tinción de Bielschowsky

La tinción de plata de Bielschowsky es una herramienta muy útil para detectar fibras nerviosas. Puede utilizarse para teñir axones, neurofibrillas y placas seniles en el sistema nervioso central.

Para realizar la tinción, tras la desparafinación y rehidratación, se sumergen las secciones en nitrato de plata 10% en la oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Tras lavar las secciones en agua destilada, se añade hidróxido de amonio concentrado gota a gota hasta que se disuelve el precipitado negro inicial. Tras ello, se incuban las secciones en la solución durante 15 minutos, y posteriormente se lavan con una solución de hidróxido de amonio 0,1%. Para el revelado se usan 350 μl una solución que contiene 0,2 ml de formaldehído 37%, 12 ml de agua destilada, 12,5 μl de ácido nítrico al 20% y 0,05 g de ácido cítrico. Esta solución se añade a la solución de hidróxido de plata usada previamente. Las secciones se incuban 10 minutos hasta que se tornan negras. Tras el lavado en hidróxido amónico 0,1% se revelan mediante una solución de cloruro de oro al 0,2% durante 5 min, se fijan 1 min

empleando una solución de tiosulfato de sodio al 5%, y finalmente se lavan en agua destilada, se deshidratan y se montan.

3.4 TINCIONES HISTOQUÍMICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS

3.4.1. Tinciones histoquímicas – marcaje con lectinas

La técnica histoquímica de marcado con lectinas se fundamenta en la unión natural que se produce entre las lectinas y los hidratos de carbono presentes en el tejido, formando parte de oligosacáridos o de glicoproteínas. Por consiguiente, las lectinas son entidades moleculares de origen natural empleadas para identificar glicoconjugados en los distintos componentes tisulares.

En los estudios realizados se utilizó un panel histoquímico de lectinas para caracterizar el perfil de glicoconjugados presente en el tejido de estudio. Para ello se utilizó la aglutinina del tojo común (*Ulex europaeus* – UEA), la cual se une a la α -L-fucosa (Alroy et al. 1986); la isolectina B₄ de *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B₄), que proviene de las semillas de la *Griffonia simplicifolia*, reconoce la α -galactosa terminal (Peters y Goldstein 1979); la aglutinina de *Lycopersicon esculentum* (LEA), procedente de la planta del tomate, reconoce las moléculas de N-acetil- β -D-glucosamina (Salazar y Sánchez Quinteiro 2003); la aglutinina de *Vicia villosa* (VVA), que se encuentra en las semillas de la veza vellosa, y permite identificar la N-acetilgalactosamina terminal. La lectina de la soja, *Soybean agglutinin* (SBA) reconoce estructuras de oligosacáridos con N-acetilgalactosamina unida a α o β terminal, y con menor afinidad, a residuos de galactosa. Por último, se utilizó la lectina de la patata, *Solanum tuberosum* (STA), que reconoce las moléculas de N-acetilglucosamina. Este panel de lectinas se utilizó para distinguir al microscopio óptico los distintos componentes de las vías olfativas y vomeronasal, tanto en secciones de BO como de OVN.

El protocolo para la tinción histoquímica con lectinas es el siguiente. En el caso de la UEA, se utilizó un anticuerpo frente a la lectina. Para ello, tras la desparafinación y rehidratación de las muestras se comienza (i) bloqueando la actividad de la peroxidasa endógena del tejido para evitar un revelado inespecífico. Para ello, se incuban las secciones en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% durante diez minutos. Tras ello, (ii) se incuban durante media hora en albúmina de suero bovino (BSA) al 2%, para evitar uniones no específicas. A continuación (iii) se procede a la incubación con la lectina, (UEA) durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de cinco minutos en tampón fosfato 0,1 M (PB, pH 7,2). Tras los lavados, las secciones se incuban (iv) durante doce horas a 4°C con una inmunoglobulina conjugada con peroxidasa frente a la aglutinina UEA. Por último, se realiza un lavado con tampón fosfato antes del revelado (v) con una solución de diaminobencidina (DAB) al 0,05% y H₂O₂ al 0,003% durante cinco minutos.

El procedimiento para el resto de lectinas utilizadas en el estudio, LEA, BSI-B₄, VVA, SBA y STA, se inicia con los pasos realizados para el protocolo anteriormente explicado para la UEA. Tras bloquear la actividad de la peroxidasa endógena tisular (i) y suprimidas las uniones inespecíficas (ii), se incuban las secciones durante doce horas a 4°C con las aglutininas biotiniladas de LEA o BSI-B₄, diluidas en una solución de BSA al 0,5%. Tras ello, se incuban (iv) las secciones en el reactivo Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA,

EE.UU.), durante 90 minutos. Por último, se revelan (v) las secciones en la solución de DAB al 0,05% y H₂O₂ al 0,003% durante cinco minutos. Para controlar la intensidad de revelado adecuado, las muestras se controlan bajo al microscopio.

Para todos los protocolos se realizaron controles positivos y negativos; tanto sin la adición de lectinas como con preabsorción de lectinas, utilizando para ello una cantidad en exceso del glúcido correspondiente.

3.4.2. Tinciones inmunohistoquímicas

El análisis inmunohistoquímico se realizó utilizando una amplia gama de anticuerpos, ofreciendo datos cruciales sobre las propiedades morfológicas y funcionales tanto del sistema olfativo principal como del sistema vomeronasal. A través del estudio de las proteínas Gα_{i2} y Gα_o, vinculadas respectivamente a las familias de receptores de feromonas V1R y V2R, se pudo identificar las familias de receptores presentes en el sistema vomeronasal (SVN). La neuroplasticidad y el desarrollo neuronal fueron examinados mediante la proteína asociada al crecimiento GAP-43 (Benowitz et al. 1990), mientras que la madurez del sistema se evaluó con la proteína marcadora olfativa OMP (Albeanu et al. 2018). Para distinguir distintas subpoblaciones neuronales, se emplearon las proteínas de unión al calcio: calbindina (CB), calretinina (CR), secretagoguina (Andressen et al. 1993; Wagner et al. 2000). La proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2), que se usa para marcar tanto el soma como las dendritas de las células mitrales, fueron igualmente investigados. Los astrocitos y células envoltantes se detectaron usando un anticuerpo contra la GFAP (Doucette 1993).

El procedimiento para el análisis comenzó con la desparafinización y rehidratación de las muestras, seguido de la inhibición de la peroxidasa endógena mediante una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada. Las uniones inespecíficas se bloquearon utilizando suero de caballo del kit ImmPRESS VR Anti-mouse IgG/Anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, CA, EE.UU.). Los anticuerpos primarios se aplicaron a las muestras, que se incubaron durante la noche a 4°C en una cámara húmeda. Posteriormente, se incubaron con el reactivo ImmPRESS VR Polymer HRP anti-rabbit / anti-mouse IgG a temperatura ambiente por 20 minutos. Tras enjuagues en tampón Tris, la visualización se llevó a cabo con DAB y peróxido de hidrógeno, resultando en un precipitado marrón en las áreas de interés. Algunos anticuerpos se analizaron adicionalmente con una contratinción de hematoxilina para mejorar la caracterización y contextualización de los marcadores en el tejido.

Los protocolos inmunohistoquímicos se validaron mediante controles adecuados, utilizando muestras sin anticuerpo primario como controles negativos, los cuales no mostraron marcaje ni señales inespecíficas. Como controles positivos, se replicó el proceso en tejidos de ratón conocidos por expresar las proteínas objetivo, confirmándose la positividad esperada.

3.4.3. Doble tinción inmunohistoquímica

Se utilizó un protocolo secuencial de doble marcaje inmunohistoquímico en dos fases (Hasui et al. 2003). Las secciones fueron sumergidas durante 5 minutos en una solución de glicina 0,1 M (pH 2,2) entre ambos marcajes inmunológicos. Para seleccionar el colorante más adecuado para visualizar la inmunorreacción, se combinaron el DAB y el Kit de Substrato de Peroxidasa Vector VIP (SK-4600, Vector Laboratories), intercambiando su orden.

Tabla 1. Anticuerpos y lectinas empleados. Especies de elaboración, diluciones, fabricante y número de catálogo. ABC, complejo avidina-biotina; BSI-B₄, isolectina *Bandeiraea simplicifolia* B₄; CB, calbindina; CR, calretinina; GAP-43, proteína 43 asociada al crecimiento (growth-associated protein 43); GFAP, proteína ácida fibrilar glial (glial fibrillary acidic protein); Gai2, subunidad α 2 de la proteína G; Gao, subunidad α o de la proteína G; HRP, peroxidasa del rábano (horseradish peroxidase); IgG, Inmunoglobulina G; LEA, aglutinina de *Lycopersicum esculentum*; MAP-2, proteína asociada a microtúbulos (microtubule-associated protein); OMP, proteína marcadora olfativa (olfactory marker protein); SG, Secretagovina; UEA, aglutinina del tojo (*Ulex europaeus*).

Anticuerpo	Especie del 1er anticuerpo/dilución	Número de catálogo del 1er anticuerpo	Especie del 2er anticuerpo/dilución
Anti - Gao	Conejo 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-387	ImmPRESS VR HRP anti-conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti - Gao	Conejo 1:400	MBL 551	ImmPRESS VR HRP anti-conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti - Gai2	Conejo 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-7276	ImmPRESS VR HRP anti-conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti - OMP	Cabra 1:400	Wako 544-10001	Horse anti-cabra IgG 1:250 Vector BA-9500
Anti - GAP-43	Ratón 1:400-1:4,000	Sigma G9264	ImmPRESS VR HRP anti-ratón IgG Reagent MP-6402-15
Anti - CB	Conejo 1:6,000	Swant CB38	ImmPRESS VR HRP anti-conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti - CR	Conejo 1:6,000	Swant 7697	ImmPRESS VR HRP anti-conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti- α -tubulin	Conejo 1:500	Abcam 7291	ImmPRESS VR HRP anti-ratón IgG Reagent MP-6402-15
Anti-MAP-2	Ratón 1:400	Sigma M4403	ImmPRESS VR HRP Anti-ratón IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GFAP	Ratón 1:400	Dako Z0334	ImmPRESS VR HRP Anti-conejo IgG Reagent MP-6401-15
Anti-SG	Conejo 1:100	Proporcionado por Ludwig Wagner (Universidad de Vienna, Austria)	ImmPRESS VR HRP anti-conejo IgG Reagent MP-6401-15
UEA	60 μ g/ml	Vector L-1060	Conejo 1:50 DAKO P289

LEA	20 µg/ml	Vector B-1175	Vectastain ABC reagent PK-4000
BSI-B ₄	100 µg/ml	Sigma L-2140	Vectastain ABC reagent PK-4000

3.5 ESCÁNER CON TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA

En el caso concreto de las cabezas de lobo se realizó una tomografía computarizada (TC) de la cabeza de ejemplares lobo, utilizando un escáner helicoidal multidetector de 16 cortes (Hitachi Eclon 16), obteniendo series con algoritmos tanto para hueso como para tejido blando en posición de decúbito esternal. Para la serie de hueso, se utilizó un grosor de corte de 1,25 mm cada 0,625 mm, mientras que para la serie de tejido blando se aplicó un grosor de corte de 2,5 mm cada 1,25 mm. Los factores de exposición fueron 120 kVp y 200 mA, con 1 segundo por rotación y un pitch de 0,5.

3.6 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES Y TRATAMIENTO DIGITAL

Las imágenes presentadas en este documento fueron capturadas mediante la cámara digital Karl Zeiss Axiocam MRc5, conectada a un microscopio Zeiss Axiophot. Se empleó Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San José, CA, EE. UU.) según fuera necesario para ajustar únicamente parámetros como brillo, contraste, equilibrio de niveles de luz, así como recortar o cambiar el tamaño de las imágenes para adaptarlas al formato de presentación. No se realizaron modificaciones ni se introdujeron características específicas en las imágenes. Además, algunas fotomicrografías se generaron como un mosaico de varias fotografías fusionadas mediante el uso de dos programas de unión de imágenes (PTGui Pro, New House Internet Services BV, Países Bajos y AutoStich).

4. PUBLICACIONES

Tabla 2. Datos de las cinco publicaciones que componen la tesis doctoral.

	PUBLICACIÓN 1	PUBLICACIÓN 2	PUBLICACIÓN 3	PUBLICACIÓN 4	PUBLICACIÓN 5
Revista	Journal of Anatomy	Annals of Anatomy	Animals	Frontiers in Neuroanatomy	Journal of Anatomy
Año de publicación	2020	2022	2022	2023	2024
IF	2.610	2.2	3.0	2.9	2.4
IF a 5 años	3.151	2.3	3.2		2.6
Cuartil	Q2 - 6/22 Anatomy & Morphology	Q2 - 9/20 Anatomy & Morphology	Q1 (D1) - 12/62 Agriculture, Dairy & Animal Science Q1 (D1) - 13/143 Veterinary Sciences	Q1 (D1) - 2/20 Anatomy & Morphology	Q2 - 7/20 Anatomy & Morphology
Nº de citas en Google Scholar	23	11	5	4	0
Nº de citas en WOS	17	8	2	2	0
Nº de citas en Scopus	16	8	2	2	0
OA	No	Sí (Golden OA)	Sí	Sí	Sí (Golden OA)

4.1 PUBLICACIÓN NÚMERO 1

Ortiz-Leal I, Torres MV, Villamayor PR, López-Beceiro A, Sanchez-Quinteiro P. The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *Journal of Anatomy*. 237(5):890-906 (2020).

doi: 10.1111/joa.13254

Revista: Journal of Anatomy

Año de publicación: 2020

Editorial: Wiley

ISSN: 0021-8782

Citas en Google Scholar: 18

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2020): 2.610

Factor de impacto de 5 años (2020): 3.151

Categoría (2020):

Anatomy & Morphology Q2 (9/20)

Contribución del doctorando: I. O. L. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.

Autorización de la revista/editorial: Este artículo con derechos de autor pertenece a o está licenciado exclusivamente a John Wiley & Sons [Copyright © 1999-2022 John Wiley & Sons, Inc. Todos los derechos reservados]. Un acuerdo entre la Universidade de Santiago de Compostela – Pablo Sánchez Quinteiro y John Wiley and Sons consiste en una licencia (número de licencia: 5732721127297) para utilizar este artículo como parte de esta tesis doctoral (ver Anexo I).

The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model

Irene Ortiz-Leal | Mateo V. Torres | Paula R. Villamayor | Ana López-Beceiro | Pablo Sanchez-Quinteiro 

Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

Correspondence

Pablo Sanchez-Quinteiro, Department of Anatomy, Animal Production, and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain.
Email: pablo.sanchez@usc.es

Funding information

University of Santiago de Compostela, Grant/Award Number: 1551-8179

Abstract

The vomeronasal system (VNS) has been extensively studied within specific animal families, such as Rodentia. However, the study of the VNS in other families, such as Canidae, has long been neglected. Among canids, the vomeronasal organ (VNO) has only been studied in detail in the dog, and no studies have examined the morpho-functional or immunohistochemical characteristics of the VNS in wild canids, which is surprising, given the well-known importance of chemical senses for the dog and fox and the likelihood that the VNS plays roles in the socio-reproductive physiology and behaviours of these species. In addition, characterising the fox VNS could contribute to a better understanding of the domestication process that occurred in the dog, as the fox would represent the first wild canid to be studied in depth. Therefore, the aim of this study was to analyze the morphological and immunohistochemical characteristics of the fox VNO. Tissue dissection and microdissection techniques were employed, followed by general and specific histological staining techniques, including with immunohistochemical and lectin-histochemical labelling strategies, using antibodies against olfactory marker protein (OMP), growth-associated protein 43 (GAP-43), calbindin (CB), calretinin (CR), α -tubulin, G α o, and G α i2 proteins, to highlight the specific features of the VNO in the fox. This study found significant differences in the VNS between the fox and the dog, particularly concerning the expression of G α i2 and G α o proteins, which were associated with the expression of the type 1 vomeronasal receptors (V1R) and type 2 vomeronasal receptors (V2R), respectively, in the vomeronasal epithelium. Both are immunopositive in foxes, as opposed to the dog, which only expresses G α i2. This finding suggests that the fox possesses a well-developed VNO and supports the hypothesis that a profound transformation in the VNS is associated with domestication in the canid family. Furthermore, the unique features identified in the fox VNO confirm the necessity of studying the VNS system in different species to better comprehend specific phylogenetic aspects of the VNS.

KEYWORDS

fox, G proteins, immunohistochemistry, lectins, pheromones, *Ulex europaeus* agglutinin, vomeronasal



Torres and Villamayor are joint second authors.

1 | INTRODUCTION

Although historically, chemical senses have not been viewed to be as important as other sensorial systems, they play key roles in animal behaviours, in part because chemical detection systems project to the limbic system, where they affect emotions and conducts (Iovino et al., 2019).

The two primary systems involved in chemical recognition are the main olfactory system (MOS) and the vomeronasal system (VNS). The MOS is mediated by the main olfactory epithelium (MOE) and is closely related to the limbic system, where it has been associated with both recall and conscious sensation (Reep et al., 2007). In contrast, the VNS, which consists of the vomeronasal organ (VNO) and the accessory olfactory bulb (AOB), has been shown to play unconscious roles in reproductive behaviours (Over et al., 1990; Signoret, 1991; Rekwot et al., 2001), maternal recognition (Del Cerro, 1998), and the detection of predators (Brechtbühl et al., 2013), and is specialised for the detection of pheromones (Holy, 2018).

Despite their anatomical proximity, however, these two systems are anatomically independent and show large morphological and functional differences, indicating that these two systems likely evolved independently (Estes, 1972; Wysocki, 1979; Herrada and Dulac, 1997; Halpern and Martinez-Marcos, 2003; Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2009). However, morphological independence has been questioned, based on the presence of vomeronasal receptors in the olfactory mucosa and vice versa (Rodríguez et al., 2000; Sam et al., 2001; Trinh and Storm, 2003; Swaney and Keverne, 2009).

Knowledge regarding the diversity of the VNS, at both anatomical and genetic levels, such as the expression patterns of the VNS receptors, has recently broadened. This diversity differs from the general pattern of evolutionary conservation observed among olfactory receptors in the MOS. The 'differential tuning' hypothesis states that the VNO evolved to detect a limited group of ligands, such as pheromones, due to the specificity of these ligands within species, whereas MOE receptors evolved to detect a broad range of odours, such as environmental cues, which are expected to remain relatively stable within the environment (Grus and Zhang, 2008). Comparative sequence analyses have demonstrated that MOE receptor gene sequences are well-conserved, whereas VNO receptors are associated with a wide range of genes, suggesting a more dynamic evolution and a potentially more important role within species (Grus and Zhang, 2004).

The Rodentia family has been used as the primary referent for the VNO studies in mammals (Salazar et al., 2013). In most of the species studied within this family, the neuroepithelium is organised into two layers: the apical layer and the basal layer. Each of these layers expresses distinct G proteins, which are inherent to the receptor transduction cascade: the $G\alpha i2$ protein and the $G\alpha o$ protein. The $G\alpha i2$ protein is expressed in the apical neurosensorial layer and is associated with the expression of type 1 vomeronasal receptors (V1R), which project to the anterior region of the AOB. In contrast, the $G\alpha o$ protein is expressed in the basal neurosensorial layer of the epithelium and is associated with the transduction cascade of type

2 vomeronasal receptors (V2R), which project to the posterior region of the AOB. However, in other mammals, such as the dog, cat, and sheep, the differential expression of G proteins and vomeronasal receptors has not been observed, as these species exclusively express the V1R receptor family (Dulac and Axel, 1995; Halpern and Martinez-Marcos, 2003; Salazar et al., 2007; 2013; Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2011).

Chemical senses are well-known to be important in the dog (Jeziński et al., 2016). However, little is known regarding the VNO in canids, aside from morphological and immunohistochemical studies performed in the dog (Salazar et al., 1984; 2013; Dennis et al., 2003). Moreover, the limited development of the VNO epithelium observed in the dog and the poor differentiation of the AOB glomerular and nervous layers in this species does not appear to reflect the importance of chemical senses in this species (Nakajima et al., 1998; Salazar et al., 2013).

In canids, such as the dog, the VNO is located on either side of the vomer bone, at the base of the nasal cavity. The organ is surrounded by incomplete cartilage and is laterally covered by the nasal cavity respiratory mucosa. The organ has a cul-de-sac caudal end, and at its rostral end, it connects with the incisive duct, which opens into the oral cavity through the incisive papilla (Salazar et al., 2013).

When determining the G-protein distribution in dogs, and consequently the expression pattern of V1R and V2R receptors, immunohistochemical studies performed by Salazar et al. (2013) demonstrated that the $G\alpha i2$ protein is apically distributed within the sensorial epithelium and is expressed in the nervous and glomerular vomeronasal layers of the AOB.

Salazar et al. (2013) were unable to detect $G\alpha o$ immunopositivity in either the VNO or the AOB, suggesting that the dog VNS is entirely dependent on V1R receptors. In contrast, Dennis et al. (2003) were able to observe immunopositive labelling in the sensorial epithelium for both $G\alpha i2$ and $G\alpha o$ proteins. However, both authors indicated that obtaining these results required antigenic retrieval, which was accomplished by boiling tissue sections in a citrate buffer solution, prior to the addition of primary antibodies. The use of this antigenic retrieval technique could unintentionally amplify cross-reactivity, promoting positive immunolabelling.

Regrettably, this issue has not been addressed in more recent studies performed in dogs. Therefore, the scientific community continues to accept the absence of V2R expression in studied domestic animals. The absence of V2R receptors has been theorised to be the result of the domestication process, during which artificial selection may have produced an involution of the VNS in canids, a hypothesis that has been proposed by several authors (Barrios et al., 2014; Jeziński et al., 2016). Therefore, studying the expression patterns of these receptors and the general anatomy of the VNO in a wild canid with phylogenetic proximity to the dog, such as the red fox, *Vulpes vulpes*, would allow interspecies comparisons that could broaden the understanding of this theory. Thus far, only a very elementary study has been performed examining the fox VNO (Karimi et al., 2016) and it did not include immunohistochemical characterisations, which will be key for understanding the organisation of the VNS.

The lack of information concerning the fox VNS is astounding, given that this system is thought to play a decisive role in the reproductive processes for this species. The red fox is generally a solitary animal, mating only during the reproductive season, which predominantly occurs during spring, for one cycle each year. Not all females in a specific population reproduce every year, and the proportion of females that do not reproduce is highly variable and correlates with population density, likely due to the social suppression of reproduction in large groups (Gentle, 2005). This suppression has recently been observed in other species, such as the naked mole-rat (Dennis *et al.*, 2020). The availability of food allows dominant females to subordinate sterile females, who help to raise the litter and assist with group formation (Cavallini and Santini, 1996).

De Miguel *et al.* (2005) correlated the smell of other carnivores (derived from faeces or urine) with behavioural changes in the fox (increased defecation). Because the stimuli used in this study were presented over a long period of time, in the open air, the observed behavioural changes in the foxes were likely caused by the stimulation of the VNS, evoked by pheromones in the faeces or urine, instead of specifically induced by the smells associated with these stimuli, which are primarily composed of volatile components, with an ephemeral presence in the external environment (González *et al.*, 1991). McLean *et al.* (2019) characterised the chemical compounds excreted by fox tails, identifying several compounds (for example, sulcatone) that are used as semiochemicals in several mammal species, further illustrating the importance of the VNS for fox behaviours.

The aim of this study was to analyse the morphological and immunohistochemical characteristics of the fox VNO because of the importance of this system in canines and the need to study the VNO in wild canids to better understand the domestication process. Various tissue dissection and microdissection techniques were used, followed by general and specific histological staining, including immunohistochemical and lectin-histochemical labelling techniques. For this study, three different lectins were used: *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), a specific vomeronasal marker in several species, including the dog (Salazar *et al.*, 2013); *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B₄ (BSI-B₄), which selectively marks the vomeronasal pathway in both rats (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 1998) and opossums (Shapiro *et al.*, 1995); and *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA), a specific marker for both the MOS and the VNS in several species of interest, such as the rabbit (Villamayor *et al.*, 2018; 2020) and the dog (Salazar *et al.*, 2013).

In addition, a variety of antibodies were used for the immunohistochemical study of the fox VNO. Among these, the anti-olfactory marker protein (OMP) antibody was employed specifically to label mature neurons in the MOS and VNS pathways. The anti-growth-associated protein 43 (GAP-43) antibody was used to identify neural growth. Antibodies against specific calcium-binding proteins (calbindin [CB] and calretinin [CR]), which were previously characterised in other species, such as the rabbit (Villamayor *et al.*, 2018), were also used. Lastly, antibodies against G proteins (G α i2 and G α o) were used to examine G protein expression patterns.

We aimed to improve our understanding of the VNS in canids, specifically in the fox. Because the fox is a wild canid, anatomical and

morphofunctional resemblances and divergences compared with a domestic canid, such as the dog, can help us understand the intricacies of the domestication process, and several of the features in the fox that were observed in this study suggest the validity of this hypothesis.

2 | METHODS

A total of nine foxes were used in this study, eight of which (Z1–Z7 and ZC1) were acquired through hunting activities, organised by the Galician Hunting Federation and authorised by the Galician Environment, Territory, and Tenement Council, with the necessary permissions. The ninth fox (Zx) was posteriorly incorporated into this lot, after being acquired by the Anatomy Department staff from a car accident, and preserved immediately following dissection in Bouin's fixative (Bf).

Foxes Z1–3 and Z7 were also conserved in Bf. Foxes Z5 and ZC1 were preserved in formalin. Fox ZC1 head was frozen and transverse-sectioned to construct a macroscopic photographic series. Foxes Z1–3, Z5, and Z7 were dissected and the VNOs extracted, embedded in paraffin, and cut by a microtome. The olfactory bulbs were extracted and conserved in either 10% formalin or Bf. Table 1 gives details of the foxes and how the samples were processed.

The VNO samples were embedded in paraffin, in a gradual manner, and posteriorly sectioned by a microtome at a thickness of 6–7 μ m. The VNO was serially transverse-sectioned along its entire length, from caudal to rostral, or after previously dividing the organ into two sections, posterior and anterior.

Sample sections were stained using Haematoxylin-Eosin, Periodic acid-Schiff (PAS), Alcian Blue, and Gallego's Trichome stains (Ortiz-Hidalgo, 2011).

2.1 | Lectin histochemistry protocol

LEA and BSI-B₄ were obtained as biotinylated conjugates. First, a 3% hydrogen peroxide solution was added to deparaffinised and rehydrated slides, to inactivate the endogenous peroxidase activity.

TABLE 1 Summary of the foxes, samples, and fixation techniques used

Fox	Description	Samples	Fixative
Z1	♀ Adult	VNO, brain	Bouin's
Z2	♂ Elderly	VNO, brain	Bouin's
Z3	♂ Adult	VNO, brain	Bouin's
Z5	♂ Young	VNO, brain	Formalin
Z7	♀ Young	Nasal cavity, brain	Bouin's
ZC1	Adult	Macroscopic transverse sections	Formalin
ZX	Young	Nasal cavity	Bouin's

Sections were then incubated with 2% bovine serum albumin (BSA) in 0.1 M phosphate-buffered (pH 7.2) solution (PB). LEA and BSI-B₄ lectins were added, separately, and incubated overnight in 0.5% BSA solution. The next day, after two 2-min washes in PB, the samples were incubated for 1.5 h at room temperature with an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) reagent (ABC complex; Vector Laboratories). A 0.003% hydrogen peroxide solution, in 0.2 M Tris-HCl buffer, and a 0.05% 3,3-diaminobenzidine (DAB) chromogen solution were used to visualise the reaction. The DAB reagent developed into a brown precipitate, which enabled visualisation of the reaction.

For the UEA lectin, we followed the same protocol described for LEA and BSI-B₄ lectins for the two first steps. Then, the slides were incubated for 1 hr in a 0.5% BSA-UEA solution. The samples were then washed for 3 × 5 min in a PB solution. An anti-UEA peroxidase-conjugated antibody was added and the slides were incubated overnight. The samples were washed with a PB solution and the reaction was visualised by adding a DAB solution, as described for the LEA and BSI-B₄ lectins.

Controls were performed both without the addition of lectins and with the preabsorption of lectins, using an excess amount of the corresponding sugar.

2.2 | Immunohistochemical protocol

All samples were first incubated in a 3% hydrogen peroxide solution to inactivate endogenous peroxidase activity, prior to the immunohistochemical reaction. Then, samples were incubated with either 2.5% horse serum, for the ImmPRESS reagent kit anti-mouse IgG/anti-rabbit IgG (Vector Laboratories), or 2% BSA for 30 min, to block non-specific binding sites. The primary antibody was then added and the incubation was performed at 4°C overnight. The next day the samples blocked with the ImmPRESS kit were incubated with either the ImmPRESS VR Polymer HRP anti-Rabbit IgG or the anti-mouse IgG reagent (see Table 2), with the exception of the samples incubated with the anti-OMP antibody, which was raised in goat. anti-OMP-labelled samples were incubated with a biotinylated anti-goat IgG. All samples were then incubated for 1.5 hr in an ABC reagent (Vectastain, Vector Laboratories). All antibodies were maintained under humid conditions. In all cases, three successive 5-min PB rinses were performed in-between steps. All samples were rinsed in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.61, for 10 min, prior to visualising the reaction with a DAB chromogen, following the same protocol described for the lectin histochemical labelling. Samples for which the primary antibody was omitted were used as negative controls (Figures S1 and S2).

TABLE 2 Summary of the antibodies and lectins used, including species of elaboration, dilution, catalogue number, and manufacturer

Antibody	1st Ab species/dilution	1st Ab catalogue number	2nd Ab species/dilution, catalogue number
Anti - Gαo	Rabbit 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-387	ImmPRESS VR HRP anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti - Gαo	Rabbit 1:400	MBL 551	ImmPRESS VR HRP anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti - Gαi2	Rabbit 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-7276	ImmPRESS VR HRP anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti - OMP	Goat 1:400	Wako 544-10001	Horse anti-goat IgG 1:250 Vector BA-9500
Anti - GAP-43	Mouse 1:400-1:4,000	Sigma G9264	ImmPRESS VR HRP anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti - CB	Rabbit 1:6,000	Swant CB38	ImmPRESS VR HRP anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti - CR	Rabbit 1:6,000	Swant 7697	ImmPRESS VR HRP anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-α-tubulin	Rabbit 1:500	Abcam 7291	ImmPRESS VR HRP anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
UEA	60 µg/ml	Vector L-1060	Rabbit 1:50 DAKO P289
LEA	20 µg/ml	Vector B-1175	Vectastain ABC reagent PK-4000
BSI-B ₄	100 µg/ml	Sigma L-2140	Vectastain ABC reagent PK-4000

ABC, avidin-biotin-complex; BSI-B₄, *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B₄; CB, calbindin; CR, calretinin; GAP-43, growth-associated protein 43; Gαi2, subunit αi2 of G protein; Gαo, subunit αo of G protein; HRP, horseradish peroxidase; IgG, Immunoglobulin G; LEA, *Lycopersicon esculentum* agglutinin; OMP, olfactory marker protein; UEA, *Ulex europaeus* agglutinin.

2.3 | Image acquisition and digital processing

Digital images were captured using a Carl Zeiss Axiocam MRc5 digital camera connected to a Zeiss Axiophot microscope. Adobe PHOTOSHOP CS4 (Adobe Systems) was used to adjust for brightness, contrast, and balance levels. However, no features of the image were enhanced in any way, moved or introduced. Additionally, an image-stitching software (PTGuiPro) was used for those figures composed of several photographs.

3 | RESULTS

The study of the VNS will be addressed at both macroscopic and microscopic levels. For each of these levels, descriptions of the VNO and the vomeronasal nerves are presented in detail.

3.1 | Macroscopic study of the VNS

3.1.1 | Vomeronasal organ

To access the VNO, it was necessary to expose the nasal septum (Figure 1). First, the lateral wall of the cavity formed by the maxillary bone was removed and the large ventral nasal concha extracted. In the rostroventral area of the septum, covered by a thin respiratory mucosa layer, a slightly prominent tubular formation was observed (Figure 2a,b), which extended in a rostrocaudal direction through the nasal cavity. After a meticulous dissection, hindered by the hidden position of the organ, the tubular structure was successfully extracted in its entirety (Figure 2c).

This observation was complemented by the study of the transversal section series (Figure 1b), which allowed the assessment of the topographical relationships between the organ and the vomer

bone, the nasal septum, and the hard palate. The medial cartilage of the cartilaginous capsule of the organ contacts the vomer bone, extending its most dorsal projection onto the cartilaginous portion of the nasal septum (Figure 1a). Laterally, the organ relates to the ventral meatus recess formed within the nasal cavity. The organ is covered by the respiratory mucosa. Through these transversal sections, the organ can be observed to rest on the hard palate, which is profusely irrigated and forms a mucous pad for the organ (Figure 1c).

Additionally, the vomeronasal duct can be distinguished. Its two primary components, the parenchyma and the lumen of the organ, can be discriminated. In the medial portion of the parenchyma, numerous vessels can be macroscopically distinguished (Figure 1c). The rostrocaudal variation of the VNO can be appreciated in the transverse section series. The organ extends from the level of the canine tooth root to the second premolar level (Figure 1b).

The communication between the VNO and the external environment allows the molecules responsible for chemical communications to access the neurosensory epithelium. This connection is established in the fox indirectly, through the incisive duct (or nasopalatine duct). The incisive duct establishes a communication between the nasal and oral cavities, and with the vomeronasal duct, which occupies the midpoint between these cavities. Macroscopically, using cannulation with a metal rod, we demonstrated that the incisive duct communicates with the oral cavity through the incisive papilla (Figure 2e). The incisive duct was observed to extend in the fox, from a very rostral portion, caudal to the incisors, to the beginning of the tubular formation (Figure 2d,e). It remains to be determined whether the vomeronasal duct opens into the incisive duct, as this could not be established macroscopically; this will be assessed on the microscopic level.

Finally, the VNO was extracted from the bone tissue, to which it is tightly bound by dense connective tissue. A transverse cut was made to the sample to ensure the identity of the VNO. At first

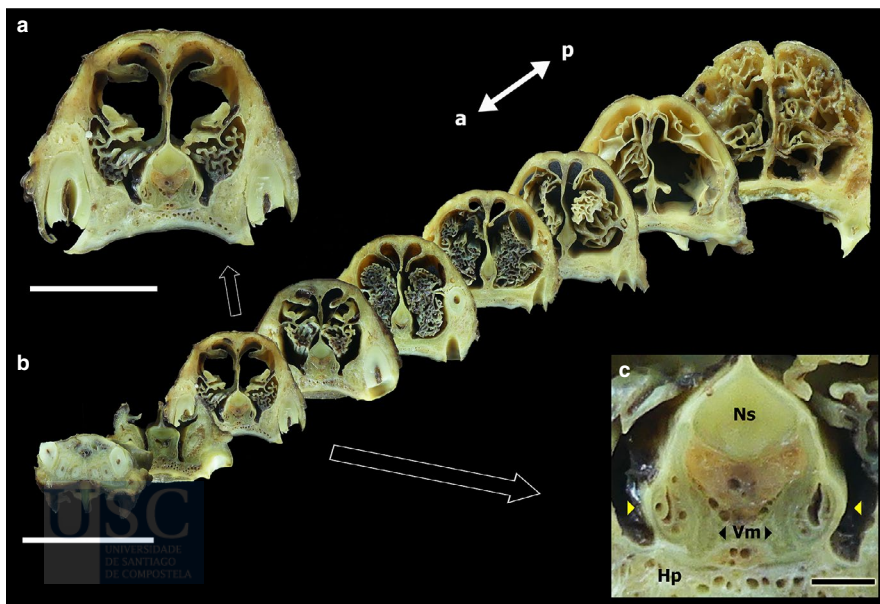


FIGURE 1 (a) Transverse sections of the fox nasal cavity. Enlarged view of a central transverse section of the nasal cavity, in which the VNO can be identified, from the macroscopic series (b), which extends from the incisive papilla to the coanas. (c) Enlarged view of the central section, showing the following elements: VNO (yellow arrowheads), nasal septum (Ns), vomer bone (Vm), hard palate (Hp). Scale bars: (a) 2.5 cm, (b) 5 cm, (c) 2 mm

glance, the vomeronasal duct, the cartilaginous capsule, and the parenchyma of the organ can be recognised (Figure 2c).

3.1.2 | Vomeronasal nerves

The connection between the VNO and the AOB is established through the vomeronasal nerves (Figure 2). Macroscopically, these nerves were relatively easy to identify because they course along the nasal cavity submucosa (Figure 2f). After leaving the organ through the dorsal cleft formed by the cartilage, the vomeronasal nerves course in a caudodorsal direction to the cribriform ethmoidal plate. Approximately five to six vomeronasal nerve branches were identified, with a fine appearance, which were slightly translucent, suggesting their unmyelinated nature. This sensory innervation is complemented by autonomic caudal nasal nerve fibres, which can

be observed to have larger calibres and a white appearance, coursing independently from the sensory nerves along the nasal cavity floor (Figure 2f).

3.2 | Microscopic study of the VNO

3.2.1 | Communication with the external environment

The VNO establishes indirect communication with both the nasal and oral cavities through the incisive duct (or nasopalatine duct; Figures 3 and 4).

The incisive duct opens to the nasal cavity through an aperture located on the floor of the ventral recess, lateral to the VNO (Figures 2d,e and 3a). Furthermore, the duct establishes communication with

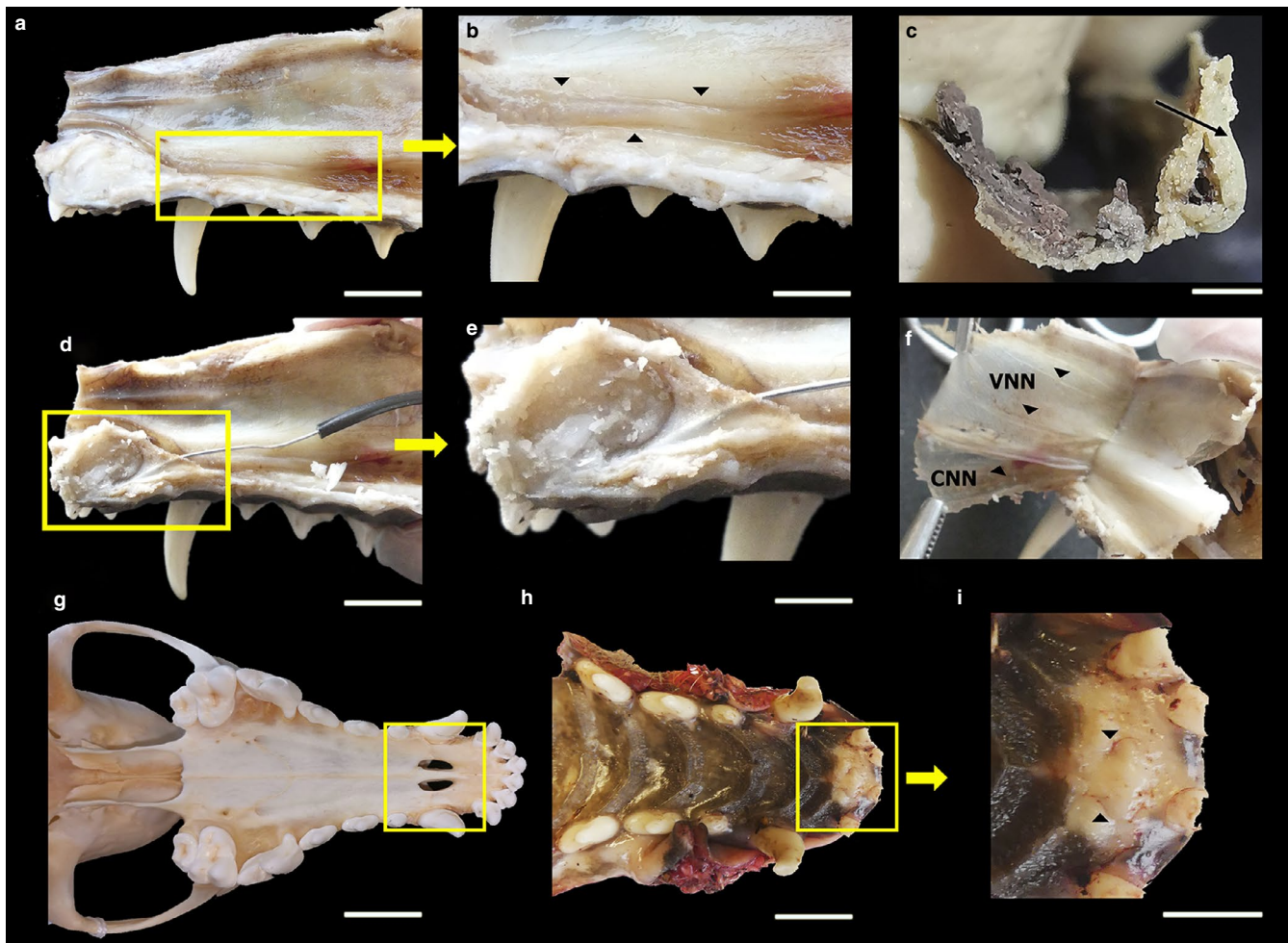


FIGURE 2 Dissection of the VNO and its innervation, showing the cannulation of the incisive duct and its opening in the incisive papilla, in the fox. (a) Lateral view of the nasal septum, where the VNO is framed. (b) Enlarged view of the nasal septum. The arrowheads delimit the VNO. (c) VNO extracted and cross-sectioned, showing the lumen of the duct and the cartilaginous capsule (arrowhead). (d) Lateral view of the nasal septum. Cannulation of the incisive duct is framed. (e) Enlarged view of the cannulation. (f) Medial view of the nasal cavity mucosa after separation from the nasal septum. Innervation is indicated by arrowheads. VNN, vomeronasal nerves; CNN, caudal nasal nerve. (g) Ventral view of the skull of a fox. The palatine fissure is framed. (h) Ventral view of the hard palate. The rostral area is framed, and the higher magnification view shows that the incisive papilla can be found here, demarcated by arrowheads (i). Scale bars: (a,b,d,e,g,h) 1 cm, (c) 2 mm, (i) 0.5 cm.

the oral cavity, through the incisive papilla (Figure 3d). The incisive duct meets the VNO at a central point of its course (Figures 3b and 4).

The vomeronasal cartilage surrounds both the VNO and the incisive duct. This cartilage modifies both its position and its length along its course from a caudal to a rostral position. In the caudal section, it is more elongated in its medial axis (Figure 3a), whereas in the more rostral levels, the cartilage situates on a dorsal position, relative to the nasopalatine duct (Figure 3c) and, at the most rostral portion, warps sideways at the opening through the incisive papilla (Figure 3d).

3.2.2 | Vomeronasal organ

As a first approximation, the organ is divided into a vomeronasal capsule and a vomeronasal duct, which is associated with the parenchyma, where blood vessels, nerves, and vomeronasal glands are located (Figure 5a,d,e).

The capsule surrounds the parenchyma, protecting it and preventing the lumen from collapsing. The capsule is composed of hyaline cartilage and has a 'J' shape, due to being incomplete in its dorsolateral portion (Figure 5a).

The vomeronasal duct consists of parenchyma and a lumen. The lumen generally has a kidney-like shape and is lined internally with a pseudostratified epithelium. The lateral portion of this epithelium is respiratory in nature, the medial portion is neurosensory in nature, and both epithelia appear to be equally developed in size (Figure 5a).

The vomeronasal neurosensory epithelium is a columnar, pseudostratified, and non-ciliated epithelium, composed primarily of

three different cell types: the neuroreceptor cells, the sustentacular cells, and the basal cells. The first two cell types are arranged in a stratified manner, giving rise to an apical and a basal portion. The neuroreceptor cell dendrites have a terminal button, on which they present microvilli (Figure 5b,c).

Non-sensory epithelium, which can be found in both the nasal mucosa and the respiratory epithelium of the VNO, is a pseudostratified columnar epithelium that presents cilia on its surface. The epithelium contains numerous mucus-producing goblet cells and numerous glands that open into the duct, primarily on the dorsal and ventral commissures (Figure 5f-h). Four primary cell types can be identified in this epithelium, as shown in Figure 6a.2: sustentacular cells (white arrowheads), solitary cells (orange arrowheads), basal cells (black arrowheads), and goblet cells (green arrowheads).

Additionally, the immunohistochemical study of the fox VNO, using the anti-G α o antibody, enabled the identification of a subpopulation of cells, in both the respiratory mucosa and VNO respiratory epithelia (Figure 7). A Gallego trichrome-stained section of the VNO accompanies this immunohistochemical study (Figure 6).

Blood vessels are located in both the lateral and medial portions of the parenchyma; they are very numerous and form a large vascular network, providing the organ with an erectile tissue function.

The neuroreceptor cell axons converge to form unmyelinated nerve bundles, primarily located in the dorsomedial portion of the parenchyma (Figure 5a.1). In the lateral portion of the organ, less abundant, myelinated nerve bundles were also observed (Figure 5d,e).

The organ contains numerous glands that supply mucus to the lumen of the duct, known as serous glands, with tubular, acinar or

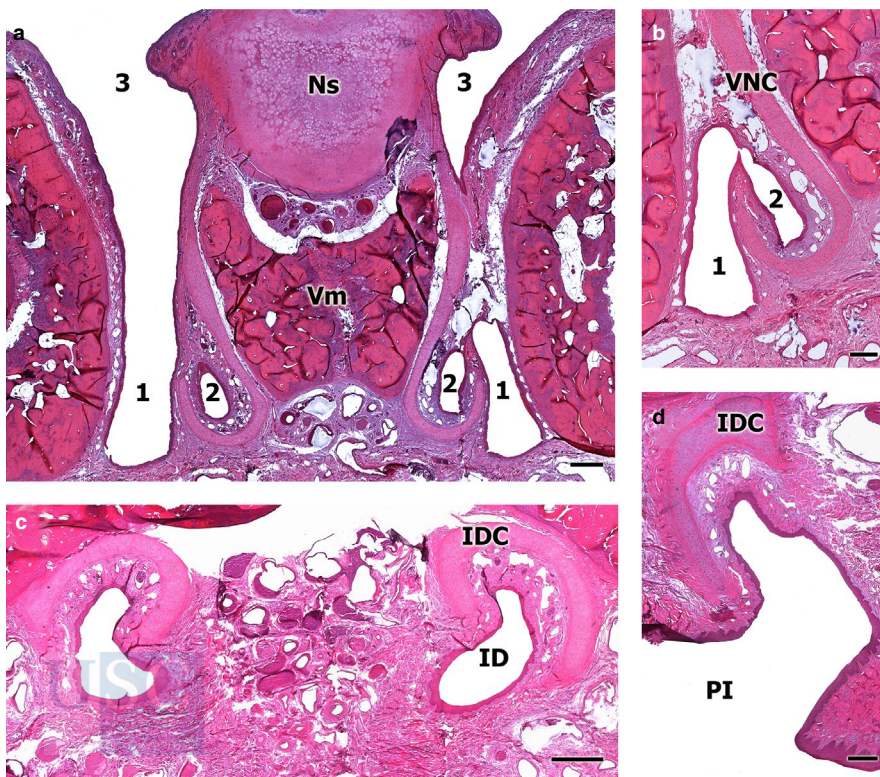


FIGURE 3 Sections of the decalcified fox nasal cavity for study of the communication between the VNO and the external environment. (a) Transverse section at the level of the anterior area of the nasal cavity, the incisive duct (ID) can be observed (1) running parallel to the vomeronasal duct (2) and opening into the ventral meatus of the nasal cavity (3, left-hand). Ns, nasal septum; Vm, vomere bone. (b) View at higher magnification of the exact point where communication between the vomeronasal duct (2) and the ID (1) is established. VNC, vomeronasal cartilage. (c) Transverse section of the ID at the level of the palatine fissure, which shows the cartilage of its capsule (IDC) in a dorsal position to the ID. (d) Enlarged view of the rostral transverse section of the nasal cavity, which shows how the ID opens to the incisive papilla. Scale bars: (a) 500 μ m, (b-d) 250 μ m

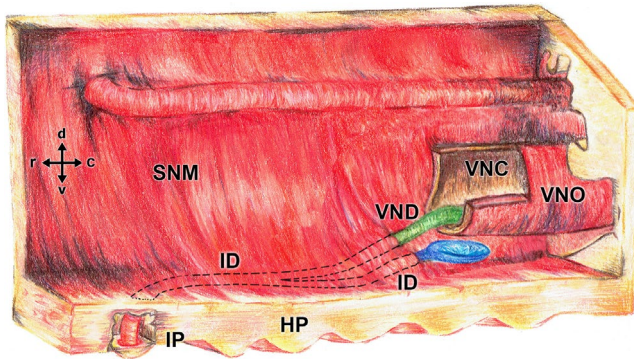


FIGURE 4 Drawing of the nasal cavity showing a schematic of the fox VNO, the confluence of the vomeronasal duct (VND, coloured in green) into the incisive duct (ID), and the opening of the ID into the oral cavity through the incisive papilla (IP). The opening of the ID into the nasal cavity is coloured in blue. HP, hard palate; SNM, septal nasal mucosa; VNC, vomeronasal cartilage

tubuloacinar morphologies. Serous glands secrete a PAS-positive and Alcian Blue-positive secretion into the duct (Figure 5f-h). Surprisingly, in the central and middle portions of the VNO, very few glands were observed, associated almost exclusively with the dorsal and ventral duct commissures. As the organ progresses caudally, these glands increase in number and concentrate on the medial parenchyma. Finally, in the most caudal portion of the organ, the glands are arranged in the dorsal and ventral portions. The glands open through the respiratory epithelium into the duct (Figure 5a,g).

3.2.3 | Immunohistochemical study of the VNO

An immunohistochemical study was performed in the VNO, using a panel of antibodies (Figure 8). The anti-G α antibody, which specifically labels the α subunit of the G-protein transduction

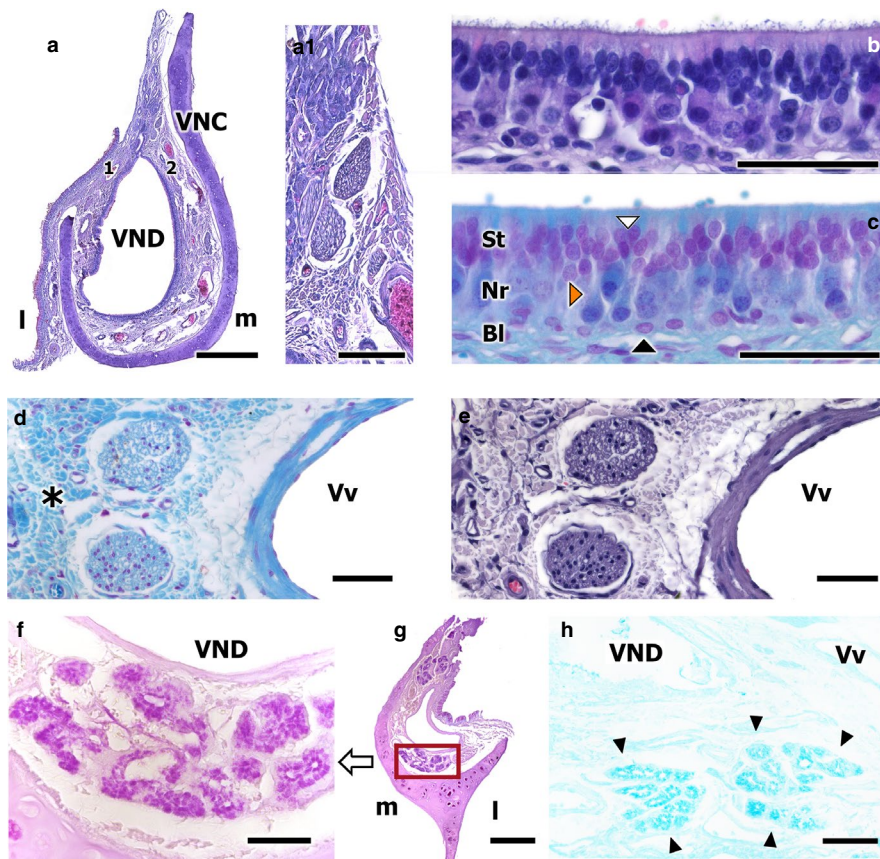


FIGURE 5 Transverse sections of the fox VNO. (a) Haematoxylin-Eosin (HE)-stained transverse section of the VNO. Higher magnification views of the neuroreceptor epithelium, after HE (b), and Gallego's Trichrome (c) staining, showing the three layers of the neuroepithelium, the sustentacular layer (St), the neuroreceptor layer (Nr), and the basal cell layer (Bl). The white arrowhead points to a sustentacular cell, the orange arrowhead to a neuroreceptor cell, and the black arrowheads to basal cells. Higher magnification of the unmyelinated nerves in (a.1) (HE-stained). (d,e) Vomeroneural nerves. Gallego's Trichrome and HE stains, respectively. Loose connective tissue is clearly identified (asterisk). (f-h) Disposition and morphology of the fox vomeronasal glands: ventral transversal section of the organ (f), which shows acinar, tubular, and acinotubular glands, serose and PAS⁺ in nature. PAS stain. VND, vomeronasal duct. (g) Transverse caudal section of the VNO, showing the PAS⁺ glandular tissue disposition. (h) Transverse caudodorsal section of the VNO. Tubular, serose, Alcian Blue⁺ glands. Alcian Blue stain. Scale bars: (a) 500 μ m, (b-e) 50 μ m, (f,h) 50 μ m, (g) 250 μ m

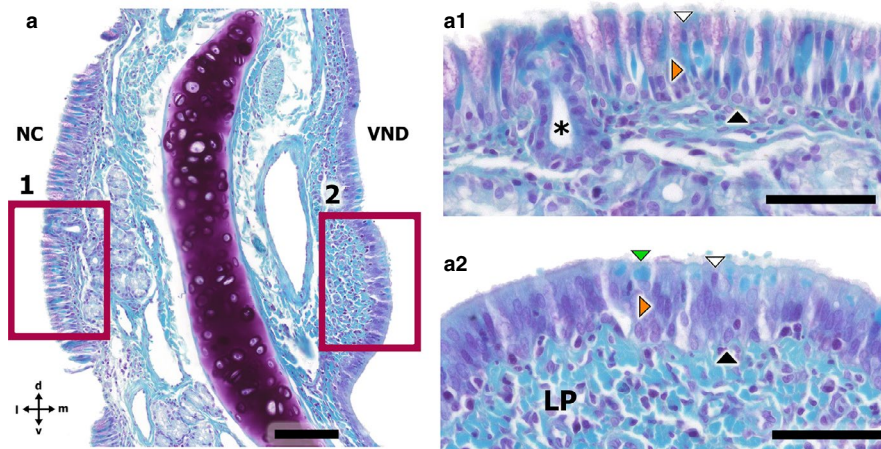


FIGURE 6 Gallego's Trichome-stained transverse section of the fox VNO and the nasal cavity respiratory mucosa, showing the two types of respiratory epithelia. (a) Transverse section of the VNO. NC, nasal cavity; VND, vomeronasal duct. (a.1) Higher magnification of the respiratory mucosa epithelium. The white arrowhead points to a sustentacular cell, the orange arrowhead to a columnar cell, and the black arrowhead to a basal cell. The asterisk shows a tubular gland duct. (a.2) Higher magnification of the respiratory epithelium of the VNO. The white arrowhead points to a sustentacular cell, the orange arrowhead to a columnar cell, the black arrowhead to a basal cell, and the green arrowhead to a goblet cell. LP, lamina propria. Scale bars: (a) 100 μm , (a.1, a.2) 50 μm

cascade, associated to the V2R receptor, labelled a subpopulation of neurons in the VNO epithelium, especially the dendrites and the soma. The dendrites can be identified from the soma to the lumen of the duct (Figure 8a,b). The anti-G α 2 antibody, which labels the α 2 subunit of the G-protein transduction cascade associated to the V1R receptors, shows a more conspicuous immunopositive labelling of neuroreceptor cells compared with the anti-G α immunolabelling, although not the entire neuroreceptor cell population. This labelling was more intense in the dendritic knobs of the neurons (Figure 8c,e). The labelling patterns displayed by the anti-G α and anti-G α 2 antibodies are comparable with those displayed by the anti-CB and anti-CR antibodies, respectively, although calcium-binding proteins appear to be less ubiquitous than the G-proteins (Figure 8d,g).

The anti- α -tubulin antibody, which specifically stains the cell soma and processes, shows an alternative labelling pattern, where the axons and dendrites of a subpopulation of neuroreceptor cells were positively labelled. This pattern represents a mix between the patterns resulting from the anti-G α 2 and the anti-G α antibodies (Figure 8f).

The anti-OMP antibody, which binds to OMP, a protein that acts as a marker of neuronal maturation, and the anti-GAP43 antibody, which binds to GAP43, a protein associated with neuronal axonal growth, both identified neuronal subpopulations with less defined morphological patterns than the other antibodies (Figure 8d,g).

3.2.4 | Lectin histochemical study of the VNO

Both the sensory epithelium neuroreceptor cells and the vomeronasal nerves of the VNO showed histochemically positive labelling for both the UEA and LEA lectins (Figure 9). UEA labelling was restricted

to neuroreceptor cells (Figure 9a,b), whereas with LEA labelling was conspicuous (Figure 9c), and both neuroreceptor cells and the lamina propria were labelled.

BSI-B₄ lectin staining did not result in any positive labelling in either the neurosensory epithelium or in the respiratory epithelium.

4 | DISCUSSION

An astonishing level of diversity exists among the structural, physiological, behavioural, and morphological aspects of the VNS in mammals (Meisami and Bhatnagar, 1998; Salazar and Sánchez-Quintero, 2009), which differs from the extensive conservation demonstrated for the MOS. The VNO evolved to increase its specificity within species, compromising the ability to detect a broader group of ligands (Luo and Katz, 2004). The MOE receptors, however, can detect a wider range of odours but lack the specificity of the VNO. This difference can also be observed at the genetic level, where MOE receptor gene sequences are well-conserved and the VNO contains a wider range of genes (Swaney and Keverne, 2009). Because of this wide morphological diversity, the interspecies extrapolation of information relative to the anatomy and histology of the VNS can be difficult and risky (Salazar *et al.*, 2007).

Within the Canidae family, VNO studies have only been performed in the dog (Dennis *et al.*, 2003; Salazar *et al.*, 2013), except for an elementary study on the VNO of the fox (*Vulpes vulpes*) performed by Karimi *et al.* (2016). The apparent absence of V2R receptors (Salazar *et al.*, 2013) in the dog has been proposed to be attributed to the domestication process, during which artificial selection induced an involution of the VNS in domesticated individuals of the Canidae family (Jeziński *et al.*, 2016). Therefore, studying a wild species within the Canidae family would likely shed light on the implications of the domestication process on the

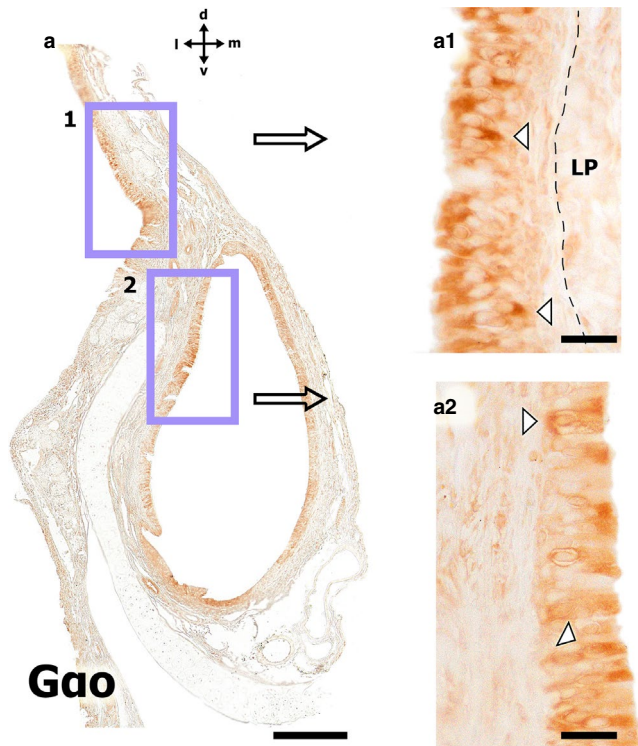


FIGURE 7 Immunohistochemical study using the anti-G α antibody in the fox VNO. (a) Transverse section of the VNO. (a.1) Higher magnification view of the respiratory mucosa epithelium. The white arrowhead points to more intensely labelled cells. The dashed line shows the limits of the epithelium. LP, lamina propria. (a.2) Higher magnification of the respiratory epithelium of the VNO. The white arrowhead points to more intensely labelled cells. Scale bars: (a) 250 μ m, (a.1, a.2) 50 μ m

VNO and elucidate the characteristics of this system among the Canidae family.

4.1 | Macroscopic features

The topography of the VNO that was observed in the fox was similar to that reported for the dog and other domestic ungulates, like the cow or the horse (Adams and Wiekamp, 1984; Salazar *et al.*, 1995). However, the fox VNO disposition differs from that described for Rodentia and Lagomorpha, which present VNOs located in a more dorsal position within the nasal cavity and are supported and encapsulated by the vomer bone (Vacarezza *et al.*, 1981) and the palatine process of the incisive bone (Villamayor *et al.*, 2018), respectively.

Similarities between the dog and the fox can also be observed when studying the communication between the vomeronasal duct with the outside world. In both the dog and the fox, as well as in other mammals, such as domestic ungulates (cow and horse), this communication is established indirectly, through the incisive duct, which communicates with the vomeronasal duct through the ventral recess of the nasal cavity, on one end, and with the oral cavity, through the incisive papilla, on the other (Adams and Wiekamp,

1984; Salazar *et al.*, 1997). This morphology differs from what that observed in rodents or lagomorphs, in which the vomeronasal duct opens directly to the nasal cavity and the incisive duct communicates independently both cavities (Salazar and Sánchez-Quintero, 1998; Villamayor *et al.*, 2018).

Several authors have used the morphology and extension of the vomeronasal cartilage, which forms the capsule of the VNO, as a phylogenetic classification element of the VNS (Wöhrmann-Repennig, 1984; Bhatnagar & Meisami 1998). In mammals, three different models have been observed for the vomeronasal capsule: this capsule can be entirely made of bone, as in the rat or the mouse (Salazar and Sánchez-Quintero, 1998; 2003); in other species, such as the chinchilla (Oikawa *et al.*, 1994) and the rabbit (Villamayor *et al.*, 2018), the capsule is composed of a mixture of bone and cartilage; and in species such as the cat or the dog (Suarez *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2013), the capsule is entirely made of cartilage. In the fox, the capsule is entirely made of cartilage, similar to those in cats and dogs. However, the cartilage in the fox has a 'J' shape, which differs from the prevailing 'U' shape observed in the dog (Salazar *et al.*, 1984).

4.2 | Histological study

The neuroepithelium of the duct, where odour molecules are recognised, is morphologically less developed in the fox than in rodents or the rabbit (Luckhaus, 1969; Zuri *et al.*, 1998). In the fox, this neuroepithelium is composed of three easily distinguishable layers: a basal layer, with distinct, round cells, a neuroreceptor cell layer, and a sustentacular cell layer. This layer definition, as well as the development of the neuroepithelium, is similar to the observations made in the dog by Salazar *et al.* (1984; 2013) and Dennis *et al.* (2003).

The sustentacular cell layer in the fox is well-developed, with a tight cell configuration. Compared with the sustentacular layer in the dog, this layer is more apically located in the fox (Adams and Wiekamp, 1984; Salazar *et al.*, 1984; 2013).

The placement of the vomeronasal epithelium greatly differs from the MOE, which is located in the nasal cavity, allowing olfactory receptors to be directly exposed to the outside world (Moran *et al.*, 1982). To be functional, the VNS must possess a medium that allows pheromones and environmental molecules to access receptors located in the mucocompilar complex of the neurosensory epithelium. The VNO provides glandular and vascular components (Salazar and Sánchez-Quintero, 1998), which facilitate efficient neuroreception, through separate mechanisms (Takami *et al.*, 1994; 1995).

The glandular component of the VNO provides mucus to the duct, which molecules of can diffuse through (Halpern and Martinez-Marcos, 2003). In the fox, few glands can be observed in the central and medium portion of the organ. These glands become progressively more numerous in caudal portions, where they concentrate in the medial parenchyma, indicating unequal glandular secretion production between the rostral and caudal sections of the organ.

The PAS and Alcian Blue stains allowed us to characterise the nature of the glandular secretions in the fox VNO, which were

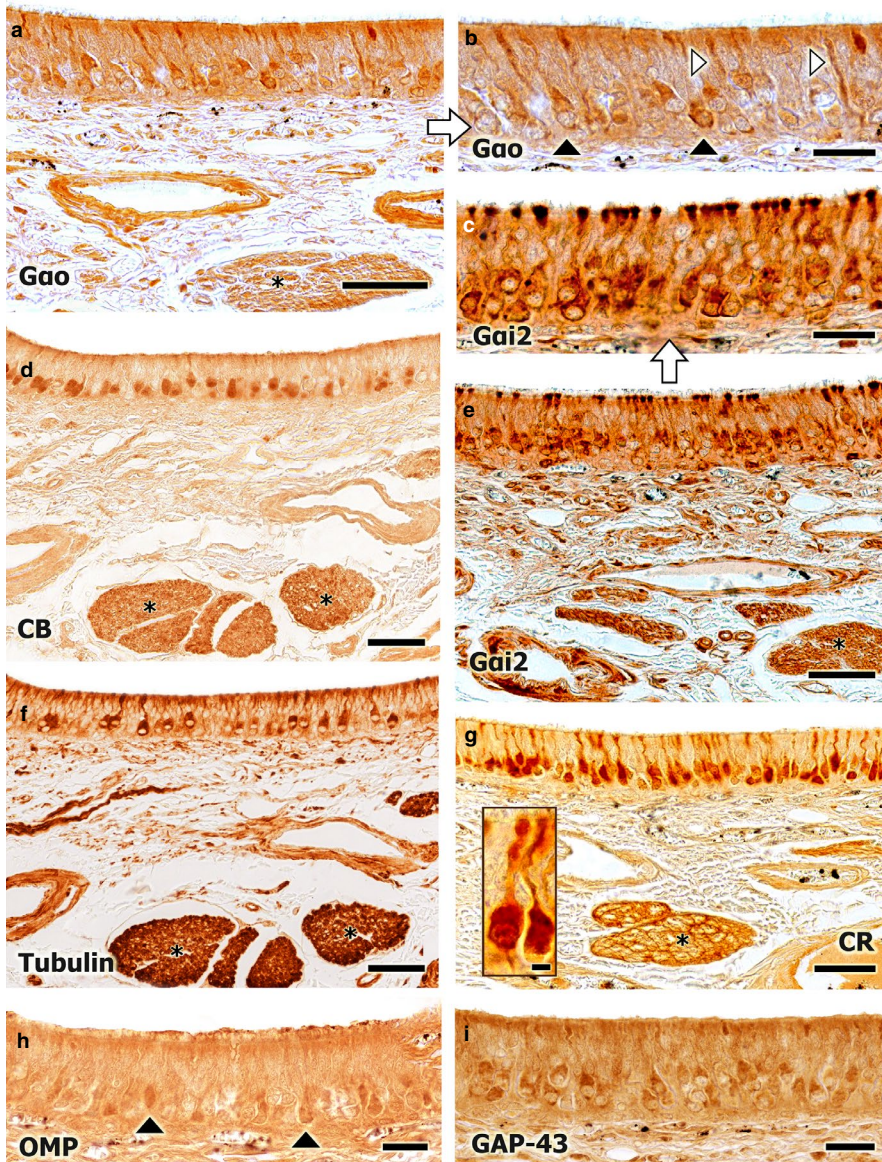


FIGURE 8 Immunohistochemical study of the fox VNO neuroepithelium. (a) Immunopositive labelling with an anti-G α o antibody. A subpopulation of neurons is labelled, with labelling concentrated in the soma (black arrowheads, b) and in the dendrites (white arrowheads, b). A similar pattern is observed for the anti-CB antibody (d). Widespread immunopositive labelling is observed for the anti-G α i2 antibody. All neuron components are strongly labelled: the soma, the terminal button, the axon, and the dendrites. The asterisks (d–g) indicate the vomeronasal nerve fascicles in the parenchyma (e, at higher magnification in c). This labelling pattern is similar to that observed for the anti-CR antibody (g, an immunopositive neuroreceptor cell is framed). (f) Immunopositive labelling for the anti- α -tubulin antibody, showing an intermediate pattern between those observed for the anti-G α o and anti-G α i2 antibodies. (h,i) Immunopositive labelling for the anti-OMP and anti-GAP-43 antibodies are shown, respectively. In comparison with the anti-OMP antibody, broader labelling is observed for the anti-GAP-43 antibody, which suggests the regenerative ability of the neuroepithelium. Scale bars: (a,d–g) 50 μ m, (b,c,h,i) 25 μ m

PAS-positive. Similarly, in the dog, Kondoh *et al.* (2020) observed that the glandular content is PAS-positive. However, in the fox, the glands were also AB-positive. The dual nature PAS- and AB-positive vomeronasal glands in the fox is remarkable. Kondoh *et al.* (2020) observed that the vomeronasal glands in almost all studied species in the Laurasiatheria clade have a double-acidic and neutral nature, except for Carnivora. However, these observations are somewhat controversial. In addition to our own observations in the fox, Tomiyasu *et al.* (2017) also found PAS- and AB-positive glands in the bear, whereas in the cat and in the dog, Salazar *et al.* (1996) and Kondoh *et al.* (2020), respectively, only identified PAS-positive glands.

These differences could be due to the region of the VNO studied, because most studies have only evaluated the central region of the VNO, where we have observed that the density of glandular tissue is much lower than in other regions. Further specific studies examining the nature of vomeronasal gland secretion in carnivores should help elucidate this issue.

Around the vomeronasal duct of the fox, many blood vessels were found in the parenchyma, both medially and laterally. In the dog, this disposition was similar (Adams and Wiekamp, 1984; Salazar *et al.*, 1984; 2013). The abundant vascularisation of the VNO reveals the importance of its erectile function and the relevance of the vomeronasal pump for the physiology of the system. This pump, as stated by Broman (1920) and Meredith and O'Connell (1979) and Meredith *et al.* (1980), is required to transport fluids inside the vomeronasal duct, renewing their mucous contents, which contain molecules received by the organ.

The VNO has a double innervation, composed of myelinated and unmyelinated fibres, the latter emerging from the convergence of neuroreceptor cell axons projecting from the medial sensory epithelium of the organ. These unmyelinated nerves occupy a dorso-medial arrangement in the parenchyma, similar to the arrangements observed in carnivores (Salazar *et al.*, 1996; 2013), ungulates (Salazar *et al.*, 1997), and the rabbit (Villamayor *et al.*, 2018). In the fox, the number and thickness of these nervous bundles are striking, given

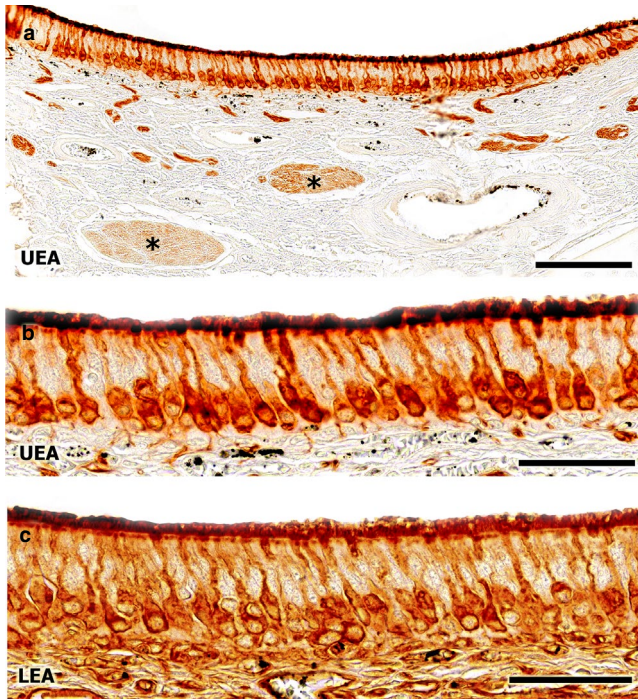


FIGURE 9 Lectin histochemical staining of the fox VNO. Both the neuroepithelium and the vomeronasal nerves (asterisk) show immunopositive labelling, with lectin UEA (a, at higher magnification in b) and with lectin LEA (c). Scale bars: (a) 250 μm , (b,c) 50 μm

the small size of the organ and the reduced thickness of the neuroepithelium in this species, suggesting that, despite its small size, the VNO has a large functionality.

4.3 | Immunohistochemical expression of G proteins alpha-subunits

Specific antibodies against the α -subunit of G_i and G_o proteins identified two different zones within the rat AOB (Shinohara *et al.*, 1992). Later, in 1995, Dulac and Axel genetically identified a family of possible pheromone receptors that were expressed in the rat VNO. Afterwards, a second type of vomeronasal receptor gene was identified (V2R) (Herrada and Dulac, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997). V1Rs and V2Rs on the neuroepithelium were apically and basally distributed, respectively. The $G\alpha_{i2}$ protein was thought to be expressed in the transduction cascade of V1Rs, whereas the $G\alpha_o$ protein co-expressed with V2Rs (Dulac and Axel, 1995; Herrada and Dulac, 1997; Matsunami and Buck, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997). In conclusion, $G\alpha_{i2}$ protein was associated to V1Rs and $G\alpha_o$ protein to V2R expression.

Afterwards, an examination of G protein expression and distribution in the goat VNS (Takigami *et al.*, 2000), showed, for the first time, that in some species, the $G\alpha_o$ pathway had disappeared, which was subsequently confirmed in different mammals, including Laurasiatheria and Primates (Suarez *et al.*, 2011). The few studies

regarding G protein expression in the VNS of Carnivora have been controversial. Dennis *et al.* (2003) observed immunopositive labelling in the neurosensory epithelium using both anti- $G\alpha_{i2}$ and anti- $G\alpha_o$ antibodies. Compared with the finding reported by Takigami *et al.* (2000) in the goat, Dennis *et al.* attributed this unexpected positiveness to an undesirable effect of the antigen retrieval procedure, a hypothesis that was supported by the subsequent study reported by Salazar *et al.* (2013), who observed, without applying antigen retrieval, immunonegative labelling when using the anti- $G\alpha_o$ antibody. Therefore, the observed immunopositivity against the $G\alpha_o$ protein observed in the fox VNO is striking and of utmost importance because it may be analogous to the immunopositivity observed in the dog by Dennis *et al.* (2003). Aware of the importance of this finding, and to confirm this result, we performed the immunochemical study of $G\alpha_o$ protein expression in the fox VNO using two different anti- $G\alpha_o$ antibodies and two different fixation techniques: formalin and Bf. Despite not performing any antigen retrieval procedures, immunopositivity against the $G\alpha_o$ protein persisted in all cases.

Although the immunohistochemical characterisation of $G\alpha_o$ has widely been considered an excellent phenotypic indicator of V2R expression in the VNO, we are aware that this conclusion is not well-supported by the currently available genomic studies, which assume that functional V2R genes have regressed in many groups of mammals, including carnivores, showing a high rate of pseudogenisation (Young and Trask, 2007). No specific information regarding the fox V2R genes exists, except for the recent first attempt to sequence and assemble the red fox genome, in which neither functional nor pseudogene V2R genes were reported (Kukekova *et al.*, 2018). However, the complete lack of V2R genes would represent a unique case among all mammals whose vomeronasal genes have been studied, as even primates, including humans, and all Laurasiatheria possess V2R pseudogenes. Even the dog, which is closely related to the fox, possesses nine V2R pseudogenes. It is likely that new sequencing studies performed in the fox, particularly those that are more focused on olfactory and vomeronasal genes, will result in the identification of additional genes, which can be added to the initially annotated repository of vomeronasal and olfactory genes that were detected using a whole-genome approach.

Translating sequencing studies into neuroanatomical terms is not always easy. A recent study on TRPC2 gene regression stated: 'The results of our present study invite more in-depth neuro-anatomical investigation in mammals for which VNO function remains equivocal' (Zhang and Nikaido, 2020). The high degree of pseudogenisation observed among vomeronasal receptors represents an unresolved issue which could explain the discrepancies observed between sequencing and neuroanatomical studies. For instance, an olfactory receptor gene containing a premature stop codon was found to encode a functional protein, due to efficient translational read-through (Prieto-Godino *et al.*, 2016). Transcriptomic studies have identified the expression of vomeronasal pseudogenes in the mouse VNO (Oboti *et al.*, 2015). In addition, the growing interest in the olfactory

effects of long noncoding RNA and their transcripts is likely to lead to a better understanding of the molecular processes underlying olfaction (Camargo *et al.*, 2019).

We cannot exclude the possibility that the $G\alpha_o$ protein is performing cell-to-cell contact functions in the fox neuroepithelium, unrelated to transduction. However, such a finding would represent the first instance of this function in the vomeronasal neuroepithelium of a mammal and does not fit the immunolabelling pattern detected in the fox VNO, which extends along the dendritic processes, the soma, and the axons that form the vomeronasal nerves. Instead, the immunolabelling pattern correlates with the typical pattern observed in those species in which both G proteins are involved in the transduction cascade (Halpern and Martinez-Marcos, 2003).

Our study reports a very specific finding, in the context of also being the first study to examine the VNO of the fox; therefore, further studies must be performed examining the expression of V2R family receptors, including immunohistochemistry studies and *in situ* hybridisation studies, to determine the expression patterns of these receptors. Moreover, the immunohistochemical study of the fox accessory olfactory bulb, which has not yet been described, could also clarify these issues.

When $G\alpha_i2$ and $G\alpha_o$ protein expression has been observed in rodents, such as the rat, two distinct zones were observed: an apical layer of neurosensory cells, which was immunopositive for anti- $G\alpha_i2$ antibodies, and a basal layer, which was immunopositive to anti- $G\alpha_o$ antibodies (Halpern *et al.*, 1998). In the fox, as in the rabbit (Villamayor *et al.*, 2018), two distinct interspersed patterns were observed for the immunopositivity of both $G\alpha$ proteins in the fox, which may be associated with two distinct subpopulations of neuroreceptor cells in the sensory epithelium of the VNO.

Although $G\alpha_o$ immunoreactivity is absent from the microvilli of the fox neurosensory epithelium, the pattern found in this study, comprising immunopositivity in the cellular soma, dendritic processes, and vomeronasal axons, is consistent with the pattern found in all species in which immunoreactivity has been associated with $G\alpha_o$ transduction. Among those species in which $G\alpha_o$ immunopositivity in the VNO has been excluded, immunolabelling is absent from dendrites, somas, and vomeronasal axons, as observed for the goat (Takigami *et al.*, 2000) and the cat (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2011).

The detection of immunolabelling in dendritic buttons and epithelial microvilli differs among studies, likely due to either variance in receptor density or to the sensitivity of the techniques used. Studies reported by Dennis *et al.* (2003) in the dog, by Jia and Halpern (1996) in the mouse, and by Villamayor *et al.* (2018) in the rabbit have shown that even when $G\alpha_o$ immunolabelling was clearly visible in the axons, somas, and dendrites, labelling was reduced in the dendritic buttons; however, overall $G\alpha_o$ marking was considered to be positive in all cases. The immunohistochemical identification of dendritic buttons and microvilli is, therefore, not consistent among species, unlike the labelling of dendritic processes, somas, and axons. Ultrastructural studies have confirmed that $G\alpha_o$ in neurons is primarily distributed to cell bodies and the neuronal cytoplasm, as demonstrated in the ultrastructural localisation study reported by Gabrion *et al.* (1989).

In VNO ultrastructural studies performed in rats, a species with a large family of V1R and V2R neuroreceptors, Matsuoka *et al.* (2001) reported immunolabelling in dendritic knobs and microvilli, but also observed that a fraction of receptor cells were not immunopositive for any G protein subtypes.

The presence of both $G\alpha_i2$ and $G\alpha_o$ proteins in the sensory epithelium of the fox VNO, in contrast to the reported expression of $G\alpha_i2$ protein alone in other carnivores such as the dog or the cat (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2011; Salazar *et al.*, 2013), raises new questions regarding the domestication process. The absence of $G\alpha_o$ protein expression in the VNS of domesticated animals, such as the goat (Takigami *et al.*, 2000), the sheep (Salazar *et al.*, 2007), the dog (Salazar *et al.*, 2013), and the cat (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2011), has been theorised to be attributable to the domestication process (Jeziński *et al.*, 2016), which may have caused an involution of the VNS. Indeed, the results of this study, showing the immunopositive labelling for the anti- $G\alpha_o$ antibody in the fox VNO, strengthens this theory, as the fox is a wild, non-domesticated animal.

4.4 | Other immunohistochemical and lectin histochemical markers

Additionally, the fox VNO was immunohistochemically studied using other complementary antibodies, such as anti-CB, anti-CR, anti-GAP-43, anti-OMP, and anti- α -tubulin antibodies, and histochemically examined using with *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA), and *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B₄) isolectin.

Anti-CB and anti-CR antibodies were used to characterise specific neuronal components, as they display distinct expression patterns in the VNS of each species (Kishimoto *et al.*, 1993; Jia and Halpern, 2003). In the fox, the anti-CB antibody showed a characteristic labelling pattern in the neurosensory epithelium, revealing a subpopulation of neuroreceptor cells, primarily in the basal portion of the epithelium, with concentrated labelling in the soma. This labelling pattern resembles that observed for the anti- $G\alpha_o$ antibody. Similarly, the anti-CR antibody displayed a labelling pattern that was complementary to that observed for the anti-CB antibody and similar to the pattern observed for the anti- $G\alpha_i2$ antibody. Similarly, the anti- α -tubulin antibody showed a unique labelling pattern, which evokes the patterns observed for the anti-CB and the anti- $G\alpha_o$ antibodies. Interestingly, CB and CR appear to be less ubiquitously expressed in the examined tissues than the G proteins, which are mediators of a wide spectrum of intracellular effects, including enzymes and ion channels (Wettschureck and Offermanns, 2005). Therefore, the CR and CB immunolabelling showed more defined patterns.

Additionally, immunolabelling was performed using the anti-GAP43 antibody, which detects GAP43, a protein expressed by neurons experiencing axon growth and synaptogenesis (Skene, 1989; Verhaagen *et al.*, 1989; Gispén *et al.*, 1992; Ramakers *et al.*, 1992). The GAP-43 immunopositive labelling observed in the fox

VNO is consistent with the immunopositive labelling previously observed by Dennis *et al.* (2003) in the dog. This labelling suggests that the VNS experiences intense neuronal regeneration, which may be due to the high level of VNO exposure to a variety of substances in the environment, many of which have the potential to damage cellular structures (Ogura *et al.*, 2010), indicating the importance of the VNS for reproductive behaviours (Osakada *et al.*, 2018) and, therefore, for the survival of the species.

To protect itself from exposure to harmful substances, the VNS possesses a regulatory system that can modulate access to these substances, based on the presence of solitary chemosensory cells (CSSs) in the respiratory tract. These specialised cells are situated at an appropriate location to detect chemical substances in the environment that are able to access the VNO. CSSs are generally innervated by the trigeminal nerve and respond to a variety of irritants and bitter substances. These CSSs play key roles in the regulation of VNO access, limiting the entrance of these potentially harmful molecules (Ogura *et al.*, 2010).

Braun *et al.* (2011) described these CSSs as expressing G-protein coupled receptors and found these cells to be present in the human nose. In our study in the fox, the positive detection of G-protein receptors was confirmed using the anti-G α antibody to immunolabel cells in the respiratory epithelia of both the VNO and the respiratory mucosa. Additionally, Gallego's Trichome stain was performed in these epithelia, which provided information regarding the morphology of these anti-G α -positive cells. The morphology, immunoreactivity, and location of the cells observed in the fox epithelia generally coincide with those described by Ogura *et al.* (2010) and Braun *et al.* (2011).

By employing the anti-OMP antibody, we specifically labelled OMP proteins, which are expressed in mature neurons in both the MOS and the VNS (Farbman and Margolis, 1980; Rodewald *et al.*, 2016). The information provided by this marker complements the information obtained using the anti-GAP43 antibody. Like other markers, OMP has been extensively used in the literature to study the VNS (Halpern *et al.*, 1998), showing immunopositive labelling for both the MOS and the VNS in different species, such as the rat (Weiler and Benali, 2005) or the mouse (Monti Graziadei *et al.*, 1977).

The UEA pattern observed in the fox was similar to that observed in the dog (Salazar *et al.*, 2013). In the nervous system of the dog, the UEA labelling is specific to the VNS (Salazar *et al.*, 1992). We observed a similar specificity in the fox, confirmed by the labelling of both the neuroepithelium and the nerves. UEA is a marker for the α -fucose pathway (Kondoh *et al.*, 2017). In contrast, LEA displays a non-specific labelling pattern in the vomeronasal epithelium, labelling other components of the olfactory pathway, including olfactory nerves and the olfactory mucosa. This observation is consistent with the study performed on the VNO of the dog (Salazar *et al.*, 2013).

The findings presented in this study highlight the importance of chemical communication in the fox and the subtle, but significant, differences between the VNO structures of the fox and the dog.

These two closely related species only diverged approximately 10 million years ago, within the Canidae family. However, they occupy two substantially different ecological niches. Kukekova *et al.* (2018) suggested that the red fox may be an extraordinarily promising model for the study of the genetic foundations involved in social behaviours, domestication, genetics, and human behaviours.

The differences in the VNS between the fox and the dog suggested that domestication, beyond resulting in behavioural changes, may directly influence certain morphofunctional features discussed in this study, such as the double expression of G α i2 and G α o proteins.

After the exhaustive anatomical and morphofunctional description presented here, we can conclude that the fox has a well-developed VNO, with all components necessary to assess the reception and recognition of pheromones and other chemical cues involved in chemical communication. Further anatomical studies, however, are necessary to better characterise the VNS in this species and to address the unforeseen outcome of this study. Specifically, future studies should address the results regarding G protein expression patterns and be extended to the AOB and the vomeronasal amygdala.

ACKNOWLEDGEMENTS

The red foxes used in this study were provided by the Wildlife Recovery Centres of Galicia, Dirección Xeral de Patrimonio Natural (Xunta de Galicia, Spain) and by Federación Galega de Caza. Special thanks to Jennifer Ríos Caamaño for her dedication and accuracy in her drawing of the VNO topography.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.S.Q. and I.O.L. designed the research and wrote the paper. P.S.Q., I.O.L., P.V., M.T., and A.L.B performed the work, and analysed and discussed the results.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors.

ORCID

Pablo Sanchez-Quintero  <https://orcid.org/0000-0002-9891-4817>

REFERENCES

- Adams, D.R. and Wiekamp, M.D. (1984) The canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy*, 138, 771–787.
- Barrios, A.W., Sánchez-Quintero, P. and Salazar, I. (2014) Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 106.
- Bhatnagar, K.P. and Meisami, E. (1998) Vomeronasal organ in bats and primates: extremes of structural variability and its phylogenetic implications. *Microscopy Research and Technique*, 43, 465–475.
- Braun, T., Mack, B. and Kramer, M.F. (2011) Solitary chemosensory cells in the respiratory and vomeronasal epithelium of the human nose: a pilot study. *Rhinology*, 49, 507–512.
- Brechbühl, J., Moine, F., Klaey, M., Nenniger-Tosato, M., Hurni, N., Sporkert, F. *et al.* (2013) Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 4762–4767.
- Broman, I. (1920) Das Organ vomeronasale ein Wassergeruchorgan. *Anatomy Wiesbaden*, 137–191.
- Camargo, A.P., Nakahara, T.S., Firmino, L.E.R., Netto, P.H.M., do Nascimento, J.B.P., Donnard, E.R. et al. (2019) Uncovering the mouse olfactory long non-coding transcriptome with a novel machine-learning model. *DNA Research*, 26, 365–378.
- Cavallini, P. and Santini, S. (1996) Reproduction of the red fox *Vulpes vulpes* in Central Italy. *Annales Zoologici Fennici*, 33, 267–274.
- De Miguel, F.J., Marques, I.J. and Monclús, R. (2005) Respuesta de los zorros (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) al olor de otros carnívoros. *Galemys*, 17, 113–121.
- Del Cerro, M.C.R. (1998) Role of the vomeronasal input in maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 905–926.
- Dennis, J.C., Allgier, J.G., Desouza, L.S., Eward, W.C. and Morrison, E.E. (2003) Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy*, 202, 515–524.
- Dennis, J.C., Stilwell, N.K., Smith, T.D., Park, T.J., Bhatnagar, K.P. and Morrison, E.E. (2020) Is the mole rat vomeronasal organ functional? *Anatomical Record*, 303, 318–329.
- Dulac, C. and Axel, R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 83, 195–206.
- Estes, R.D. (1972) The role of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Mammalia*, 36, 316–319.
- Farbman, A.I. and Margolis, F.L. (1980) Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Developmental Biology*, 74, 205–215.
- Gabrien, J., Brabet, P., Nguyen Than Dao, B., Homburger, V., Dumuis, A., Sebben, M. et al. (1989) Ultrastructural localization of the GTP-binding protein Go in neurons. *Cellular Signalling*, 1, 107–123.
- Gentle, M.N. (2005) *Factors affecting the efficiency of fox (Vulpes vulpes) baiting practices on the central tablelands of new south wales*. Thesis, School of Biological Sciences, University of Sydney. <https://ses.libra.ry.usyd.edu.au/handle/2123/890>
- Gispén, W.H., Nielander, H.B., De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., Schrama, L.H. and Schotman, P. (1992) Role of the growth-associated protein B-50/GAP-43 in neuronal plasticity. *Molecular Neurobiology*, 5, 61–85.
- González, R., Levy, F., Orgeur, P., Poindron, P. and Signoret, J.P. (1991) Female effect in sheep. II. Role of volatile substances from the sexually receptive female; implication of the sense of smell. *Reproduction, Nutrition, Development*, 31, 103–109.
- Grus, W.E. and Zhang, J. (2004) Rapid turnover and species-specificity of vomeronasal pheromone receptor genes in mice and rats. *Gene*, 340, 303–312.
- Grus, W.E. and Zhang, J. (2008) Distinct evolutionary patterns between chemoreceptors of 2 vertebrate olfactory systems and the differential tuning hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1593–1601.
- Halpern, M., Shapiro, L.S. and Jia, C. (1998) Heterogeneity in the accessory olfactory system. *Chemical Senses*, 23, 477–481.
- Halpern, M. and Martínez-Marcos, A. (2003) Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*, 70, 245–318.
- Herrada, G. and Dulac, C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*, 90, 763–773.
- Holy, T.E. (2018) The accessory olfactory system: innately specialized or microcosm of mammalian circuitry? *Annual Review of Neuroscience*, 41, 501–525.
- Iovino, M., Messina, T., Iovino, E., et al. (2019) Neuroendocrine Mechanisms Involved in Male Sexual and Emotional Behavior. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 19, 472–480.
- Jeziński, T., Ensminger, J. and Papet, L.E. (2016) *Canine olfaction science and law. Advances in Forensic Science, Medicine, Conservation, and Environmental Remediation*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis.
- Jia, C. and 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 Research*, 719, 117–128.
- Jia, C. and Halpern, M. (2003) Calbindin D28K immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. *Brain Research*, 977, 261–269.
- Karimi, H., Hassanzadeh, B. and Razmaraii, N. (2016) Structure of vomeronasal organ (Jacobson) in the male red fox (*Vulpes vulpes*). *Anatomical Science*, 13, 47–54.
- Kishimoto, J., Keverne, E.B. and Emson, P.C. (1993) Calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons. *Brain Research*, 610, 325–329.
- Kondoh, D., Kamikawa, A., Sasaki, M. and Kitamura, N. (2017) Localization of α 1-2 fucose glycan in the mouse olfactory pathway. *Cells Tissues Organs*, 203, 20–28.
- Kondoh, D., Tomiyasu, J., Itakura, R., Sugahara, M., Yanagawa, M. and Watanabe, K. et al. (2020) Comparative histological studies on properties of polysaccharides secreted by vomeronasal glands of dogs, minks, cattle, goats, deer, musk shrews and bats. *Acta Histochemica*, 122, 151515. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151515>
- Kukekova, A., Johnson, J., Xiang, X., Feng, S., Liu, S., Rando, H.M. et al. (2018) Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nature Ecology & Evolution*, 2, 1479–1491.
- Luckhaus, G. (1969) Licht- und elektronenmikroskopische Befunde an der Lamina epithelialis des Vomeronasalorgans vom Kaninchen. *Anatomischer Anzeiger*, 124, 477–489.
- Luo, M. and Katz, L.C. (2004) Encoding pheromonal signals in the mammalian vomeronasal system. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 428–434.
- Matsunami, H. and Buck, L.B. (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 90, 775–784.
- Matsuoka, M., Yoshida-Matsuoka, J., Iwasaki, N., Norita, M., Costanzo, R.M. and Ichikawa, M. (2001) Immunocytochemical study of G(i)2alpha and G(o)alpha on the epithelium surface of the rat vomeronasal organ. *Chemical Senses*, 26, 161–166.
- McLean, S., Davies, N.W. and Nichols, D.S. (2019) Scent chemicals of the tail gland of the Red Fox, *Vulpes vulpes*. *Chemical Senses*, 44, 215–224.
- Meisami, E. and Bhatnagar, K.P. (1998) Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique*, 43, 476–499.
- Meredith, M., Marques, D.M. and O'Connell, R.J. (1980) Vomeronasal pump: significance for male hamster. *Sexual Behaviour Science*, 207, 1224–1226.
- Meredith, M. and O'Connell, R.J. (1979) Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *Journal of Physiology*, 286, 301–316.
- Monti Graziadei, G.A., Margolis, F.L., Harding, J.W. and Graziadei, P.P. (1977) Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 25, 1311–1316.
- Moran, D.T., Rowley, J.C. 3rd, Jafek, B.W. and Lovell, M.A. (1982) The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology*, 11, 721–746.
- Nakajima, T., Sakaue, M., Kato, M., Saito, S., Ogawa, K. and Taniguchi, K. (1998) Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on the accessory olfactory bulb of the dog. *Anatomical Record*, 252, 393–402.
- Oboti, L., Ibarra-Soria, X., Pérez-Gómez, A., Schmid, A., Pyrski, M., Paschek, N. et al. (2015) Pregnancy and estrogen enhance neural progenitor-cell proliferation in the vomeronasal sensory epithelium. *BMC Biology*, 13, 104.

- Ogura, T., Krosnowski, K., Zhang, L., Bekkerman, M. and Lin, W. (2010) Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PLoS One*, 5, e11924.
- Oikawa, T., Shimamura, K., Saito, T.R. and Taniguchi, K. (1994) Fine structure of the vomeronasal organ in the Chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Experimental Animals*, 43, 487–497.
- Ortiz-Hidalgo, C. (2011) Abelardo Gallego (1879–1930) and his contributions to histotechnology: the Gallego stains. *Acta Histochemica*, 113, 189–193.
- Osakada, T., Ishii, K.K., Mori, H., Eguchi, R., Ferrero, D.M., Yoshihara, Y. et al. (2018) Sexual rejection via a vomeronasal receptor-triggered limbic circuit. *Nature Communications*, 9, 1–15.
- Over, R., Cohen-Tannoudji, J., Dehnhard, M., Claus, R. and Signoret, J.P. (1990) Effect of pheromones from male goats on LH-secretion in anoestrous ewes. *Physiology & Behavior*, 48, 665–668.
- Prieto-Godino, L.L., Rytz, R., Bargeton, B., Abuin, L., Arguello, J.R., Peraro, M.D. et al. (2016) Olfactory receptor pseudo-pseudogenes. *Nature*, 539, 93–97.
- Ramakers, G.J., Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Margolis, F.I., Van Bergen En Henegouwen, P.M.P. and Gispén, W.H. (1992) Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in the mouse olfactory bulb: predominant presence in preterminal axons. *Journal of Neurocytology*, 21, 853–869.
- Reep, R.L., Finlay, B.L. and Darlington, R.B. (2007) The limbic system in mammalian brain evolution. *Brain, Behavior and Evolution*, 70, 57–70.
- Rekwot, P.I., Ogwu, D., Ovedipe, E.O. and Sekoni, V.O. (2001) The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 65, 157–170.
- Rodewald, A., Gisder, D., Gebhart, V.M., Oehring, H. and Jirikowski, G.F. (2016) Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 77, 19–23.
- Rodríguez, I., Greer, C.A., Mok, M.Y. and Mombaerts, P. (2000) A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nature Genetics*, 26, 18–19.
- Ryba, N.P.N. and Tirindelli, R. (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron*, 19, 371–379.
- Salazar, I., Barber, P.C. and Cifuentes, J.M. (1992) Anatomical and immunohistological demonstration of the primary neural connections of the vomeronasal organ in the dog. *Anatomical Record*, 233, 309–313.
- Salazar, I., Cifuentes, J.M. and Sánchez-Quinteiro, P. (2013) Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *Anatomical Record*, 296, 146–155.
- Salazar, I., Rueda, A. and Cifuentes, J.M. (1984) Anatomy of the vomeronasal organ in the dog. *Folia Morphologica*, 32, 331–341.
- Salazar, I. and Sánchez-Quinteiro, P. (1998) Supporting tissue and vasculature of the mammalian vomeronasal organ: the rat as a model. *Microscopy Research and Technique*, 41, 492–505.
- Salazar, I. and Sánchez-Quinteiro, P. (2003) Differential development of binding sites for four lectins in the vomeronasal system of juvenile mouse: from the sensory transduction site to the first relay stage. *Brain Research*, 979, 15–26.
- Salazar, I. and Sánchez-Quinteiro, P. (2009) The risk of extrapolation in neuroanatomy: The case of the mammalian vomeronasal system. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3, 22.
- Salazar, I. and Sánchez-Quinteiro, P. (2011) A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microscopy Research and Technique*, 74, 1109–1120.
- Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Alemañ, N., Cifuentes, J.M. and Troconiz, P.F. (2007) Diversity of the vomeronasal system in mammals: the singularities of the sheep model. *Microscopy Research and Technique*, 70, 752–762.
- Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P. and Cifuentes, J.M. (1995) Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, 177, 475–481.
- Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P. and Cifuentes, J.M. (1997) The soft-tissue components of the vomeronasal organ in pigs, cows and horses. *Anatomia Histologia and Embryologia*, 26, 179–186.
- Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Cifuentes, J.M., Garcia Caballero, T. (1996) The vomeronasal organ of the cat. *Journal of Anatomy*, 188, 445–454.
- Sam, M., Vora, S., Malnic, B., Ma, W., Novotny, M.V. and Buck, L.B. (2001) Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature*, 412, 142.
- Shapiro, L.S., Halpern, M. and Ee, P.-L. (1995) Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in opossum chemosensory systems during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. *Journal of Morphology*, 224, 331–349.
- Shinohara, H., Asano, T. and Kato, K. (1992) Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. *Journal of Neuroscience*, 12, 1275–1279.
- Signoret, J.P. (1991) Sexual pheromones in the domestic sheep: importance and limits in the regulation of reproductive physiology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 639–645.
- Skene, J.H.P. (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annual Review of Neuroscience*, 12, 127–156.
- Suarez, R., Fernandez-Aburto, P., Manger, P.R. and Mpodozis, J. (2011) Deterioration of the Gαo vomeronasal pathway in sexually dimorphic mammals. *PLoS One*, 6, e26436.
- Swaney, W.T. and Keverne, E.B. (2009) The evolution of pheromonal communication. *Behavioral Brain Research*, 200, 239–247.
- Takami, S., Getchell, M.L. and Getchell, T.V. (1994) Lectin histochemical localization of galactose, N-acetylgalactosamine, and N-acetylglucosamine in glycoconjugates of the rat vomeronasal organ, with comparison to the olfactory and septal mucosae. *Cell and Tissue Research*, 277, 211–230.
- Takami, S., Getchell, M.L. and Getchell, T.V. (1995) Resolution of sensory and mucoid glycoconjugates with terminal alpha-galactose residues in the mucicovillous complex of the vomeronasal sensory epithelium by dual confocal laser scanning microscopy. *Cell and Tissue Research*, 280, 211–216.
- Takigami, S., Mori, Y. and Ichikawa, M. (2000) Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chemical Senses*, 25, 387–393.
- Tomiyasu, J., Kondoh, D., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Sasaki, M., Kitamura, N. et al. (2017) Morphological and histological features of the vomeronasal organ in the brown bear. *Journal of Anatomy*, 231, 749–757.
- Trinh, K. and Storm, D.R. (2003) Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature Neuroscience*, 6, 519–525.
- Vacarezza, O.L., Sepich, L.N. and Tramezzani, J.H. (1981) The vomeronasal organ of the rat. *Journal of Anatomy*, 132, 167–185.
- Villamayor, P.R., Cifuentes, J.M., Fdz-de-Troconiz, P. and Sanchez-Quinteiro, P. (2018) Morphological and immunohistochemical study of the rabbit vomeronasal organ. *Journal of Anatomy*, 233, 814–827.
- Villamayor, P.R., Cifuentes, J.M., Quintela, L., Barcia, R. and Sanchez-Quinteiro, P. (2020) Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Structure and Function*, 225, 203–226.
- Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Gispén, W.H. and Margolis, F.I. (1989) The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *Journal of Neuroscience*, 9, 683–691.
- Weiler, E. and Benali, A. (2005) Olfactory epithelia differentially express neuronal markers. *Journal of Neurocytology*, 34, 217–240.
- Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews*, 85, 1159–1204.
- Wöhrmann-Repenning, A. (1984) Comparative anatomical studies of the vomeronasal complex and the rostral palate of various mammals. *Anatomischer Anzeiger*, 157, 137–149.

- Wysocki, C.J. (1979) Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 3, 301–341.
- Young, J.M. and Trask, B.J. (2007) V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends in Genetics*, 23, 212–215.
- Zhang, Z. and Nikaido, M. (2020) Inactivation of ancV1R as a predictive signature for the loss of vomeronasal system in mammals. *Genome Biology and Evolution*, <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa082>
- Zuri, I., Fishelson, L. and Terkel, J. (1998) Morphology and cytology of the nasal cavity and vomeronasal organ in juvenile and adult blind mole rats (*Spalax ehrenbergi*). *Anatomical Record*, 251, 460–471.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Ortiz-Leall, Torres MV, Villamayor PR, López-Beceiro A, Sanchez-Quinteiro P. The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *J Anat.* 2020;237:890–906. <https://doi.org/10.1111/joa.13254>

4.2 PUBLICACIÓN NÚMERO 2

Ortiz-Leal I, Torres MV, Villamayor PR, Fidalgo LE, López-Beceiro A, Sanchez-Quinteiro P. Can domestication shape Canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Annals of Anatomy*. 240:151881 (2022).

doi: 10.1016/j.aanat.2021.151881

Revista: Annals of Anatomy

Año de publicación: 2022

Editorial: Elsevier GmbH

ISSN: 0940-9602

Citas en Google Scholar: 11

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2020): 2.2

Factor de impacto de 5 años (2020): 2.3

Categoría (2022):

Anatomy & Morphology Q2 (6/22)

Contribución del doctorando: I. O. L. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.

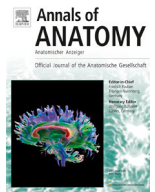
Autorización de la revista/editorial: El artículo tiene una licencia de uso “Creative Commons CC-BY-NC-ND”, lo que indica que se puede utilizar el contenido del artículo sin fines comerciales y sin alterar o modificar el mismo. La revista indica que los autores del artículo tienen el derecho a utilizar la totalidad del mismo en una tesis doctoral.

<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151881>

0940-9602/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier GmbH.

CC_BY_NC_ND_4.0





Research article

Can domestication shape Canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point



Irene Ortiz-Leal¹, Mateo V. Torres¹, Paula R. Villamayor, Luis Eusebio Fidalgo, Ana López-Beceiro, Pablo Sanchez-Quinteiro*

Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2021

Received in revised form 2 December 2021

Accepted 3 December 2021

Available online 9 December 2021

Keywords:

Vomeronasal system

Accessory olfactory bulb

Fox

Canidae

Immunohistochemistry

Lectins

UEA

G proteins

ABSTRACT

Background: The accessory olfactory bulb (AOB) is the first integrative center of the vomeronasal system (VNS), and the general macroscopic, microscopic, and neurochemical organizational patterns of the AOB differ fundamentally among species. Therefore, the low degree of differentiation observed for the dog AOB is surprising. As the artificial selection pressure exerted on domestic dogs has been suggested to play a key role in the involution of the dog VNS, a wild canid, such as the fox, represents a useful model for studying the hypothetical effects of domestication on the AOB morphology.

Methods: A comprehensive histological, lectin-histochemical, and immunohistochemical study of the fox AOB was performed. Anti-Gαo and anti-Gαi2 antibodies were particularly useful, as they label the transduction cascade of the vomeronasal receptor types 1 (V1R) and 2 (V2R), respectively. Other employed antibodies included those against proteins such as microtubule-associated protein 2 (MAP-2), tubulin, glial fibrillary acidic protein, growth-associated protein 43 (GAP-43), olfactory marker protein (OMP), calbindin, and calretinin.

Results: The cytoarchitecture of the fox AOB showed a clear lamination, with neatly differentiated layers; a highly developed glomerular layer, rich in periglomerular cells; and large inner cell and granular layers. The immunolabeling of Gαi2, OMP, and GAP-43 delineated the outer layers, whereas Gαo and MAP-2 immunolabeling defined the inner layers. MAP-2 characterized the somas of AOB principal cells and their dendritic trees. Anti-calbindin and anti-calretinin antibodies discriminated neural subpopulations in both the mitral-plexiform layer and the granular cell layer, and the lectin *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) showed selectivity for the AOB and the vomeronasal nerves.

Conclusion: The fox AOB presents unique characteristics and a higher degree of morphological development compared with the dog AOB. The comparatively complex neural basis for semiochemical information processing in the fox compared with that observed in dogs suggests loss of AOB anatomical complexity during the evolutionary history of dogs and opens a new avenue of research for studying the effects of domestication on brain structures.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier GmbH.
CC_BY_NC_ND_4.0

1. Introduction

Animals have acquired complex chemical communication systems through evolution, enabling them to interact with the external environment, recognize a large variety of chemical cues and translate these cues into sensory information (Wyatt, 2003). Olfaction

involves two primary systems: the main olfactory system (MOS) and the less studied accessory olfactory system, also known as the vomeronasal system (VNS) (Jeziński et al., 2016; McLean et al., 2021). The VNS is essential for animal well-being, providing fundamental information used in predator detection (Papes et al., 2010), maternal recognition (Del Cerro, 1998) and non-conscious sexual and social behaviors (Clancy et al., 1984; Martínez-Ricós et al., 2008; Pardo-Bellver et al., 2017; Pallé et al., 2020). The VNS is comprised of the vomeronasal organ (VNO), a tubular sensory structure; the accessory olfactory bulb (AOB), the first integration system of the VNS pathway; and the vomeronasal amygdala (Holy, 2018). Vomeronasal nerves connect the VNO with the AOB, providing functionality

* Correspondence to: Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain.

E-mail address: pablo.sanchez@usc.es (P. Sanchez-Quinteiro).

¹ I.O.L. and M.V.T. are joint first authors.

(Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2009). In contrast with the conscious response generated in the MOS, the VNS is only connected to limbic system centers and specific regions of the hypothalamus and it is not known to be associated with any higher cognitive structures of the brain (Halpern, 1987; Gutiérrez-Castellanos et al., 2014). Therefore, the VNS is not thought to result in the conscious perception of the detected chemical molecules.

Despite the anatomical proximity between these two olfactory systems, these systems have historically been viewed as independent, with large morphofunctional differences, suggesting independent evolutionary pathways (Wysocki, 1979; Halpern and Martínez-Marcos, 2003; Barrios et al., 2014). Differences can be observed across physiological, behavioral, and morphofunctional aspects between these two systems, especially the morphofunctional diversity observed for the VNS among mammal families (Meisami and Bhatnagar, 1998; Salazar et al., 2007; Torres et al., 2020). Therefore, the interspecies extrapolation of anatomical and histological information for the VNS can be difficult and result in imprecise information (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2009).

Despite the large degree of diversity found in the VNS, the VNO presents a common, general morphological pattern across species within Mammalia. In the AOB, however, fundamental differences in the general macroscopic, microscopic, and neurochemical organizational patterns have been reported between species (Frahm and Bhatnagar, 1980; Switzer et al., 1980; Meisami and Bhatnagar, 1998). For example, the degree of differentiation in the AOB differs widely within the Carnivora order, even when comparing families that are closely related. The cat (*Felis silvestris catus*) and the dog (*Canis lupus familiaris*) present two very different degrees of differentiation. The cat AOB is well developed and presents clearly defined layers within the AOB (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2011). However, the dog presents a surprisingly low degree of differentiation (Salazar et al., 1994 and 2013; Nakajima et al., 1998), which has long been a point of open discussion, given the well-known roles played by pheromonal chemosensory and the highly social behaviors observed in this species (Pageat and Gaultier, 2003; Kaminski and Marshall-Pescini, 2014). Ramón y Cajal (1902) concluded that dogs did not present a structure that could be defined as the AOB. Several decades later, Jawlowski (1956) and Miodonski (1968) identified a presumptive AOB in canids through the examination of histological sections. Although these studies were not conclusive, and only included drawings, and not pictures, their descriptions correspond with the description given by Salazar et al. (1992), who characterized the dog AOB using lectin-histochemical studies and verified the direct connection between the AOB and the vomeronasal nerves and VNO, demonstrating its unequivocal presence for the first time. The existence of the AOB in dogs was later confirmed by Nakajima et al. in 1998.

The artificial selection pressure exerted on domestic dogs has been suggested to play a key role in the involution of its olfactory and vomeronasal systems. However, whether this involution is due to domestication or whether a poorly developed VNS occurs independently of domestication remains unclear. The examination of phylogenetic ancestors of the dog, such as the wolf, or the study of other wild canids, such as the fox, is necessary to determine whether poor differentiation is specific to dogs. Although the wolf would be the ideal comparative model for studying the effects of domestication on the VNS in the dog, given their phylogenetic proximity (Skoglund et al., 2015), no studies have been reported examining the VNS in the wolf, and the availability of wolf samples in good condition for these studies is very low. The fox is a convenient and useful model for the morphofunctional study of the AOB of wild canids, given the phylogenetic proximity between the fox (*Vulpes vulpes*) and the dog (*Canis familiaris*), which diverged only 10 million years ago from a common ancestor (Graphodatsky et al., 2008), making these species good candidates for the study of

domestication. The studies reported by Kukekova et al. (2014); Wang et al. (2018) in foxes selected for tame behavior have led to the hypothesis that the domesticated behaviors observed in dogs and foxes may have similar genetic bases, making the fox an excellent model for studying the genetics of domestication in canids.

For this reason, we have approached this issue by examining a wild canid, the red fox (*Vulpes vulpes*), for which only the VNO component of the primary vomeronasal system has been characterized (Ortiz-Leal et al., 2020), identifying in this study specific and noticeable differences in the VNS of the fox compared with that of the dog. Specifically, both anti-G α and anti-G α 2 subunits were positively immunolabeled in the VNO epithelium of the fox. In most Rodentia family species, which have historically been used as a reference for VNO studies in mammals (Salazar et al., 2013), the neuroepithelium of the VNO expresses two distinct G proteins: G α 2, found in the apical neurosensory layer, associated with the expression of type 1 vomeronasal receptor families (V1R), and in neurons that project to the anterior region of the AOB (Berghard and Buck, 1996); and G α protein, complementarily expressed in the basal portion of the neurosensory neuroepithelium, associated to the expression of type 2 vomeronasal receptor families (V2R), and in neurons that project to the posterior region of the AOB (Herrada and Dulac, 1997; Matsunami and Buck, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997). The immunopositive characterization of both G α 2 and G α have been considered excellent phenotypic indicators of V1R and V2R expression in the VNO. However, in other mammals, such as goat (Takigami et al., 2000), sheep (Salazar et al., 2007), dogs (Salazar et al., 2013), and cats (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2011), this differential expression of G proteins has not been observed in either the VNO or the AOB, with the exception of the fox, in which the expression of both G α 2 and G α subunits in the neurosensory epithelium of the VNO was recently identified by our group (Ortiz-Leal et al., 2020). The extended study of G α 2 and G α subunit expression in the fox AOB is, therefore, of great interest.

The aim of the present study was to describe the general features of the fox AOB at both macroscopic and microscopic levels and widen the morphofunctional understanding of the fox AOB, with a focus on positive immunolabeling for anti-G α found in the VNO by Ortiz-Leal et al. (2020). A variety of tissue dissection and microdissection techniques, general and specific histological stainings, lectin-histochemical and immunohistochemical labeling techniques were employed.

2. Methods

2.1. Samples

5 foxes were used for this study, supplied from hunting activities organized by the Galician Hunting Federation, with the necessary permissions by the Galician Environment, Territory and Tenement Council. The animals were obtained in the field, the same day of their shot, with a maximum of two hours delay, and immediately transported to the premises of the Veterinary Faculty of Lugo, where the whole olfactory bulbs of all foxes were extracted with the help of an electric plaster cutter and a gouge clamp and conserved in either 10% formalin or Bouin's fixative (Bf). Details of the foxes processed, and fixatives used are included in Table 1.

Afterwards, the olfactory bulbs were embedded in paraffin wax and serially cut by a microtome either horizontally or in a sagittal plane along its entire length with a thickness of 6–7 μ m. Sample sections were stained using haematoxylin-eosin, Nissl, Tolivia and Bielschowsky stains, and lectin histochemical and immunohistochemical techniques.

In one of the individuals, a topographic histological study was conducted on the olfactory bulbs and the olfactory and vomeronasal nerves located in the ethmoidal fossa. After removing the skin,

Table 1
Summary of the foxes, description and fixative used.

Fox	Description	Fixative
Z1	♀ Adult	Bouin's
Z2	♂ Elderly	Bouin's
Z3	♂ Adult	Bouin's
Z5	♂ Young	Formalin
Z7	♀ Young	Bouin's

superficial muscles, mandible, and eyeballs, two transverse cuts were made using a rotary saw to completely delimit the orbital region. The obtained sample was decalcified by immersion in a decalcifying solution (Shandon TBD-1 Decalcifier, ThermoFisher, Pittsburgh, PA) for 8 days at room temperature with continuous stirring. Transverse sections were performed with a microtome blade to obtain 1-cm-thick sections that included the medial surface of the olfactory bulbs and the surrounding ethmoidal turbinates. These samples were washed in running water for 2 h, paraffin embedded, and serially cut into 6- μ m-thick sections, which were collected on large microscope slides (76 × 52 mm). Immunohistochemical procedures, including anti-G α 2, anti-G α o, and LEA lectin histochemical labeling, were performed the following day on three consecutive sections.

Additionally, for the purposes of performing a comparative assessment of the structural differences between the accessory olfactory bulbs in the dog and fox, we processed olfactory bulb samples from two dog brains obtained from the brain collection of the Unit of Anatomy of the Faculty of Veterinary Sciences of Lugo. Both samples were obtained from adult individuals with no evidence of neurological symptoms or lesions. The samples were fixed and processed in an identical manner as the fox samples and were stained with Nissl and Tolivia stains and immunohistochemically labeled with anti-G α o antibody.

2.2. Tolivia protocol

Sections were deparaffinized and hydrated. Then, sections were mordanted for 1 h in 2.5% (SO₄)₂FeNH₄, then washed for 1 min in distilled water. Myelin staining was achieved after 2.5 h immersion in a freshly made solution: 50 ml of 50% ethanol to which 5 ml of 20% hematoxylin and 10 ml of 1% Li₂CO₃ was added. Sections were then washed for 3 × 5 min prior to staining for 5 min in the following solution: 0.2% pyronine and 20% formaldehyde. The slides were finally dehydrated, cleared and mounted (Tolivia et al., 1988).

2.3. Bielschowsky's silver stain protocol

Slides were deparaffinized and hydrated, then stained in 20% silver nitrate (AgNO₃) in the dark at 37 °C for 30 min and washed in distilled water for 2 × 5 min. Concentrated ammonia was slowly added to the AgNO₃ solution to dissolve the precipitate formed. Then, slides were introduced in this solution for 15 min at 37 °C in the dark, and posteriorly washed in 2 × 10 min 0.1% ammonia washes. A developer solution (20 ml 10% formaldehyde, 0.5 g citric acid and 2 drops of nitric acid in 100 ml distilled water) was added to the silver solution. Slides were then washed in the solution for 10 min, washed again in ammonia and submerged in 5% sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃) for 1 min. Finally, samples were washed in distilled water, dehydrated, cleared and mounted.

2.4. Lectin histochemistry staining

Three different lectins were used: *Ulex europaeus* agglutinin I UEA-I, which specifically labels the VNS pathway in several species, including the dog (Salazar et al., 1992); *Lycopersicon esculentum*

agglutinin (LEA), which labels both the main and accessory olfactory systems (Salazar et al., 2019); and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B₄ (BSI-B₄), which specifically labels the VNS pathway in rats (Ichikawa et al., 1992; Salazar and Sánchez Quinteiro, 1998) and opossums (Shapiro et al., 1995).

2.4.1. LEA and BSI-B₄ protocol

Before proceeding with the lectin histochemistry protocol, all sample slides were deparaffinized and rehydrated. Biotinylated conjugates of LEA and BSI-B₄ were used for this study (see details in Table 2). Firstly, 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) solution was used to inactivate endogenous peroxidase activity. Then sections were incubated in a 2% bovine serum albumin (BSA) in 0.1 M phosphate-buffered (pH 7.2) solution (PB). Slides were then incubated overnight with LEA and BSI-B₄ lectins, independently, in a 0.5% BSA solution. After the incubation, the samples were washed 2 × 2 min in PB, and afterwards incubated during 1.5 h at room temperature with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) reagent (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). To visualize the reaction, a 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen solution and a 0.003% H₂O₂ solution, in 0.2 M Tris-HCl buffer solution were used. The DAB reagent develops into a brown precipitate in the presence of the hydrogen peroxide solution, which enables the visualization of the reaction.

2.4.2. UEA-I protocol

As with the LEA and BSI-B₄ lectins, before the lectin histochemistry protocol, it is necessary to deparaffinize, rehydrate the slides and incubate the samples with 3% H₂O₂ solution to inactivate endogenous peroxidase activity. The samples were then incubated for 1 h at room temperature in a 0.5% BSA/UEA-I solution and then washed for 3 × 5 min in a PB solution. The slides were then incubated overnight with an anti-UEA-I peroxidase-conjugated antibody. The next day, the samples were washed with a PB solution. A DAB solution was added to visualize the reaction.

Controls were performed for both protocols, both without the addition of lectins and with the preabsorption of lectins, by using an excess amount of the corresponding sugar.

2.5. Immunohistochemical staining

A thorough immunohistochemical study was performed to study the fox olfactory bulb. Among the antibodies used (Table 2), the anti-G α o and anti-G α 2 antibodies are particularly useful because they label the transduction cascade for V2R and V1R vomeronasal receptors, respectively. Neuronal dendritic formation in the bulb was characterized employing microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and α -tubulin antibodies. Astrocytes and ensheathing cells were identified using antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP). Neuronal axonal growth and synaptogenesis were characterized by using an anti-growth-associated protein 43 (GAP43) antibody. Antibodies were also used to detect olfactory marker protein (OMP), which is expressed in mature neurons in both olfactory subsystems. The immunohistochemical study was conducted by examining the expression patterns of the calcium-binding proteins calbindin (CB) and calretinin (CR), which participate in the regulation of cytosolic free calcium ion concentrations in neurons. The distribution of calcium-binding proteins has previously been recognized as a useful neuronal marker for identifying specific brain regions and discrete neuronal subpopulations (Coppola and Disney, 2018; De Góis Morais et al., 2021).

2.5.1. Antibody characterization and specificity

Information for all antibodies, including sources, dilutions used, target immunogens, and Research Resource Identifiers (RRID), are presented in Table 2. In all cases, the immunostaining patterns

Table 2
Detailed information on the antibodies and lectins used in this study.

Antibody	1st Ab species / dilution	1st Ab catalog number	Immunogen	Reference	RRID	2nd Ab species/dilution, catalog number
Anti-G α o	Rabbit 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-387	Peptide mapping within a highly divergent domain of G α o of rat origin	Torres et al. (2021)	AB_2111641	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-G α o	Rabbit 1:200	MBL-551	Bovine GTP Binding Protein G α o subunit	Prince et al. (2009)	AB_591430	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-G α i2	Rabbit 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-7276	Peptide mapping within a highly divergent domain of G α i2 of rat origin	De la Rosa-Prieto et al. (2010)	AB_2111472	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-OMP	Goat 1:400	Wako 544-10001	Rodent olfactory marker protein	Koo et al. (2005)	AB_2315007	Horse anti-goat IgG 1:250 Vector BA-9500
Anti-GAP-43	Mouse 1:4000	Sigma G9264	Mouse clone GAP-7B10	Gonzalez-Lozano et al. (2016)	AB_477034	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti - CB	Rabbit 1:6000	Swant CB38	Rat recombinant calbindin D-28k	Hermanowicz-Sobieraj et al. (2018)	AB_10000340	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CR	Rabbit 1:6000	Swant 7697	Recombinant human calretinin containing a 6-his tag at the N-terminus	Adrio et al. (2011)	AB_2619710	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-MAP-2	Mouse 1:400	Sigma M4403	Rat brain microtubule-associated proteins	Kotani et al. (2010)	AB_477193	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GFAP	Rabbit 1:400	Dako Z0334	GFAP from bovine spinal cord	Shibata et al. (2013)	AB_10013382	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti- α -tubulin	Rabbit 1:500	Abcam 7291	Full length native protein (purified) corresponding to chicken α -tubulin	Nawaz et al. (2020)	AB_2241126	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
UEA	1:60	Vector L-1060				Rabbit 1:50 DAKO P289
LEA	20 μ m/ml	Vector B-1175				Vectastain ABC reagent PK-4000
BSI-B $_4$	100 μ m/ml	Sigma L-2140				Vectastain ABC reagent PK-4000

Abbreviations: ABC, avidin-biotin complex; BSI-B $_4$, *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B $_4$; CB, calbindin; CR, calretinin; GAP-43, growth-associated protein 43; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HRP, horseradish peroxidase; LEA, *Lycopersicon esculentum* lectin; MAP-2, microtubule-associated protein 2; OMP, olfactory marker protein; UEA, *Ulex europaeus* agglutinin.

obtained using these antibodies in the red fox were consistent with prior immunostaining patterns obtained in a variety of mammalian species. Relevant references for each antibody are indicated in Table 2.

2.5.2. Immunohistochemical protocol

Before the immunohistochemical reaction, deparaffinized and rehydrated samples were incubated for 15 min in a 3% H₂O₂ solution to inactivate endogenous peroxidase activity. Either 2.5% horse normal serum of the ImmPRESS reagent kit Anti-mouse IgG/Anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or 2% BSA was used for 30 min to block non-specific binding sites (Table 2). The samples were then incubated with the primary antibody at 4 °C overnight and under humid conditions. Samples previously blocked with the ImmPRESS kit were incubated for 20 min with either the ImmPRESS VR Polymer HRP Anti-Rabbit IgG or the Anti-mouse IgG reagent (Table 2), except for the slides incubated with the anti-OMP antibody (raised in goat), which were incubated with a biotinylated anti-goat IgG for 1.5 h, and then incubated in ABC reagent. In all cases, successive 3 × 3 min PB washes were performed in between steps. Finally, slides were rinsed in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.61 for 10 min before developing with a DAB chromogen (same protocol as for the lectin histochemical labeling), and then dehydrated and mounted.

For all immunohistochemical procedures, the omission of the primary antibody was used as a negative control, and no labeling or non-specific background staining was observed for any negative control samples. As positive controls, we replicated the immunohistochemical procedure in previously unstained mouse or rabbit tissue obtained during previous experiments. These samples were known to express the proteins of interest, and the expected positive results were obtained in all cases.

2.6. Image acquisition and digital processing

Images were captured with a Karl Zeiss Axiocam MRC5 digital camera coupled to a Zeiss Axiophot microscope. Brightness, contrast and balance levels were adjusted using Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). No specific characteristics within the images were altered, enhanced, moved or introduced.

3. Results

The study of the AOB will be addressed at both the macroscopic and microscopic levels.

3.1. Macroscopic study of the accessory olfactory bulb

The fox MOB is located inside the ethmoidal fossa and was extracted in conjunction with the brain in our specimens (Fig. 1A and B). Visual inspection revealed well-developed bulbs, similar to those observed in dogs, although the fox olfactory bulbs appear to be more elongated in the dorsoventral axis (Fig. 1C–F). The AOB was not visible at first glance, although following the removal of the rostral-most section of the frontal lobe, we noted a small ovoid protuberance on the posterior third of the medial edge of the MOB, which we presumed to be the location of the AOB (asterisk in Fig. 1D) and was later confirmed by histological serial sectioning of the whole olfactory bulb.

The remaining anatomical structures that constitute the olfactory pathway also presented remarkable development, including the lateral olfactory tract (LOT), olfactory tubercle (OT), and piriform lobe (Pyr) (Fig. 1B).

3.2. Microscopic study of the accessory olfactory bulb

3.2.1. Histological and immunohistochemical features

The microscopic study of the olfactory bulb confirmed the presence of an AOB in the fox, located in a caudoventral position, relative to the MOB (Fig. 2A, and D–F). Hematoxylin and eosin (HE) and Nissl stainings were used to study the texture of the AOB, through which the AOB layering could easily be identified (Fig. 2B and C). From the superficial to deep planes, the following layers were discernible: vomeronasal nerve (Vn), glomerular (Glm), mitral-plexiform (M-P), and granular (Gr) layers (Fig. 2B). The nervous and glomerular layers appear particularly well-developed in this species. The periglomerular cells formed many irregular, tortuous strands (Fig. 3A); therefore, the glomeruli did not present with well-defined margins. Occasionally, larger neurons with rounded nuclei, presumably interneurons, could be located in the innermost part of the glomerular layer.

Instead of the monolayer of mitral cells typically observed in the MOB, the principal cells of the AOB are scattered along a patch of neuropil, which extends from the glomerular (Glm) to the granular layers of the AOB (Figs. 2B and 3D), referred to as the mitral-plexiform layer (M-P) layer. This layer is well-defined, and its central part deepens into approximately the middle portion of the Glm. The arrangement of the principal cells can be clearly observed by immunohistochemical and histochemical labeling (Figs. 4–6). The number of principal cells is abundant, and they are arranged in parallel along the anteroposterior axis of the AOB.

These principal cells display either miter or ellipsoid shapes and have large soma containing large, rounded nuclei and patent nucleoli (Fig. 3B and F). Between the principal cells, numerous smaller cells can be observed, containing round nuclei and cytoplasm, featuring barely noticeable prolongations. These cells presented with differing neurochemical patterns compared with the principal cells (Fig. 3H–M). The granular layer (Fig. 2B) was comprised of typical clusters of small, rounded granule cells, surrounded by larger isolated multipolar neurons (Fig. 3C).

Both Bielschowsky (Fig. 2D and G) and Tolivia (Fig. 2F, H, and I) stains enabled the identification of both the main cell types and myelinated nerve fibers contained in the fox AOB. The presence of a wide tract of myelinated fibers along the anteroposterior axis of the AOB and delimiting the mitral-plexiform and granular layers is noteworthy and represents the contribution of the AOB to the LOT (Fig. 2D, F, and I). These fibers extend horizontally and perpendicularly toward the granular layer (Fig. 3D and E), with reducing density toward the mitral cell band (Fig. 3E and F), occupying the spaces left free by the principal and granular cells of both layers. Additionally, these stains showed an atypical glomerular formation, consisting of an isolated glomerulus located in the caudal portion of the AOB, surrounded by myelinated fibers and differentially stained (Fig. 2G and H).

Several antibodies against different proteins were used to study the fox AOB. Anti-Gα_{i2} specifically labels the i2 family of the G-protein α subunit, which is present in the transduction cascade of the V1R vomeronasal receptor, revealed positive labeling concentrated in the vomeronasal nerve (Vn) and glomerular (Glm) layers (Fig. 4A). By contrast, the mitral-plexiform layer (M-P) did not show immunopositive labeling for anti Gα_{i2}. Anti-Gα_o labels a component found in the transduction cascade of the V2R vomeronasal receptor and displayed a complementary pattern, illustrating how the M-P layer deepens into the Glm layer (Fig. 4B). According to our observations in an older fox specimen, this pattern could vary, as shown in Fig. 4D, between older and younger specimens: the arborization pattern observed in the younger specimen was thicker and broader. We did not identify anti-Gα_o immunolabeling in the superficial layers of the AOB; therefore, the typical anteroposterior

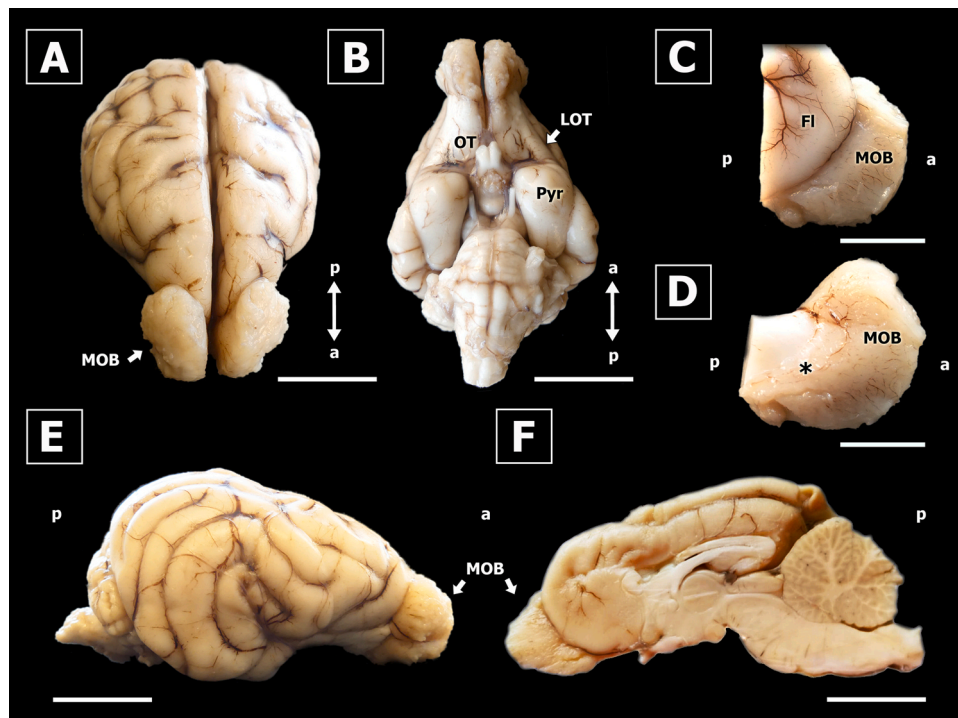


Fig. 1. The brain and main and accessory olfactory bulbs of the fox. A. Rostradorsal view of the brain. B. Ventral view of the brain, with the main structures of the olfactory pathway indicated: piriform lobe (Pyr), olfactory tubercle (OT), and lateral olfactory tract (LOT). C. Medial view of the left olfactory bulb, covered by the frontal lobe of the telencephalon (FI). D. Medial view of the left olfactory bulb, after the removal of the rostral portion of the telencephalon. Both the caudomedial surface of the main olfactory bulb (MOB) and the rostral portion of the olfactory peduncle are now visible. The presumptive area of localization for the accessory olfactory bulb is indicated (asterisk). E. Lateral view of the brain. F. Medial view of the right hemiencephalon. a: anterior, p: posterior. Scale bar: A, B, E, F: 2 cm. C, D: 0.5 cm.

zonation found in the species expressing the two families of vomeronasal receptors, V1R and V2R, was also not observed.

The anti-MAP2 antibody, which is a consistent marker for the dendritic branching of mitral cells in all species, shows a similar outcome as observed using the anti-G α o antibody, with no reactivity in the vomeronasal nerve (Vn) and glomerular (Glm) layers and strong immunopositive labeling in the mitral-plexiform (M-P) and granular layers (Fig. 4C). Higher magnification images of the anti-MAP2 immunostaining (Fig. 3M) confirmed that the labeling was concentrated in the mitral cell somas and their dendritic projections to the Glm layer.

The use of anti-OMP antibody enables the specific labeling of OMP protein, which is associated with mature neurons in both the MOS and VNS. The anti-OMP immunopositive labeling of the fox AOB showed a similar pattern as was observed using the anti-G α i2 antibody, labeling both the vomeronasal nerve and glomerular layers. MOB glomeruli are more intensely labeled with anti-OMP than those of the AOB (Fig. 5A).

The anti-GAP-43 antibody selectively labels the GAP-43 protein, which is typically found in large quantities in axonal growth cones. This antibody showed immunopositive labeling in the vomeronasal nerve, glomerular and granular layers, whereas the mitral-plexiform layer was immunonegative (Fig. 5B).

The anti-GFAP antibody selectively labels the glial-fibrillar protein, which is located along the entire thickness of the AOB (Fig. 5C). The anti-GFAP labeling observed in the superficial layers of the AOB can be attributed to the profuse arborizations of the ensheathing cells that enclose the nervous fibers of the vomeronasal nerve layer. In the deep layers of the AOB, anti-GFAP labeling characterizes branched astrocytes (Fig. 5F).

Antibodies against cytoplasmic calcium-binding superfamily proteins, including CB-D28k and CR (Fig. 5D and E, respectively), showed intense immunopositive labeling, especially the anti-CR antibody. Anti-CR and anti-CB labeling appeared broadly and

diffusely throughout the vomeronasal nerve and glomerular layers of the AOB, whereas the labeling was restricted to small subpopulations of neurons in the mitral-plexiform (M-P) and granular layers. Hematoxylin counterstaining showed that both markers stained only a small fraction of both principal and smaller M-P neurons, staining the soma (Fig. 3H and I for CR; Fig. 3K and L for CB) and, in the case of CB, fine processes (Fig. 3L). The immunolabeling pattern we observed using both CB and CR antibodies did not allow us to discriminate the presence of specific neuronal subpopulations for these two proteins.

3.2.2. Lectin-histochemical study of the AOB

A study of the AOB was performed using the lectins UEA-I and LEA. A specific positive labeling pattern was observed using UEA-I, in which the vomeronasal nerve layer showed weaker labeling than the glomerular layer. The AOB glomeruli configuration could be observed with great clarity using lectin-histochemical staining compared with the pattern observed using general histological stains (Fig. 6A). The vomeronasal nerve (NVN) was also easily distinguished due to positive labeling by UEA-I (Fig. 6A). Both the MOB and the frontal lobe of the telencephalon were negative for UEA-I.

A positive labeling pattern for LEA was observed, concentrating on the vomeronasal nerve and glomerular (Glm) layers of the AOB. The mitral-plexiform and granular layers were negative for LEA (Fig. 6B). In contrast with the pattern observed using UEA-I, LEA labeling showed a strong positive pattern in the superficial layers of the MOB (olfactory nerve and Glm layers). Finally, BSI-B₄ staining did not result in any positive labeling in either the fox AOB or MOB.

3.2.3. Immunohistochemical and lectin-histochemical studies of the vomeronasal nerve

The NVNs travel along the medial surface of the MOB before reaching the AOB. To examine these nerves, we examined serial

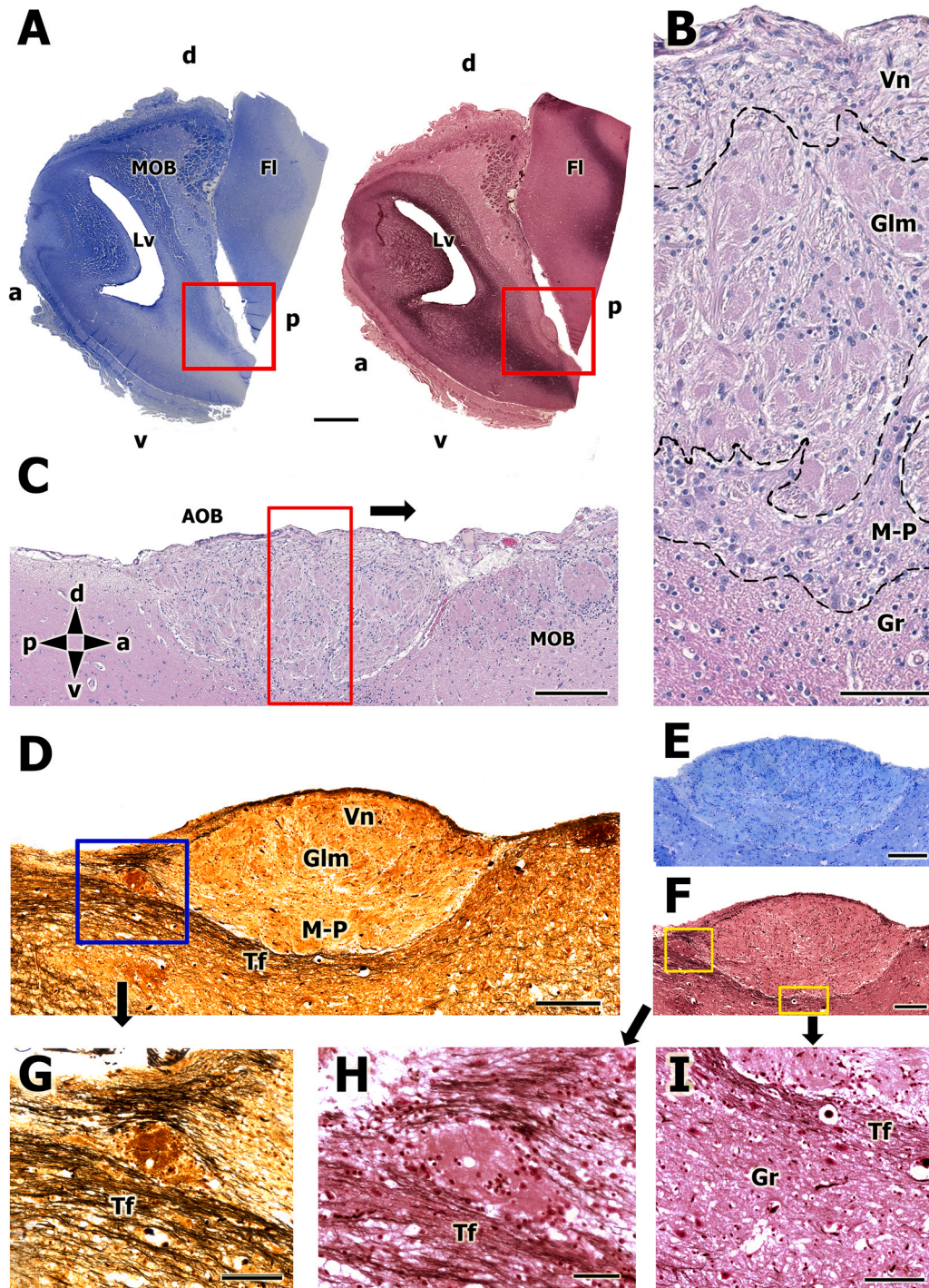


Fig. 2. Histological study of the fox AOB. A. General view of the main olfactory bulb (MOB), cut in the sagittal plane, in which the accessory olfactory bulb (AOB) is framed in red, located in a caudoventral position relative to the MOB. The frontal lobe of the telencephalon (FI), the MOB, and the lateral ventricle (Lv) can be identified. Nissl and Tolivia stains are shown. B and C. Horizontal sections of the AOB (B corresponds to the red-framed section in C), in which the different layers are identified: nervous layer (Vn), glomerular layer (Glm), mitral-plexiform layer (M-P), and granular layer (Gr). Hematoxylin and eosin stain. D. Sagittal section of the AOB. Bielschowsky stain. The dark brown myelin tract fibers (Tf) are clearly identified. An atypical glomerular formation is framed in blue and shown at higher magnifications in G, surrounded by myelinic fibers. E. Sagittal section of the AOB. Nissl stain. F. Sagittal section of the AOB stained using the Tolivia method, showing another example of an atypical glomerular formation (framed in yellow and shown at higher magnification in H). The tract fibers and the granular layer are also framed in yellow and shown at higher magnification in I. The compass indicates the orientation, as follows: d, dorsal; v, ventral; p, posterior; a, anterior. Scale bars: A: 2 mm. C, D: 250 μ m. B, G: 100 μ m. E, F: 200 μ m. H, I: 50 μ m.

decalcified sections of the ethmoidal fossa (Fig. 7A). The olfactory nerves and the superficial layers of the MOB were immunopositive for anti-G α o; however, this marker did not allow for the identification of the NVN bundle (Fig. 7B). Conversely, anti-G α i2 staining was only observed in the NVN fascicles in a highly specific manner

(Fig. 7C). LEA stained both the olfactory components of the MOB and the NVN (Fig. 7D and G). The presence of small arterioles in a plane deep to the NVN served as a topographic landmark to confirm the anti-G α o-negative (Fig. 7E) and anti-G α i2-positive (Fig. 7F) character of the NVN.

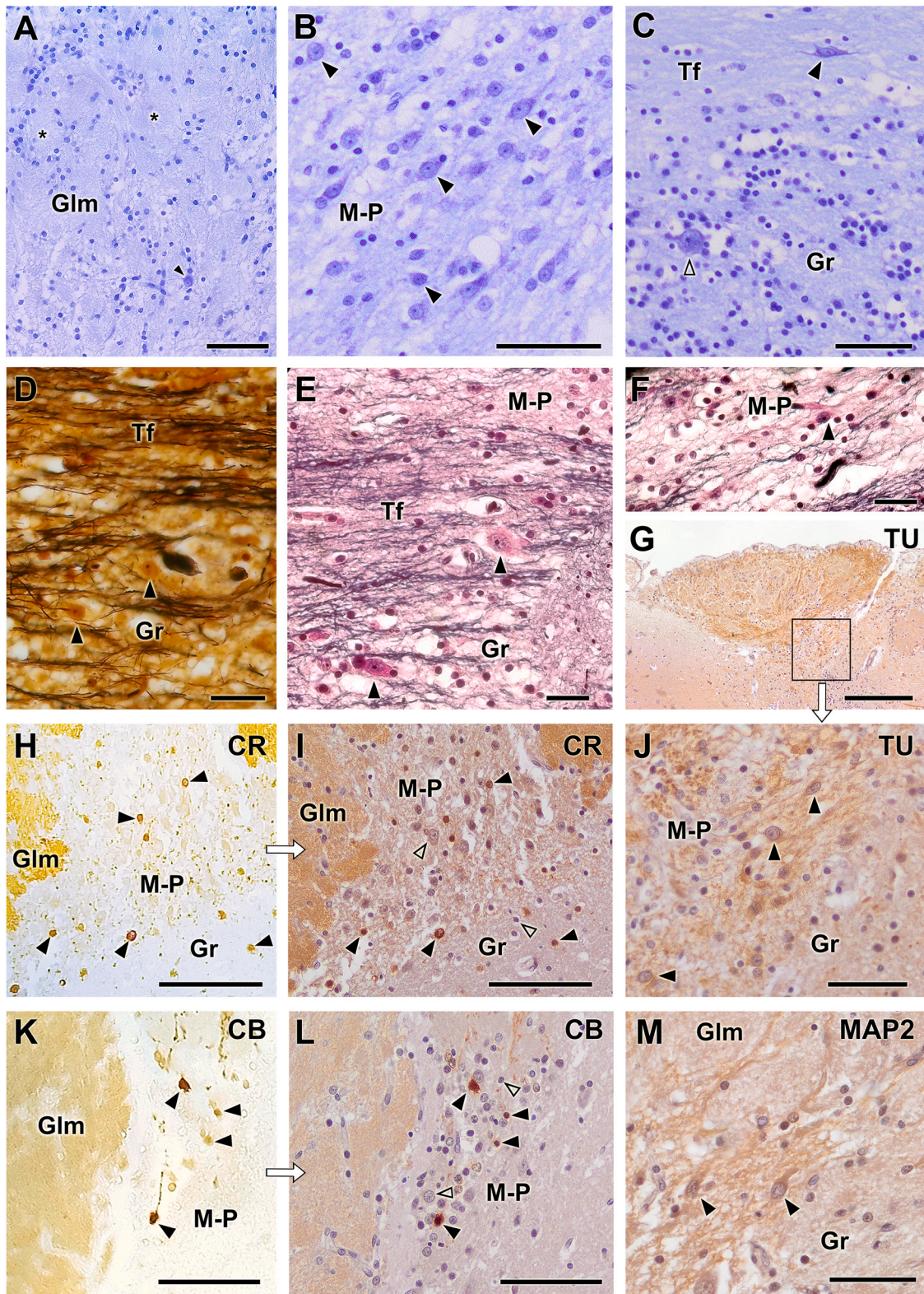


Fig. 3. Histological and immunohistochemical study of the fox AOB cytoarchitecture. A–C. Nissl stains of the accessory olfactory bulb (AOB) layers. A. Glomerular layer (Glm) showing some instances of the glomeruli (asterisk), whose boundaries are not neatly defined, and an isolated larger neuron in the deeper part (arrowhead). B. The principal cells of the AOB occupy a broad band that is designated as the mitral-plexiform (M-P) layer. The principal cells (arrowheads) display either miter or ellipsoid shapes and have large soma featuring large, rounded nuclei with patent nucleoli. Interspersed between the principal cells, numerous smaller cells containing round nuclei can be observed. C. A band of white matter corresponding to an axonal fiber tract (Tf) contains only large multipolar neurons (black arrowhead). Deeper to the Tf, the granular (Gr) layer is occupied by clusters of granular cells and isolated large neurons with oval soma (open arrowhead). D. Bielschowsky stain of the deep layers of the AOB showing the development of the Tf and its projections into the Gr layer, which consists of granule cells and larger, isolated neurons (arrowhead). E and F. Tolivia staining of the AOB, showing the Tf, arranged between the M-P and Gr layers. Scattered large neurons are interspersed among the myelinated fibers of the Tf (arrowhead) and the Gr layer (E). In the M-P layer, the principal cells (arrowhead) are intermingled with Tf projections (F). G and J. Sagittal sections of the AOB immunostained with anti- α -tubulin. An enlarged image of the M-P layer shows the α -tubulin-immunopositivity of mitral cell somas (arrowheads) and the surrounding neuropil. H and I. Immunostaining of the M-P layer with anti-calretinin. The left image shows the section

without counterstaining (H), whereas the right image shows the same section with hematoxylin counterstaining (I). Only a subpopulation of cells (black arrowheads) are calretinin-positive. K and L. Immunostaining of the M-P layer with anti-calbindin. The left image shows the section without counterstaining (K), whereas the right image shows the same section with hematoxylin counterstaining (L). A subpopulation of both large and small neuronal cells (black arrowheads) are calretinin-positive. Many cells remain unstained (open arrowheads). The immunolabeling pattern does not allow for the discrimination of a complementary neuronal distribution for these two markers, CB and CR. M. Immunostaining of the AOB with anti-MAP-2 results in the strong immunolabeling of mitral cell somas and their dendritic projections to the glomerular layer (arrowheads). Scale bars: A,H,I,K,L: 100 μ m. B,C,J,M: 50 μ m. D-F: 25 μ m. G: 250 μ m.

3.2.4. Comparative histological and immunohistochemical study of the dog and fox AOB

To illustrate the differences in lamination between the accessory olfactory bulb of the fox and the dog, we performed a comparative histological and immunohistochemical study of the dog and fox AOB, primarily focusing on the organization of the mitral-plexiform (M-P) layer, where the projection cells of the AOB are located. Tolivia staining (Fig. 8A) reveals less development of the M-P layer in the dog compared with the fox (Fig. 8B). The M-P layer in the dog consists of a thin layer with scattered principal cells, whereas, in the fox, the M-P layer neuropil projects into the glomerular layer (Glm), and its principal cells are numerous, with a typical mitral shape. Tolivia staining also reveals differences in the granular layer (Gr), which is mainly occupied by the lateral olfactory tract fibers in the dog, whereas, in the fox, these fibers are less dense, and more cellular elements can be observed. Nissl staining of the dog (Fig. 8C) and fox (Fig. 8D) AOB reveals differences in the thickness of the M-P layer and in the density of its principal cells, which are more numerous and have mitral shapes with clearly delineated somas in the fox AOB. Additionally, the granule cells in the fox AOB are organized into clusters, whereas, in the dog, they are scattered in a more diffuse pattern. Finally, immunohistochemical staining of the dog (Fig. 8E) and fox (Fig. 8F) AOB using anti-G α o shows the characteristic shape and development of the M-P layer in each species.

4. Discussion

In canids, the current understanding of the first integrative center of the VNS, the AOB, is associated with a number of crucial and unresolved questions. The few existing studies of the canid AOB, limited to the dog, have indicated a small size and a lack of the

typical cytoarchitecture observed in other mammalian species (Meisami and Bhatnagar, 1998). To better understand the relevance, in the context of the Canidae family, of the results presented here, it is therefore important to address the study of the AOB of the dog. A pioneering comparative study among the olfactory bulbs of carnivorous species performed by Jawlowski (1956) was the first to describe the AOB histology in dogs, which was succinctly described as "very small", and, additionally, remains, to our knowledge, as the only reference to the existence of an AOB in the fox. Although Jawlowski was unable to discern the presence of glomeruli in this putative fox AOB, his drawing of the structure at the caudomedial border of the MOB coincides with our macroscopic and microscopic observations. Years later, Miodonski (1968), in his description of the dog's olfactory bulb, characterized the dog AOB as a small-volume structure and poorly defined structure.

The contributions by Salazar et al. (1992, 1994) demonstrated for the first time the unequivocal linkage between this presumptive AOB and the VNOLater, Nakajima et al. (1998) divided the dog AOB into three layers: vomeronasal (Vn) and glomerular (Glm) layers, which occupied most of the AOB, and a thin neuronal cell layer containing several types of neurons. Most of these neurons featured round or oval soma and appeared to correspond with mitral/tufted cells. They only found a small number of granule cells, mainly in the inner portion of the neuronal cell layer, adjoining the olfactory peduncle.

4.1. Histological and immunohistochemical labeling of the fox AOB

Aiming to better comprehend the fox AOB, after the macroscopic identification of a presumptive AOB in an area similar to that described by Jawlowski, we performed a serial histological and immunohistochemical study that enabled the characterization of the

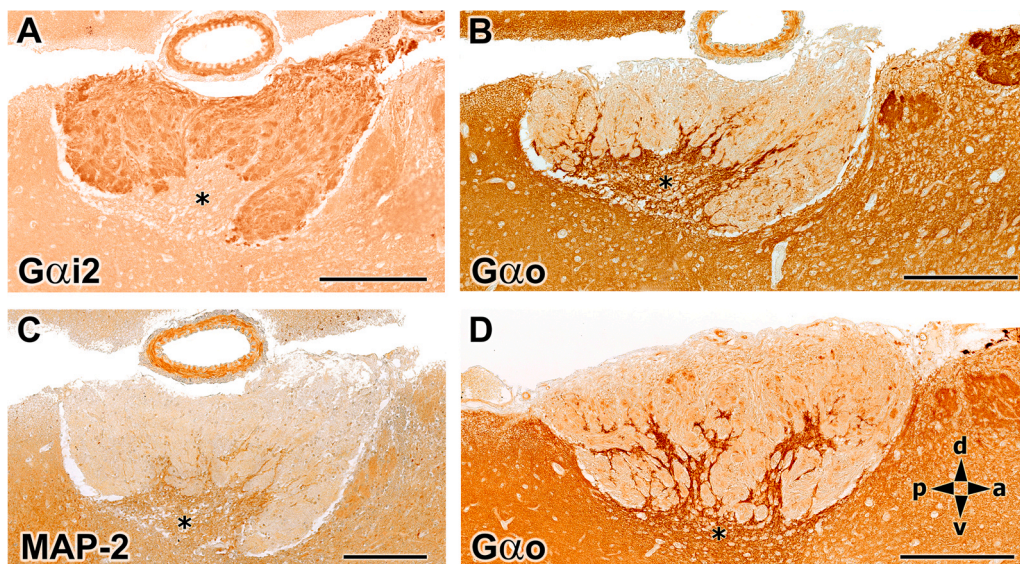


Fig. 4. Immunohistochemical labeling of the fox AOB. A. Immunopositive labeling of the AOB using the anti-G α i2 antibody produced strong immunolabeling in the nervous and glomerular layers, whereas the immunolabeling in the mitral-plexiform layer was weaker. B and D. Anti-G α o immunopositive labeling was observed in the same layers of the AOB in a complementary pattern to that observed for anti-G α i2 labeling, with stronger immunostaining in the mitral-plexiform layer (asterisk) and weaker immunolabeling in both the vomeronasal nerve and glomerular layers; (B, younger fox; D, older fox). C. Anti-MAP-2 shows a similar pattern to anti-G α o, in which the nervous and glomerular layers are immunonegative, and both the mitral-plexiform and granular layers are immunopositive (asterisk). The compass indicates the orientation, as follows: d, dorsal; v, ventral; p, posterior; a, anterior. Scale bars: 250 μ m.

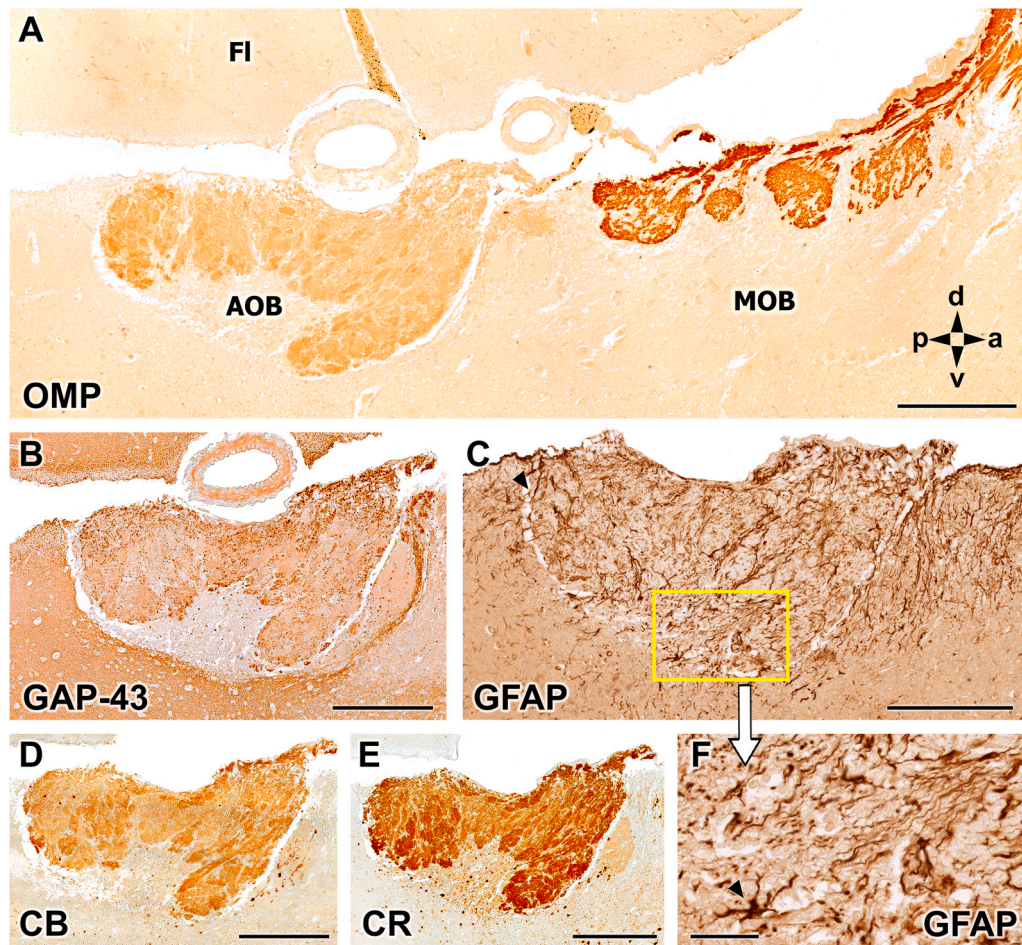


Fig. 5. Immunohistochemical labeling of the fox AOB. A. Immunopositive labeling in the vomeronasal nerve and glomerular layers with anti-olfactory marker protein (OMP). The main olfactory bulb (MOB) glomeruli are intensely labeled. B. Anti-growth-associated protein 43 (GAP-43) immunopositive labeling in the superficial layers of the accessory olfactory bulb (AOB). C. Anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) labels the dense arborizations of the ensheathing cells in both the vomeronasal and glomerular layers. Immunopositive astrocytes are observed in the deep layers (higher magnification of the yellow frame is shown in F, arrowhead). D and E. Similar immunopositive patterns as observed using anti-G α i2 in the AOB were observed using anti-calbindin (CB) and anti-calreticulin (CR) antibodies (D and E, respectively). a, anterior; d, dorsal, p, posterior; v, ventral. Scale bars: A–E: 250 μ m. F: 50 μ m.

morphofunctional nature of the AOB. The main comparative structural findings are summarized in Fig. 9. Our observations of the microscopic texture of the fox AOB contrast with the available microscopic descriptions of the dog AOB. The most striking feature of the fox AOB is its clear lamination, with neatly differentiated layers, including a highly developed Glm layer, rich in periglomerular cells, and a large inner cell layer, equivalent to both the inner cell layer described by Salazar et al. (1992, 1994) and the neuronal cell layer described by Nakajima et al. (1998) but more easily discernible. Unlike in the dog AOB, this layer is not a thin sheet in the fox but instead appears as a large area projecting inward onto the superficial layers of the AOB. This observation was especially apparent following the immunohistochemical staining, which was able to clearly differentiate the two outer layers, the Vn and Glm layers, from the inner cellular zone. The inner layer was immunonegative when using antibodies against G α i2, OMP, and GAP-43, whereas the two outer layers were immunopositive. By contrast, immunopositive labeling was observed using the anti-G α o and anti-MAP-2 antibodies in the inner layers, but the outer layers were immunonegative. The strong labeling obtained in the two superficial layers against OMP, which is a marker for mature vomeronasal cells (Bock et al., 2009), and against GAP-43, one of the best-characterized markers for growing and regenerating neuronal processes (Ramakers et al., 1992), indicates important activity in the fox VNS among both mature and regenerating vomeronasal neurons. Anti-CB and anti-CR

staining also produced intense labeling in the Vn and Glm layers, which is consistent with the expression found in the fox VNO, both in the neuroepithelium and in the NVN of the lamina propria. Although the expression of these markers has been observed in subpopulations of neuroreceptor cells (Ortiz-Leal et al., 2020), at the level of the AOB, these neurons do not show topographic segregation, integrating their axons throughout the anteroposterior axis of the AOB. The high density of cell bodies and fibers stained with anti-GFAP in the Vn layer, encompassing glomeruli, and in the M-P layer of the fox AOB contrasts with the scarce number of astrocytes found in the dog AOB (Fig. 8 in Salazar et al., 1994), and is reminiscent of the profuse labeling observed in the rat olfactory bulb (Bailey and Shipley, 1993). This high level of GFAP expression in the fox AOB suggests a very active neuron-glia interaction, which is known to be involved in various processes in adults, such as synaptic communication, plasticity, homeostasis, and dynamic monitoring and alteration of the central nervous system structure and function (Allen and Lyons, 2018).

MAP-2 expression is particularly relevant because it can be used to identify AOB principal cell somas and dendritic trees (Dehmelt and Halpain, 2005; Villamayor et al., 2020). In contrast to the scarce number of mitral cells described in previous studies of the dog AOB, numerous mitral cells were observed in the fox AOB, distributed in parallel along a broad band and displaying either miter or ellipsoid shapes. We designated this layer as the M-P layer, and antibodies

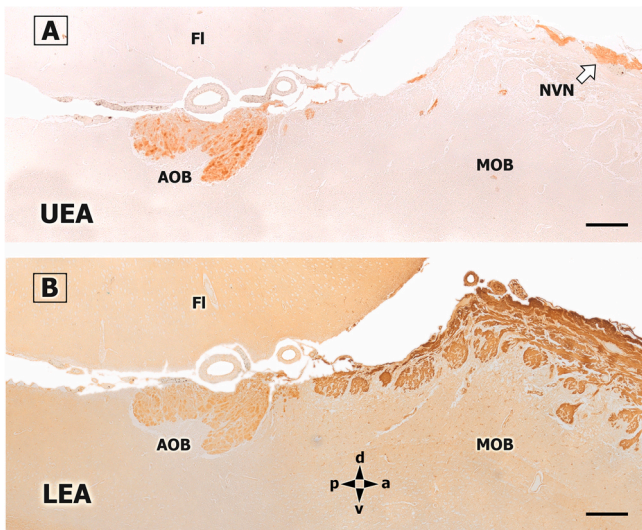


Fig. 6. Lectin-histochemical study of the fox AOB and MOB. A. *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) labels the superficial layers of the accessory olfactory bulb (AOB; nervous and glomerular layers) and the branches of the vomeronasal nerves (NVN). However, the olfactory nerve layer and the glomeruli of the main olfactory bulb (MOB) are not labeled with UEA. B. *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA) stains the superficial layers in both the AOB and the MOB. FI, frontal lobe of the telencephalon. The compass indicates the orientation, as follows: d, dorsal; v, ventral; p, posterior; a, anterior. Scale bars: 250 μm.

against both MAP-2 and α -tubulin allowed for the discrimination of these cells and their dendrites. Mitral cells serve as the main projection neurons of the AOB, and their high density is also reflected by the development of the Tf that they form and that could be observed using Tolivia and Bielschowsky staining. These fibers represent the

contribution of the AOB to the dorsal portion of the LOT, which runs below the inner granular cells in the fox, coinciding with the observation reported by Switzer et al. (1980) in their extensive comparative study of the mammalian LOT.

Overall, a high degree of development was observed for the mitral cells in the fox AOB, which were very abundant and presented with varied morphologies, and for the plexiform layer, in which the dendritic trees of the mitral cells are distributed, which was particularly striking compared with the low numbers of mitral cells and the scarce plexiform layer development described in the dog AOB by Salazar et al. (1994) and Nakajima et al. (1998). For example, Fig. 3B in the results section shows the cellular organization of the mitral-plexiform layer of the fox AOB, which is similar to the M-P layer observed in the AOB of species with maximal VNS development, such as the rat (Larriva-Sahd, 2008) or the rabbit (Villamayor et al., 2020). In the granular zone, both Tolivia and Bielschowsky stainings allowed for the discrimination of an extensive granular cell presence, which formed clusters between the Tf and the LOT. In both the granular and the M-P layer, anti-CB and anti-CR staining allowed for the discrimination of neuronal subpopulations. However, we cannot compare the fox with the dog because anti-CR and anti-CB antibodies have not been used in dogs, although the pattern observed in the fox is comparable to that observed in the mouse and the rabbit (Jia and Halpern, 2004; Villamayor et al., 2020).

4.2. Lectin-histochemical labeling of the fox AOB

Our recent study of the fox VNO allowed us to determine the validity of using the lectins UEA-I and LEA as VNO receptor markers in the neuroepithelium (Ortiz-Leal et al., 2020). By extending this study of the fox VNS to the NVN and the AOB, we have determined that LEA stains the NVN and the superficial nervous and glomerular elements of both the AOB and MOB, whereas UEA-I specifically

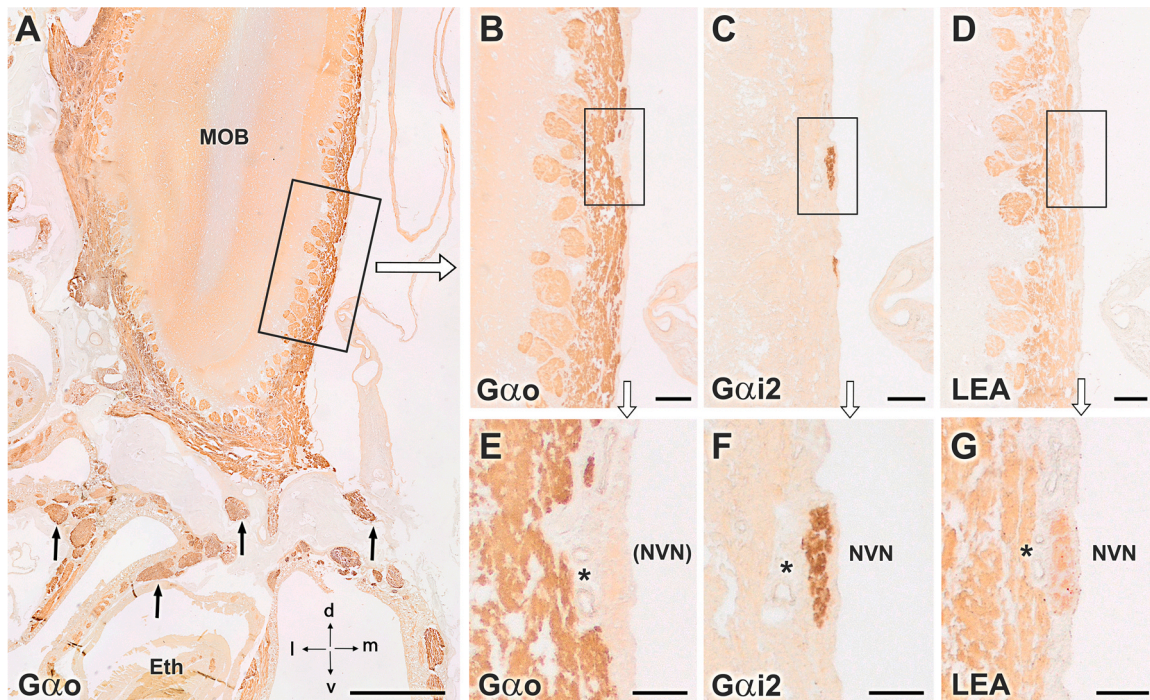


Fig. 7. Immunohistochemical and lectin-histochemical study of the vomeronasal nerve (NVN) in the ethmoidal fossa (Eth). Serial sections of the main olfactory bulb (MOB) in the ethmoidal fossa were stained with anti-G α o (A, B, and E), anti-G α i2 (C and F), and the lectin LEA (D and G). A. Anti-G α o stained the olfactory nerves in the ethmoidal concha (arrows) and the superficial layers, both nervous and glomerular, of the MOB. B. The trajectory of the NVN along the ventromedial surface of the MOB is not labeled with this marker. C. Anti-G α i2 only stains the NVN. D. The lectin LEA labels both the olfactory nerve layer of the MOB and the NVN. E–G. A higher magnification image of the NVN using the same markers confirmed that the NVN is G α o-immunonegative and G α i2-immunopositive. The presence of small arterioles (asterisk) in a plane deep to the NVN serves as a useful landmark for locating the unstained nerve in E. d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: A: 1 mm. B–D: 100 μm. E–G: 50 μm.

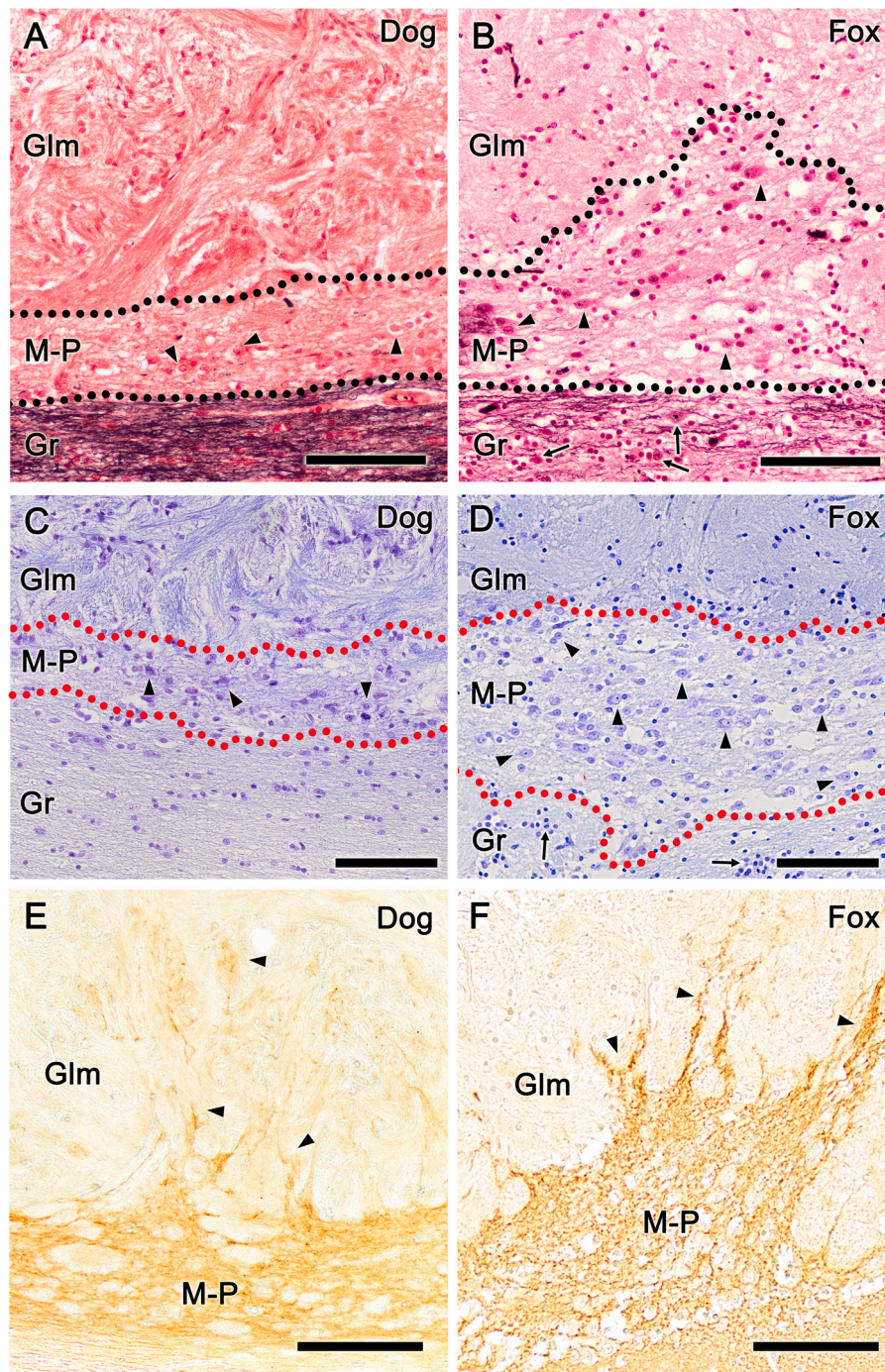


Fig. 8. Comparative histological and immunohistochemical study of the dog and fox AOB. A and B. Toluidine staining of the dog (A) and fox (B) AOB showing the reduced development of the mitral-plexiform layer (M-P) in dogs. The M-P layer in the dog consists of a thin layer with scattered principal cells, whereas, in the fox, the M-P layer neuropil projects into the glomerular layer (Glm), and the principal cells are more numerous and have a typical mitral shape. The granular layer (Gr) is primarily occupied by lateral olfactory tract fibers in dogs. These fibers are less dense in the fox AOB. C and D. Nissl staining of the dog (C) and fox (D) AOB. Both images are at the same magnification. The differences in the thickness of the M-P layer and in the principal cell density (arrowheads) are appreciable. The principal cells of the fox AOB are more numerous and have mitral shapes with clearly delineated somas. The granule cells in the fox AOB are organized into clusters (arrows), whereas, in the dog, they are scattered. E and F. Immunohistochemical staining of the dog (E) and fox (F) AOB with anti-Ga α , which shows the characteristic shape and development of the M-P layer in each species. Scale bars: 100 μ m.

stains only the NVN and the AOB. This finding demonstrates the usefulness of UEA-I as a specific marker of the fox vomeronasal pathway and is identical to the finding obtained in the dog, in which a similar VNS-specific pattern was obtained using UEA-I staining (Salazar et al., 1994).

This result is even more significant if we consider that the UEA-I labeling pattern in the VNS varies greatly across different types of mammals. UEA-I has also been demonstrated to serve as a specific

marker of the vomeronasal pathway (VNO, NVN, and AOB) in adult mice (Kondoh et al., 2017; Salazar et al., 2001) but does not label the AOB in the rabbit (Villamayor et al., 2020), sheep (Salazar et al., 2000) and roe deer (Park et al., 2014). In other species, including rats (Salazar and Sánchez Quinteiro, 1998), capybaras (Torres et al., 2020), and pigs (Salazar et al., 2000), UEA-I labels both the MOS and the VNS.

The labeling pattern observed for LEA in the fox coincides with that described for the dog (Salazar et al., 2013), serving as a general

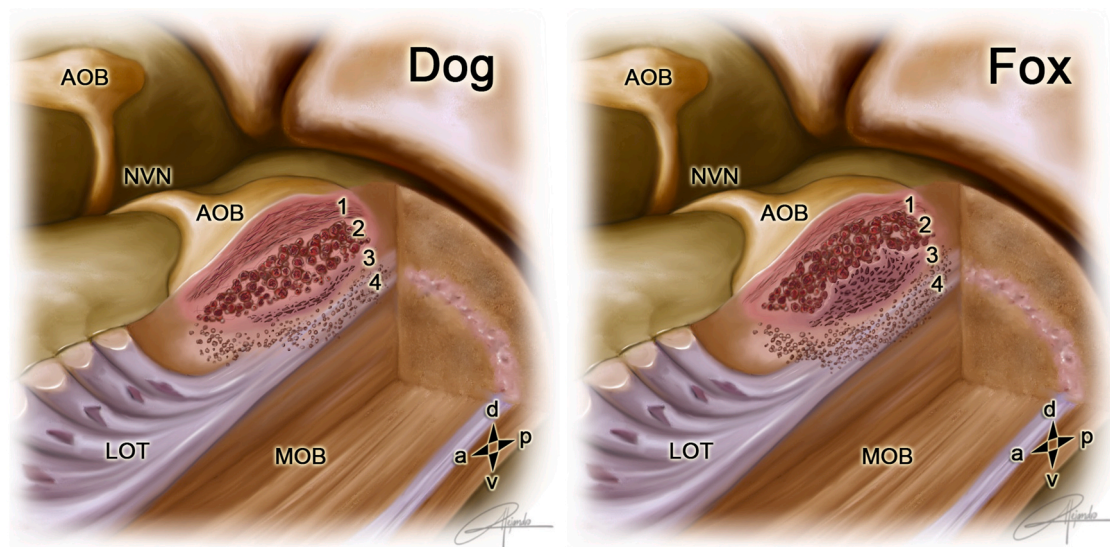


Fig. 9. Drawings of the dog (A) and fox (B) olfactory bulbs, showing the typical lamination of the accessory olfactory bulb in each species. AOB, accessory olfactory bulb; MOB, main olfactory bulb; LOT, lateral olfactory tract; 1, Vomeronasal nerve layer; 2, Glomerular layer; 3, Mitral-plexiform layer; 4, Granular layer. Compass points indicate the orientation: d, dorsal; p, posterior; v, ventral; a, anterior.

marker for both the MOB and AOB. This LEA labeling pattern is common across a wide range of studied species, as diverse as mice, sheep, pigs, deer, rabbits, and capybaras (Salazar et al., 2000 and 2001; Park et al., 2014; Villamayor et al., 2020, Torres et al., 2020). Overall, these findings demonstrate that the pattern of glycoconjugate expression detected by both lectins (α -fucose for UEA-I and N-acetyl- β -D-glucosamine for LEA) is highly conserved in the canid VNS.

4.3. G-protein immunohistochemistry in the fox AOB

Recent findings have demonstrated immunopositivity against the G-protein subunits $G\alpha 2$ and $G\alpha o$ in both the neuroreceptor epithelium and the vomeronasal axons of the parenchyma in the fox VNO (Ortiz-Leal et al., 2020), which represents an important difference from the observations in the dog VNO. In dogs, $G\alpha o$ protein expression has not been detected (Salazar et al., 2013), except for the study reported by Dennis et al. (2003), in which the authors expressed doubts regarding the labeling validity due to the use of antigenic retrieval. $G\alpha o$ positivity would imply the effective expression of V2R receptors in the dog VNO, contradicting the inability to identify functional V2R family genes in either the dog (Young and Trask, 2007) or fox genome (Kukekova et al., 2018).

To explore the role played by $G\alpha o$ neuroreceptor cells in the fox VNS, we first investigated $G\alpha o$ expression in the fox AOB. Anti- $G\alpha o$ immunolabeling was negative in the superficial layers of the AOB, suggesting that the vomeronasal axons that project to the AOB are $G\alpha o$ -negative. Although the internal layers of the AOB are $G\alpha o$ -positive, this finding is common to all mammalian species, as the entire olfactory bulb, including both the AOB and MOB, is $G\alpha o$ -immunopositive, except for the Vn and Gln layers of the AOB which correspond to the projections of V1R neuroreceptor cells, which are $G\alpha 2$ -positive. These findings suggest that the $G\alpha o$ axons that arise from the VNO do not project to the AOB. Regrettably, once these axons leave the VNO and integrate into the nasal submucosa, they become impossible to differentiate from olfactory nerves because $G\alpha o$ is ubiquitously expressed on both olfactory and vomeronasal axons throughout the nasal mucosa lamina propria (Wekesa and Anholt, 1999).

To better understand the fates of these axons, we performed an immunohistochemical and lectin study in decalcified transverse sections of the ethmoidal fossa at a level rostral to the AOB, which

included both the olfactory and vomeronasal axons on the surface of the MOB and in the ethmoidal turbinates. At this level, the vomeronasal axons have already coalesced into an NVN trunk that can be visualized using lectin and G-protein immunolabeling. Given the specific vomeronasal character of $G\alpha 2$ labeling, $G\alpha 2$ could be used to clearly differentiate the trajectories of NVNs. Serial consecutive sections demonstrated that these axons were $G\alpha o$ -immunonegative and LEA-positive, with LEA serving as a universal marker of both olfactory systems. These results, therefore, indicate that the fox $G\alpha o$ vomeronasal axons follow a fate leading to the olfactory bulb that occurs independently from NVNs, possibly converging with the axons of olfactory nerves to project to MOB glomeruli.

Until the identity of the receptors associated with the fox VNO $G\alpha o$ -immunopositive neurons is established, the true character of these receptors, either vomeronasal or olfactory, cannot be determined. However, electrophysiological studies in mice have shown that a sub-population of vomeronasal neurons has the ability to perceive odorants (Sam et al., 2001; Trinh and Storm, 2003), and more recent transcriptomic studies, such as that by Ibarra-Soria et al. (2014) in mice, have demonstrated the expression of ORs in the VNO. A total of 17 OR genes were expressed in the VNO at levels greater than the median expression level of vomeronasal receptor genes. Therefore, our finding that the fox VNO $G\alpha o$ -positive neuroreceptor cells do not project to the AOB could support the presence of a direct pathway from the VNO to the MOB, suggesting the involvement of higher cortical areas in VNO-mediated odor perception and discrimination.

The possibility that specific information processing arising from $G\alpha o$ neurons of the VNO could occur at the level of specific olfactory bulb structures should not be discounted, comparable to previously identified atypical glomeruli in rodents (Zimmerman and Munger, 2021) or the sub-bulbar accessory nuclei of the rabbit (Villamayor et al., 2020). Although no structures of this nature have yet been identified in any canid olfactory bulb, our own observations in the fox olfactory bulb indicate the potential presence of these atypical structures, where information from the VNO may be processed.

4.4. Can domestication shape Canidae accessory olfactory bulb morphology?

A long-term experiment designed to reproduce early mammalian domestication in the silver fox makes this species a particularly

useful model for studying the effects of domestication in Canidae (Belyaev et al., 1985; Wang et al., 2018). The selection of fox for tamability or amenability to domestication led to changes in behavior, physiology, and genetic diversity, similar to those observed in domestic dogs (Trut et al., 2009, Kukekova et al., 2018). Domestication has also led to striking anatomical changes, whose nature and sources of variation are intriguing. In the nervous system, domestication is known to affect developmental neurotransmitter systems (Popova, 2006); however, the neuromorphological changes that occur following the selection for tameness in the Russian fox-farm experiment have only recently been explored in a comprehensive manner. As a result, a change in gray matter volume was observed in tame strains relative to conventional farm foxes, which suggested that selection for behavior can influence brain morphology (Hecht et al., 2021).

These findings present the possibility that the striking structural differences observed between the dog and the fox AOB may partially be the result of the domestication process. To our knowledge, this would represent the first evidence that domestication and concerted artificial selection act to shape the neuroanatomical basis of the accessory olfactory system. The observed variations are unlikely to be attributable to interspecies differences, as no examples exist among mammals belonging to the same family that display such remarkable divergences in the configurations of the VNO and AOB. Even among bats, which have been characterized as having great morphological diversity in the VNS among different families, the pattern observed within each family is highly conserved (Baron et al., 1996). However, we cannot exclude the possibility that other causes may underlie the observed anatomical differences between the AOBs of the fox and the dog. One possibility is the differential evolution of the vomeronasal system between these two species due to adaptations to the different lifestyles typical of the wild fox and the dog. The size of the vomeronasal type 1 receptor (V1R) gene repertoire is known to be a good indicator of the relationship between animal genomes and their environmental niche specializations, especially the relationship between ecological factors and the molecular evolutionary history of the sensory system (Wang et al., 2010). Domestication is also known to affect variations in gene expression patterns throughout the genome, with domesticated species generally exhibiting lower gene expression diversity than wild species (Liu et al., 2019). Therefore, one potential avenue for the further investigation of morphofunctional differences between the AOBs of the fox and the dog would be a comparative transcriptomic analysis using RNA-seq on AOB samples from both species. Epigenetic studies of AOB samples would also be informative, as methylation profiles have indicated that epigenetic factors were involved in the speciation process from wild canids to the domestic dog (Sundman et al., 2020).

Given that the dog was originally domesticated from the wolf, a future step of our study will include the performance of morphofunctional studies on the accessory olfactory system of the wolf, for which no references are currently available. The divergence of the dog from the wolf is thought to have occurred approximately 12,000–15,000 years ago (Graphodatsky et al., 2008), which is a relatively short time span on the evolutionary scale. Therefore, further structural and genomic studies of the wolf AOB could contribute to a better understanding of the nature and sources of variation that occur under domestication pressure.

The anatomical differences encountered support the current hypothesis that the domestication of the dog has resulted in an involution of olfactory development associated with the detection of pheromones and other semiochemicals by the accessory olfactory system (Jeziński et al., 2016). Recent evidence suggests that the loss of olfactory capacity in dogs is a result of domestication-related changes in the MOS, which serves as a morphological comparison. Specifically, Deborah Bird and Blaire Van Valkenburg examined cribriform plate (CP) morphology in 46 dog breeds and 2 wild canids,

the coyote and gray wolf, using high-resolution computed tomography scans and digital quantification, which revealed that dogs, even among those breeds with well-recognized olfactory capabilities, have reduced CP surface areas relative to body size compared with both the wolf and coyote (Bird et al., 2021). Previously, these authors studied all mammalian superorders and demonstrated that relative CP size is closely correlated with the number of OR genes in a species' genome, establishing CP size as a metric for evolutionary expansions or losses in the mammalian olfactory systems (Bird et al., 2018). These differences could further be examined to determine the comparative morphological changes in the MOB of wild and domestic canids.

Finally, whether similar changes as those found in the dog can be observed in other domesticated mammals, such as the cat, remains to be determined. However, cats have a shorter domestication period than dogs; dogs are estimated to have been domesticated approximately 33,500 years ago (Perri, 2016), whereas the earliest evidence of domestic cats dates to approximately 9500 years ago in Cyprus and approximately 5000 years ago in central China (Vigne et al., 2004; Hu et al., 2014). Cats and humans were thought to interact throughout this period in a commensal manner, in which tamed and domestic cats intermixed with wild subspecies, which could account for the reduced differentiation observed between wild and domestic cat genomes (Montague et al., 2014). Furthermore, the morphological, physiological, behavioral, and ecological traits of cats do not appear to have been greatly affected by the domestication process (Zeder, 2012), in contrast with observations made for the dog (Axelsson et al., 2013). Currently, no studies are available examining the AOB of wild cats, making it impossible to assess whether morphofunctional changes can be observed between the AOBs of wild and domestic cats.

In summary, in this study, we morphofunctionally characterized the fox AOB, providing useful information toward understanding the VNS of wild canids. This in-depth, histological, immunohistochemical, and lectin-histochemical study demonstrated that the fox AOB presents unique characteristics and a higher degree of morphological development compared with the dog AOB. These morphofunctional findings suggest that a decrease in the anatomical complexity of the accessory olfactory system occurred at some point during the evolutionary history of dogs and opens a new research avenue for studying the effects of domestication on brain structures.

Acknowledgments

Special thanks are due to Alejandro García MD, DVM for his artistic drawings of the AOB topography. The red foxes used in this study were provided by the Wildlife Recovery Centres of Galicia, Dirección Xeral de Patrimonio Natural (Xunta de Galicia, Spain) and by Federación Galega de Caza.

Author contributions

P.S.Q. and I.O.L. designed the research and wrote the paper. P.S.Q., I.O.L., and M.T. performed the work, and P.S.Q., I.O.L., M.T., P.V., L-E.F. and A.L.B performed analyzed and discussed the results.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Ethical approval

All the animals employed in this study died by natural causes.

Funding

This work was supported by a University of Santiago de Compostela, Spain, grant [1551-8179] to P.S.Q.

References

- Adrio, F., Rodríguez-Moldes, I., Anadón, R., 2011. Distribution of glycine immunoreactivity in the brain of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*): comparison with γ -aminobutyric acid. *J. Comp. Neurol.* 519, 1115–1142. <https://doi.org/10.1002/cne.22556>
- Allen, N.J., Lyons, D.A., 2018. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362, 181–185. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M.L., Maqbool, K., Webster, M.T., Perloski, M., Liberg, O., Arnemo, J.M., Hedhammar, A., Lindblad-Toh, K., 2013. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495, 360–364. <https://doi.org/10.1038/nature11837>
- Bailey, M.S., Shipley, M.T., 1993. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J. Comp. Neurol.* 28, 501–526. <https://doi.org/10.1002/cne.903280405>
- Baron, G., Stephan, H., Frahm, H.D., 1996. Comparative neurobiology in Chiroptera. Vols. 1, 2, and 3. Burkhauser Verlag, Berlin.
- Barrios, A.W., Núñez, G., Sánchez Quinteiro, P., Salazar, I., 2014. Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front. Neuroanat.* 8, 63. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00063>
- Belyaev, D.K., Plyusina, I.Z., Trut, L.N., 1985. Domestication in the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm.): changes in physiological boundaries of the sensitive period of primary socialization. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 13, 359–370. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(85\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0168-1591(85)90015-2)
- Berghard, A., Buck, L.B., 1996. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G α o, G α i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J. Neurosci.* 16, 909–918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-00909.1996>
- Bird, D.J., Jacquemont, C., Buelow, S.A., Evans, A.W., Van Valkenburgh, B., 2021. Domesticating olfaction: Dog breeds, including scent hounds, have reduced cribriform plate morphology relative to wolves. *Anat. Rec.* 304, 139–153. <https://doi.org/10.1002/ar.24518>
- Bird, D.J., Murphy, W.J., Fox-Rosales, L., Hamid, I., Eagle, R.A., Van Valkenburgh, B., 2018. Olfaction written in bone: cribriform plate size parallels olfactory receptor gene repertoires in Mammalia. *Proc. Biol. Sci.* 285, 20180100. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0100>
- Bock, P., Rohn, K., Beineke, A., Baumgärtner, W., Wewetzer, K., 2009. Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *J. Anat.* 215, 522–535. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01147.x>
- Cajal, S.R., 1902. Textura del lóbulo olfativo accesorio. *Rev. Microsc.* 1, 141–150.
- Clancy, A.N., Coquelin, A., Macrides, F., Gorski, R.A., Noble, E.P., 1984. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *J. Neurosci.* 4, 2222–2229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-09-02222.1984>
- Coppola, J., Disney, A., 2018. Most calbindin-immunoreactive neurons, but few calretinin-immunoreactive neurons, express the m1 acetylcholine receptor in the middle temporal visual area of the macaque monkey. *Brain Behav.* 8, e01071 <https://doi.org/10.1002/brb3.1071>
- De Góis Morais, P.L.A., Paiva, K.M., Oliveira, R.F., Santana, M.A.D., Guzen, F.P., Engelberth, R.C.G.J., de Souza Cavalcante, J., Nascimento, E.S., Cavalcanti, J.R.L.P., 2021. Distribution and morphology of calbindin neurons in the Amygdaloid Complex of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J. Chem. Neuroanat.* 112, 101914 <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101914>
- De la Rosa-Prieto, C., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Bañon, I., Argandoña-Palacios, L., García-Muñozguren, S., Martínez-Marcos, A., 2010. Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice. *Dev. Neurobiol.* 70, 961–970 <https://doi.org/10.1002/dneu.20838>
- Dehmelt, L., Halpain, S., 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6, 204. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-204>
- Del Cerro, M.C., 1998. Role of the vomeronasal input in maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology* 23, 905–926. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(98\)00060-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(98)00060-2)
- Dennis, J.C., Allgier, J.G., Desouza, L.S., Eward, W.C., Morrison, E.E., 2003. Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. *J. Anat.* 202, 515–524. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00190.x>
- Frahm, H.D., Bhatnagar, K.P., 1980. Comparative morphology of the accessory olfactory bulb in bats. *J. Anat.* 130, 349–365.
- Gonzalez-Lozano, M.A., Klemmer, P., Gebuis, T., Hassan, C., van Nierop, P., van Kesteren, R.E., Smit, A.B., Li, K.W., 2016. Dynamics of the mouse brain cortical synaptic proteome during postnatal brain development. *Sci. Rep.* 6, 35456. <https://doi.org/10.1038/srep35456>
- Graphodatsky, A.S., Perelman, P.L., Sokolovskaya, N.V., Beklemisheva, V.R., Serdukova, N.A., Dobigny, G., O'Brien, S.J., Ferguson-Smith, M.A., Yang, F., 2008. Phylogenomics of the dog and fox family (Canidae, Carnivora) revealed by chromosome painting. *Chromosome Res.* 16, 129–143. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1203-5>
- Gutiérrez-Castellanos, N., Pardo-Bellver, C., Martínez-García, F., Lanuza, E., 2014. The vomeronasal cortex – afferent and efferent projections of the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in mice. *Eur. J. Neurosci.* 39, 141–158. <https://doi.org/10.1111/ejn.12393>
- Halpern, M., 1987. The organization and function of the vomeronasal system. *Ann. Rev. Neurosci.* 10, 325–362. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.10.030187.001545>
- Halpern, M., Martínez-Marcos, A., 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog. Neurobiol.* 70, 245–318. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00103-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00103-5)
- Hecht, E.E., Kukekova, A.V., Gutman, D.A., Acland, G.M., Preuss, T.M., Trut, L.N., 2021. Neuromorphological changes following selection for tameness and aggression in the Russian fox-farm experiment. *J. Neurosci.* 41, 6144–6156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-20.2021>. (Advance online publication).
- Hermanowicz-Sobieraj, B., Bogus-Nowakowska, K., Robak, A., 2018. Calcium-binding proteins expression in the septum and cingulate cortex of the adult guinea pig. *Ann. Anat.* 215, 30–39 <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.09.009>
- Herrada, G., Dulac, C., 1997. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90, 763–773. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80536-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80536-x)
- Holy, T.E., 2018. The accessory olfactory system: innately specialized or microcosm of mammalian circuitry? *Ann. Rev. Neurosci.* 41, 501–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061916>
- Hu, Y., Hu, S., Wang, W., Wu, X., Marshall, F.B., Chen, X., Hou, L., Wang, C., 2014. Earliest evidence for commensal processes of cat domestication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 111, 116–120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311439110>
- Ibarra-Soria, X., Levitin, M.O., Saraiva, L.R., Logan, D.W., 2014. The olfactory transcriptomes of mice. *PLoS Genet.* 10, e1004593. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004593>
- Ichikawa, M., Osada, T., Ikai, A., 1992. Bandeiraea simplicifolia lectin I and Vicia villosa agglutinin bind specifically to the vomeronasal axons in the accessory olfactory bulb of the rat. *Neurosci. Res.* 13, 73–79. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(92\)90035-b](https://doi.org/10.1016/0168-0102(92)90035-b)
- Jawlowski, H., 1956. On the bulbus olfactorius and bulbus olfactorius accessorius of some mammals. *Lub. Univ. Marii Curie-Sklodowskiej Roczn. Annls. Dzial. Nauk. Biol.* 10, 67–86.
- Jeziński, T., Ensminger, J., Papet, L.E., 2016. Canine Olfaction Science and Law: Advances in Forensic Science, Medicine, Conservation, and Environmental Remediation. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- Jia, C., Halpern, M., 2004. Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *J. Morphol.* 259, 271–280. <https://doi.org/10.1002/jmor.10166>
- Kaminski, J., Marshall-Pescini, S., 2014. *The Social Dog: Behaviour and Cognition*. Academic Press.
- Kondoh, D., Kamikawa, A., Sasaki, M., Kitamura, N., 2017. Localization of α 1-2 fucose glycan in the mouse olfactory pathway. *Cells Tiss. Org.* 203, 20–28. <https://doi.org/10.1159/000447009>
- Koo, J.H., Saraswati, M., Margolis, F.L., 2005. Immunolocalization of Bex protein in the mouse brain and olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 487, 1–14 <https://doi.org/10.1002/cne.20486>
- Kotani, T., Murata, Y., Ohnishi, H., Mori, M., Kusakari, S., Saito, Y., Okazawa, H., Bixby, J.L., Matozaki, T., 2010. Expression of PTPRO in the interneurons of adult mouse olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 518, 119–136 <https://doi.org/10.1002/cne.22239>
- Kukekova, A.V., Johnson, J.L., Xiang, X., Feng, S., Liu, S., Rando, H.M., Kharlamova, A.V., Herbeck, Y., Serdyukova, N.A., Xiong, Z., Beklemisheva, V., Koepfli, K.P., Gulevich, R.G., Vladimirova, A.V., Hekman, J.P., Perelman, P.L., Graphodatsky, A.S., O'Brien, S.J., Wang, X., Clark, A.G., Zhang, G., 2018. Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 1479–1491. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0611-6>
- Kukekova, A.V., Trut, L.N., Acland, G.M., 2014. Genetics of domesticated behavior in dogs and cfoxes. In: Grandin, T., Deesing, M.J. (Eds.), *Genetics and the Behavior of Domestic Animals*. Cambridge Academic Press.
- Larriva-Sahd, J., 2008. The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 510, 309–350. <https://doi.org/10.1002/cne.21790>
- Liu, W., Chen, L., Zhang, S., Hu, F., Wang, Z., Lyu, J., Wang, B., Xiang, H., Zhao, R., Tian, Z., Ge, S., Wang, W., 2019. Decrease of gene expression diversity during domestication of animals and plants. *BMC Evol. Biol.* 19, 19. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1340-9>
- Martínez-Ricós, J., Agustín-Pavón, C., Lanuza, E., Martínez-García, F., 2008. Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience* 153, 383–395. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.002>
- Matsunami, H., Buck, L.B., 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90, 775–784. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80537-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80537-1)
- McLean, S., Nichols, D.S., Davies, N.W., 2021. Volatile scent chemicals in the urine of the red fox, *Vulpes vulpes*. *PLoS One* 16, e0248961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248961>
- Meisami, E., Bhatnagar, K.P., 1998. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc. Res. Tech.* 43, 476–499. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981215\)43:6<476::AID-JEMT2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<476::AID-JEMT2>3.0.CO;2-V)
- Miodonski, R., 1968. Bulbus olfactorius of the dog (*Canis familiaris*). *Acta Biol. Crac.* 11, 65–75.
- Montague, M.J., Li, G., Gandolfi, B., Khan, R., Aken, B.L., Searle, S.M., Minx, P., Hillier, L.W., Koboldt, D.C., Davis, B.W., Driscoll, C.A., Barr, C.S., Blackstone, K., Quilez, J., Lorente-Galdos, B., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Thomas, G.W., Hahn, M.W., Menotti-Raymond, M., O'Brien, S.J., Wilson, R.K., Lyons, L.A., Murphy, W.J., Warren, W.C., 2014. Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 111, 17230–17235. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410083111>

- Nakajima, T., Sakae, M., Kato, M., Saito, S., Ogawa, K., Taniguchi, K., 1998. Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on the accessory olfactory bulb of the dog. *Anat. Rec.* 252, 393–402. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199811\)252:3<393::AID-AR7>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199811)252:3<393::AID-AR7>3.0.CO;2-T)
- Nawaz, S., Akkaya, Özden, Dikmen, Ö., Altunbaş, T., Yağci, K., Kibria, A., Erdoğan, A.S.M.G., Çelik, H.A.M., 2020. Molecular characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells with an underlying focus on their comparative neuronal potential at different passages. *Ann. Anat.* 228, 151452. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151452>.
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Villamayor, P.R., López-Beceiro, A., Sanchez-Quintero, P., 2020. The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *J. Anat.* 237, 890–906. <https://doi.org/10.1111/joa.13254>
- Pageat, P., Gaultier, E., 2003. Current research in canine and feline pheromones. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 187–211. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(02)00128-6)
- Pallé, A., Montero, M., Fernández, S., Tezanos, P., de Las Heras, J.A., Luskey, V., Birnbaumer, L., Zufall, F., Chamero, P., Trejo, J.L., 2020. $Goi2^+$ vomeronasal neurons govern the initial outcome of an acute social competition. *Sci. Rep.* 10, 894. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57765-6>
- Papes, F., Logan, D.W., Stowers, L., 2010. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* 141, 692–703. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.037>
- Pardo-Bellver, C., Martínez-Bellver, S., Martínez-García, F., Lanuza, E., Teruel-Martí, V., 2017. Synchronized activity in the main and accessory olfactory bulbs and vomeronasal amygdala elicited by chemical signals in freely behaving mice. *Sci. Rep.* 7, 992424. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10089-4>
- Park, C., Ahn, M., Lee, J.Y., Lee, S., Yun, Y., Lim, Y.K., Taniguchi, K., Shin, T., 2014. A morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochem.* 116, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.08.003>
- Perri, A., 2016. A wolf in dog's clothing: Initial dog domestication and Pleistocene wolf variation. *J. Archaeol. Sci.* 68, 1–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2016.02.0030305-4403/>.
- Popova, N.K., 2006. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays* 28, 495–503. <https://doi.org/10.1002/bies.20412>
- Prince, J.E., Cho, J.H., Dumontier, E., Andrews, W., Cutforth, T., Tessier-Lavigne, M., Parnavelas, J., Cloutier, J.F., 2009. Robo-2 controls the segregation of a portion of basal vomeronasal sensory neuron axons to the posterior region of the accessory olfactory bulb. *J. Neurosci.* 29, 14211–14222. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3948-09.2009>.
- Ramakers, G.J., Verhaagen, J., Oestreich, A.B., Margolis, F.L., van Bergen en Henegouwen, P.M., Gispén, W.H., 1992. Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in the mouse olfactory bulb: predominant presence in preterminal axons. *J. Neurocytol.* 21, 853–869. <https://doi.org/10.1007/BF01191683>
- Ryba, N.J., Tirindelli, R., 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19, 371–379. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80946-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80946-0)
- Salazar, I., Barber, P.C., Cifuentes, J.M., 1992. Anatomical and immunohistological demonstration of the primary neural connections of the vomeronasal organ in the dog. *Anat. Rec.* 233, 309–313. <https://doi.org/10.1002/ar.1092330214>
- Salazar, I., Cifuentes, J.M., Sánchez-Quintero, P., 2013. Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *Anat. Rec.* 296, 146–155. <https://doi.org/10.1002/ar.22617>
- Salazar, I., Cifuentes, J.M., Sánchez-Quintero, P., Garcia Caballero, T., 1994. Structural, morphometric, and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. *Anat. Rec.* 240, 277–285. <https://doi.org/10.1002/ar.1092400216>
- Salazar, I., Sánchez-Quintero, P., 1998. Supporting tissue and vasculature of the mammalian vomeronasal organ: the rat as a model. *Microsc. Res. Tech.* 41, 492–505. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980615\)41:6<492::AID-JEMT5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980615)41:6<492::AID-JEMT5>3.0.CO;2-P)
- Salazar, I., Sánchez-Quintero, P., 2009. The risk of extrapolation in neuroanatomy: the case of the Mammalian vomeronasal system. *Front. Neuroanat.* 3, 22. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.022.2009>
- Salazar, I., Sánchez-Quintero, P., 2011. A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microsc. Res. Tech.* 74, 1109–1120. <https://doi.org/10.1002/jemt.21002>
- Salazar, I., Sánchez-Quintero, P., Alemañ, N., Cifuentes, J.M., Troconiz, P.F., 2007. Diversity of the vomeronasal system in mammals: the singularities of the sheep model. *Microsc. Res. Tech.* 70, 752–762. <https://doi.org/10.1002/jemt.20461>
- Salazar, I., Sanchez-Quintero, P., Barrios, A.W., López Amado, M., Vega, J.A., 2019. Anatomy of the olfactory mucosa. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 164. Elsevier B.V., pp. 47–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00004-6>
- Salazar, I., Sanchez-Quintero, P., Lombardero, M., Cifuentes, J.M., 2000. A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. *J. Anat.* 196, 15–22. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19610015.x>
- Salazar, I., Sánchez-Quintero, P., Lombardero, M., Cifuentes, J.M., 2001. Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mouse using a panel of lectins. *Chem. Senses* 26, 645–652. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.6.645>
- Sam, M., Vora, S., Malnic, B., Ma, W., Novotny, M.V., Buck, L.B., 2001. Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature* 412, 142. <https://doi.org/10.1038/35084137>
- Shapiro, L.S., EE, P.L., Halpern, M., 1995. Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in opossum chemosensory systems during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. *J. Morphol.* 224, 331–349. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052240307>
- Shibata, S., Cho, K.H., Kim, J.H., Abe, H., Murakami, G., Cho, B.H., 2013. Expression of hyaluronan (hyaluronic acid) in the developing laminar architecture of the human fetal brain. *Ann. Anat.* 19, 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.07.002>
- Skoglund, P., Ersmark, E., Palkopoulou, E., Dalén, L., 2015. Ancient wolf genome reveals an early divergence of domestic dog ancestors and admixture into high-latitude breeds. *Curr. Biol.* 25, 1515–1519. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.019>
- Sundman, A.S., Pértille, F., Lehmann Coutinho, L., Jazin, E., Guerrero-Bosagna, C., Jensen, P., 2020. DNA methylation in canine brains is related to domestication and dog-breed formation. *PLoS One* 15, e0240787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240787>
- Switzer 3rd, R.C., Johnson, J.L., Kirsch, J.A., 1980. Phylogeny through brain tracts. Relation of lateral olfactory tract fibers to the accessory olfactory formation as a palimpsest of mammalian descent. *Brain Behav. Evol.* 17, 339–363. <https://doi.org/10.1159/000121808>
- Takigami, S., Mori, Y., Ichikawa, M., 2000. Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chem. Senses* 25, 387–393. <https://doi.org/10.1093/chemse/25.4.387>
- Tolivia, J., Tolivia, D., Navarro, A., 1988. New technique for differential staining of myelinated fibers and nerve cells on paraffin sections. *Anat. Rec.* 222, 437–440. <https://doi.org/10.1002/ar.1092220416>
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P.R., Ferreira, A., Rois, J.L., Sanchez-Quintero, P., 2020. The vomeronasal system of the newborn capybara: a morphological and immunohistochemical study. *Sci. Rep.* 10, 13304. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69994-w>
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P.R., Ferreira, A., Rois, J.L., Sanchez-Quintero, P., 2021. Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Struct. Funct.* 2. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02425-2>
- Trinh, K., Storm, D.R., 2003. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat. Neurosci.* 6, 519–525. <https://doi.org/10.1038/nn1039>
- Trut, L., Oskina, I., Kharlamova, A., 2009. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *Bioessays* 31, 349–360. <https://doi.org/10.1002/bies.200800070>
- Vigne, J.D., Guilaine, J., Debue, K., Haye, L., Gérard, P., 2004. Early taming of the cat in Cyprus. *Science* 304, 259. <https://doi.org/10.1126/science.1095335>
- Villamayor, P.R., Cifuentes, J.M., Quintela, L., Barcia, R., Sanchez-Quintero, P., 2020. Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Struct. Funct.* 225, 203–222. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01997-4>
- Wang, G., Shi, P., Zhu, Z., Zhang, Y.P., 2010. More functional V1R genes occur in nest-living and nocturnal terricolous mammals. *Genome Biol. Evol.* 2, 277–283. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq020>
- Wang, X., Pipes, L., Trut, L.N., Herbeck, Y., Vladimirova, A.V., Gulevich, R.G., Kharlamova, A.V., Johnson, J.L., Acland, G.M., Kukekova, A.V., Clark, A.G., 2018. Genomic responses to selection for tame/aggressive behaviors in the silver fox (*Vulpes vulpes*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 10398–10403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800889115>
- Wekesa, K.S., Anholt, R.R., 1999. Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system. *Brain Res.* 837, 117–126. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01630-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01630-3)
- Wyatt, T.D., 2003. *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wysocki, C.J., 1979. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3, 301–341. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(79\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0149-7634(79)90015-0)
- Young, J.M., Trask, B.J., 2007. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends Genet.* 23, 212–215. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.004>
- Zeder, M.A., 2012. Pathways to animal domestication. In: Gepts, P. (Ed.), *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution and Sustainability*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 227–259.
- Zimmerman, A.D., Munger, S.D., 2021. Olfactory subsystems associated with the necklace glomeruli in rodents. *Cell Tissue Res.* 383, 549–557. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03388-2>

4.3 PUBLICACIÓN NÚMERO 3

Ortiz-Leal I, Torres MV, López-Callejo LN, Fidalgo LE, López-Beceiro A, Sanchez-Quinteiro P. Comparative Neuroanatomical Study of the Main Olfactory Bulb in Domestic and Wild Canids: Dog, Wolf and Red Fox. *Animals (Basel)*. 12(9):1079 (2022).

doi: 10.3390/ani12091079.

Revista: *Animals (Basel)*

Año de publicación: 2022

Editorial: MDPI

ISSN: 2076-2615

Citas en Google Scholar: 5

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2022): 3.0

Factor de impacto de 5 años (2020): 3.2

Categoría (2022):

Anatomy & Morphology Q2 (6/22)

Agriculture, Dairy & Animal Science Q1 (D1) (12/62)

Veterinary Sciences Q1 (D1) (13/143)

Contribución del doctorando: I. O. L. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.



Autorización de la revista/editorial: Contenido reproducido bajo las condiciones de Copyright (2022) Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).



Copyright: © 2022 by the authors.
Licensee MDPI, Basel, Switzerland.
This article is an open access article
distributed under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license ([https://
creativecommons.org/licenses/by/
4.0/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

Article

Comparative Neuroanatomical Study of the Main Olfactory Bulb in Domestic and Wild Canids: Dog, Wolf and Red Fox

Irene Ortiz-Leal [†], Mateo V. Torres [†], Linda Noa López-Callejo, Luis Eusebio Fidalgo, Ana López-Beceiro 
and Pablo Sanchez-Quinteiro ^{*} 

Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av. Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain; irene.ortiz.leal@usc.es (I.O.-L.); mateovazquez.torres@usc.es (M.V.T.); noa1196@hotmail.com (L.N.L.-C.); luis.fidalgo@usc.es (L.E.F.); anam.lopez.beceiro@usc.es (A.L.-B.)

^{*} Correspondence: pablo.sanchez@usc.es

[†] These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: The study of the morphological, physiological and molecular changes associated with the domestication process has been one of the most interesting unresolved neuroanatomical issues. The olfactory system deserves special attention since both wild and domestic canids are macrosmatic mammals with very high olfactory capacities. Nevertheless, the question remains open as to whether domestication involuted the sense of smell in domestic dogs. Further, there is a lack of comparative morphological information on the olfactory bulb, the first structure integrating olfactory sensory information in the brain. To provide comparative information on the domestication process, we studied the olfactory bulb of dogs and their two most important wild ancestors: the wolf and the fox. The study was carried out by macroscopic dissection and histological and immunohistochemical techniques and has allowed us to verify, first of all, that the three species present olfactory bulbs corresponding to a macrosmatic animal, but that there are noticeable differences not only in size, which was already known, but also in the cellularity and intensity of the immunohistochemical pattern characteristic of each species. These variations point to a reduction of the olfactory system as a consequence of the selection pressure associated with the domestication of animals.

Abstract: The sense of smell plays a fundamental role in mammalian survival. There is a considerable amount of information available on the vomeronasal system of both domestic and wild canids. However, much less information is available on the canid main olfactory system, particularly at the level of the main olfactory bulb. Comparative study of the neuroanatomy of wild and domestic canids provides an excellent model for understanding the effects of selection pressure associated with domestication. A comprehensive histological (hematoxylin–eosin, Nissl, Tolivia and Gallego's Trichrome stains), lectin (UEA, LEA) and immunohistochemical (Gαo, Gαi2, calretinin, calbindin, olfactory marker protein, glial fibrillary acidic protein, microtubule-associated protein 2) study of the olfactory bulbs of the dog, fox and wolf was performed. Our study found greater macroscopic development of the olfactory bulb in both the wolf and fox compared to the dog. At the microscopic level, all three species show a well-developed pattern of lamination and cellularity typical of a macrosmatic animal. However, greater development of cellularity in the periglomerular and mitral layers of wild canids is characteristic. Likewise, the immunohistochemical study shows comparable results between the three species, but with a noticeably higher expression of markers in wild canids. These results suggest that the reduction in encephalization experienced in dogs due to domestication also corresponds to a lower degree of morphological and neurochemical differentiation of the olfactory bulb.

Keywords: Canidae; olfactory system; immunohistochemistry; lectins; domestication



Citation: Ortiz-Leal, I.; Torres, M.V.; López-Callejo, L.N.; Fidalgo, L.E.; López-Beceiro, A.; Sanchez-Quinteiro, P. Comparative Neuroanatomical Study of the Main Olfactory Bulb in Domestic and Wild Canids: Dog, Wolf and Red Fox. *Animals* **2022**, *12*, 1079. <https://doi.org/10.3390/ani12091079>

Academic Editor: José Raduan Jaber Mohamad

Received: 1 April 2022

Accepted: 21 April 2022

Published: 21 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Among all mammalian sensory systems, the sense of smell plays a fundamental role in mammalian survival, especially in terms of reproduction, food selection, recognition of predators and conspecifics [1–3]. In the case of Canidae, the olfactory capability is extraordinary, as much as 10,000–100,000 times that of the average human, and has a lower limit of detectability for volatile compounds of one part per trillion [4,5]. Olfaction involves two primary systems: the main olfactory system (MOS) and the accessory olfactory system, also known as the vomeronasal system (VNS). The olfactory epithelium (OE) of the MOS senses a large array of odorants, mainly volatile, which generate a conscious response, the smell [6–8]. These compounds are detected by the neuroreceptor cells of the main olfactory epithelium (MOE) which project to the main integrative center of the OS, the main olfactory bulb (MOB) [9,10]. In contrast, the VNS responds to critical signals for sexual and social behaviors [11,12], but without producing a conscious perception of the chemical molecules detected, mainly pheromones and kairomones [13–15]. The VNS system comprises a tubular sensory structure, the vomeronasal organ (VNO) [16,17], and its first integrative center in the brain is the accessory olfactory bulb (AOB) [18,19].

There is a considerable amount of neuroanatomical and neurochemical information available on the receptor and integrative structures of the vomeronasal system at the level of the VNO [20,21] and the AOB [22–24] in both domestic and wild canids. However, much less information is available on the canid MOS, particularly at the level of the first integrative center, the MOB [25]. To our knowledge, only classical neuroanatomical studies such as those carried out by Jawlowski [26] and Miodonski [27] in the dog and fox and more recent studies on the immunohistochemistry of calcium-binding proteins in the dog MOB [28] and the morphological and neurochemical characterization of the olfactory bulb of the African wild dog [29] are noteworthy.

The comparative study of the neuroanatomy of wild and domestic canids has the additional interest of providing an excellent model for assessing and understanding the effects of selection pressure associated with domestication on the configuration of neural structures that support species-specific behaviors [30,31]. In the case of the olfactory system, the study by Bird et al. [32] suggests that there is a loss of olfactory capacity in dogs compared to two wild canids, the coyote and gray wolf. This conclusion is based on morphometric analysis of the cribriform plate (CP) surface area relative to body size, as these authors previously demonstrated that the relative CP size is closely correlated with the number of olfactory receptor genes in a species' genome [33]. In the case of the structural configuration of the olfactory bulb, there is, to our knowledge, no comparative study of the effects of domestication. However, there is a significant precedent in a comparative study of the accessory olfactory bulb of the dog and fox [34], in which remarkable differences in cellularity, lamination and neurochemical properties have been found that point to involution as a consequence of domestication.

We have undertaken an exhaustive comparative study of the main olfactory bulb of the three most-relevant species of the Canidae family—dog, fox and wolf—in order to fill the existing gaps in the neuroanatomical study of the main olfactory bulb of canids and to evaluate the existence of qualitative differences that could support a hypothetical involution of the main olfactory bulb as a consequence of domestication.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Three red foxes (*Vulpes vulpes*), three wolves (*Canis lupus signatus*) and three dogs (*Canis lupus familiaris*) were employed for this study. All of them were adult males. The foxes came from activities organized by the Galician Hunting Federation. They were obtained in the field, the same day of their shooting, with a maximum of two hours delay. The wolves came from wildlife recovery centers in the Galician provinces where they had arrived after fatal traumatic accidents. We used individuals that had died recently, and only those without external or internal head injuries were selected. All samples of foxes and wolves

were employed with the necessary permissions by the Galician Environment, Territory and Tenement Council (CMATV approval numbers EB-009/2020 and EB-007/2021). The three dogs necropsied were adult mesaticephalic dogs that came from the Department of Clinical Sciences of our School, where they had died due to clinical conditions. They were two German shepherds and one mastiff. The heads were intact and did not show clinical or postmortem evidence of neurological disease.

The whole brains containing the olfactory bulbs were extracted after opening dorsally the cranium and removing the lateral walls of the ethmoidal fossa with the help of an electric plaster cutter and a gouge clamp. In two animals of each species, the brains were preserved in Bouin's fixative for 24 h, and afterwards, they were transferred to 70% ethanol. The remaining brain was fixed in 10% formalin. Prior to sectioning, the brains were photographed to show the lateral, dorsal and ventral aspects. The olfactory bulbs were dissected out. The left and right OB from every single animal was separately embedded in paraffin wax and serially cut, one sectioned transversely and the other sagittally by a microtome with a thickness of 8 μm . The sections were mounted onto gelatin-coated slides, dewaxed and stained using haematoxylin-eosin, Nissl, Tolivia and Gallego's trichrome stains, and lectin histochemical and immunohistochemical techniques. For each of the species studied, the three animals sampled showed an analogous pattern in both their macroscopic and microscopic morphology at the level of lamination, cellularity and their reaction to histological staining, as well as in the pattern of the immunohistochemical and histochemical lectin labeling. The slides were examined and evaluated blindly by two investigators.

2.2. Tolivia Protocol

The procedure followed is explained in detail in Tolivia et al. [35]. Briefly, after deparaffinizing and hydrating, sections were mordanted for 1 h in 2.5% $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$. After 2.5 h, the sections were rinsed in a freshly made solution: 50 mL of 50% ethanol to which 5 mL of 20% hematoxylin and 10 mL of 1% Li_2CO_3 were added. Finally, sections were washed for 3×5 min prior to staining for 5 min in the following solution: 0.2% pyronine and 20% formaldehyde.

2.3. Gallego's Trichrome Protocol

This stain allows for the differentiation of components of the connective tissue. It stains erythrocytes green, muscle fibers and collagen light blue, epithelium and glandular tissue red, bone dark blue and cartilage purple. The protocol used was described in detail in Villamayor et al. [36] as follows: sections were first stained with Ziehl acetic fuchsin for 2 min. After several washes they were immersed into formalin-acetic acid solution for 5 min. After two more washes, the sections were finally stained with picroindigocarmine for 3–5 min.

2.4. Immunohistochemical Protocol

Antigen retrieval was not performed in our study. Deparaffinized and rehydrated samples were incubated for 15 min in a 3% H_2O_2 solution to inactivate endogenous peroxidase activity. A 2.5% horse normal serum from the ImmPRESS reagent kit anti-mouse IgG/anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used for 30 min to block nonspecific binding sites. The samples were then incubated with the primary antibody at 4 °C overnight. After two washes with 0.1 M phosphate-buffered (pH 7.2) solution (PB), samples were incubated for 20 min with either the ImmPRESS VR Polymer HRP anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG reagents (Table 1), except for the slides incubated with the anti-OMP antibody (raised in goat), which were incubated with a biotinylated anti-goat IgG for 1.5 h, and then incubated in avidin-biotin-peroxidase complex Vectastain reagent (ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). In all cases, successive 2×5 min PB washes were performed between steps. Finally, a 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen solution and a 0.003% H_2O_2 solution, both in 0.2 M Tris-HCl buffer, were used. The DAB

reagent develops into a brown precipitate in the presence of hydrogen peroxide solution, which enables visualization of the reaction. For better visualization of the DAB reaction product, the sections were not counterstained.

Table 1. Antibodies and lectins used, species of elaboration, dilution, catalogue number, manufacturer, target immunogens and relevant reference for each antibody, and RRID codes.

Antibody	1st Ab Species/Dilution	1st Ab Catalogue Number	Inmunogen	Reference	RRID	2nd Ab Species/Dilution, Catalogue No.
Anti-G α o	Rabbit/1:200	Santa Cruz Biotech. sc-387	Peptide mapping within a highly divergent domain of rat G α o	[37]	AB_2111641	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-G α i2	Rabbit/1:200	Santa Cruz Biotech. sc-7276	Peptide mapping within a highly divergent domain of rat G α i2	[38]	AB_2111472	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-OMP	Goat/1:400	Wako 544-10001	Rodent olfactory marker protein	[39]	AB_2315007	Horse anti-goat IgG 1:250 Vector BA-9500 ImmPRESS VR HRP
Anti-CB	Rabbit/1:6000	Swant CB38	Rat recombinant calbindin D-28k	[40]	AB_10000340	Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CR	Rabbit/1:6000	Swant 7697	Recombinant human calretinin with a 6-his tag at the N-terminus	[41]	AB_2619710	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-MAP-2	Mouse/1:400	Sigma M4403	Rat brain microtubule-associated proteins	[42]	AB_477193	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GFAP	Rabbit/1:400	Dako Z0334	GFAP from bovine spinal cord	[43]	AB_10013382	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
UEA	1:60	Vector L-1060				Rabbit 1:50 DAKO P289
LEA	20 μ m/mL	Vector B-1175				Vectastain ABC reagent PK-4000

For all immunohistochemical procedures, the omission of the primary antibody was used as a negative control, and no labeling or non-specific background staining was observed for any negative control samples. As positive controls, we replicated the immunohistochemical procedure in previously unstained mouse or rabbit tissue obtained during previous experiments. These samples were known to express the proteins of interest, and the expected positive results were obtained in all cases

2.5. Lectin Histochemistry Protocol

2.5.1. Lycopersicon Esculentum Agglutinin (LEA) Protocol

Biotinylated-conjugated LEA was employed (Table 1); 3% H₂O₂ and 2% BSA in PB were employed to inactivate endogenous peroxidase activity and to block nonspecific binding, respectively. Slides were then incubated overnight with LEA in a 0.5% BSA solution. Samples were washed 2 \times 2 min in PB, and afterwards incubated for 1.5 h at room temperature with ABC reagent, before development with a DAB chromogen (same protocol as for the immunohistochemical labeling).

2.5.2. Ulex Europaeus Agglutinin (UEA) Protocol

In this case, the slides were incubated for 1 h at room temperature in 0.5% BSA/UEA-I solution and then washed for 3 \times 5 min in PB solution. The slides were then incubated overnight with an anti-UEA peroxidase-conjugated antibody. The next day, the samples were washed with a PB solution. DAB solution was added to visualize the reaction.

Controls were performed for both protocols, both without the addition of lectins and with the pre-absorption of lectins, by using an excess amount of the corresponding sugar.

2.6. Acquisition of Images

Images were captured with a Karl Zeiss Axiocam MRc5 digital camera coupled to a Zeiss Axiophot microscope. Brightness, contrast and balance levels were adjusted using Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). No specific characteristics within the images were altered, enhanced, moved or introduced.

3. Results

3.1. Dog Olfactory Bulb

3.1.1. Macroscopic and Microscopic Anatomy

The major anatomical landmarks of the dog olfactory bulb are shown in Figure 1. Its main features correspond to the typical macroscopic mammal. It occupies the rostral aspect of the brain, and in a medial view of the hemiencephalon it notoriously projects rostrally (Figure 1D). A thick olfactory peduncle connects the olfactory bulb to the rest of the structures of the rhinencephalon (Figure 1C,E).

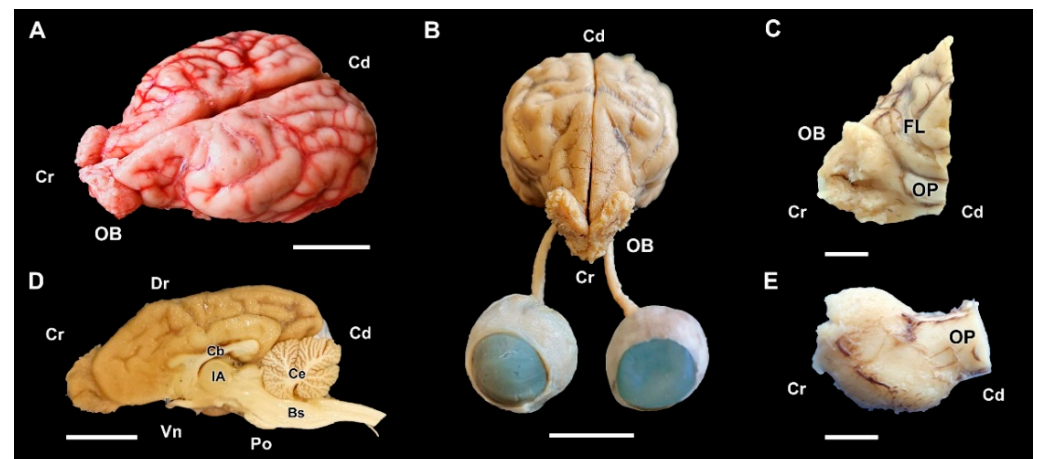


Figure 1. Macroscopic anatomy of the olfactory bulb (OB) of the dog. (A) Cranio-dorsolateral view of the encephalon. (B) Craniodorsal view showing the OB and its relationship to the optic nerves and eyes. (C) Lateral view of the left OB and the frontal lobe of the telencephalon (FL). (D) Medial view of the right hemiencephalon showing the rostral projection of the OB. (E) Dorsal view of the right OB. Bs, brainstem; Cb, callosal body; Ce, cerebellum; IA, interthalamic adhesion; OP, olfactory peduncle; Po, pons. Position terms: Cr, cranial; Cd, caudal; Dr, dorsal; Vn, ventral. (A): Unfixed brain; (B–E): Formalin fixation. Scale bars: (A,B,D): 2 cm; (C,E): 1 cm.

Microscopically, transverse sections of the OB stained both with hematoxylin–eosin (Figure 2A) and Nissl (Figure 2B) clearly show lamination of the nerve tissue, which is evenly distributed along the entire perimeter of the bulb. However, the thickness of the layers is appreciably greater in the lateral half of the bulb than in the medial half.

As is typical of the MOB across mammalian species, seven layers are readily identified (Figure 3A,B). Moving from the superficial to deep planes, these layers include:

1. Nerve layer (NL): formed by the axons of the olfactory nerves that reach the OB.
2. Glomerular layer (GIL): comprised of glomeruli, spherical structures delimited by periglomerular (PG) cells. They correspond to the synapses of olfactory axons with the dendrites of mitral cells, which are the second neurons in the olfactory pathways.
3. External plexiform layer (EPL): a nerve plexus mainly occupied by the dendrites of mitral cells.
4. Mitral cell layer (MCL): a linear layer containing the somas of mitral cells.

5. Internal plexiform layer (IPL): a thin band of white matter interposed between the mitral and granular layers.
6. Granular layer (GrL): composed of large clusters of granule cells, which act as inhibitory neurons in the OB neural circuit.
7. White matter (WM): formed by the projecting axons of the OB (Figure 2A,B).

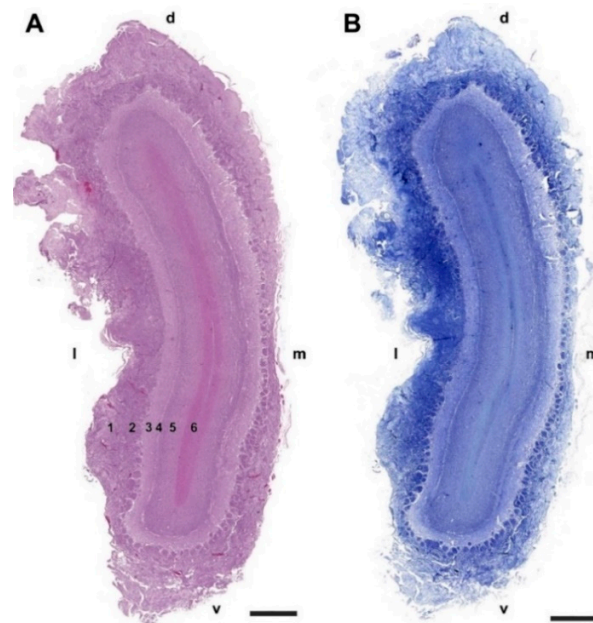


Figure 2. Transverse section of the olfactory bulb of the dog stained by hematoxylin–eosin (A) and Nissl staining (B). From superficial to deep the following layers are identified: (1) Olfactory nerve layer (NL); (2) Glomerular layer (GIL); (3) External plexiform layer (EPL); (4) Mitral cell layer (MCL); (5) Granular layer (GrL); (6) White matter. d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: 2 mm.

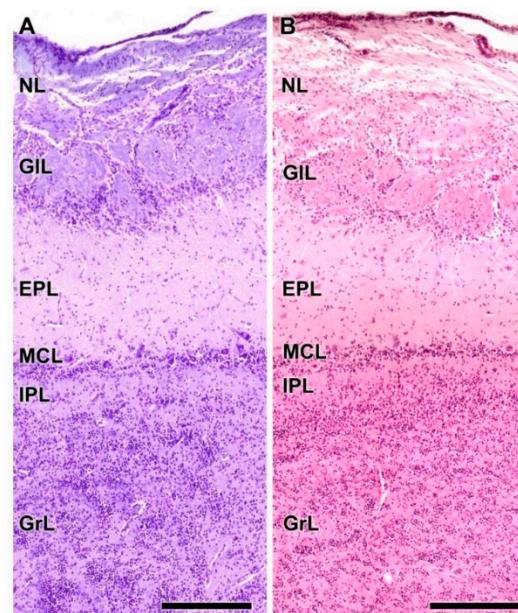


Figure 3. Histological study of the lamination of the olfactory bulb of the dog. Nissl (A) and hematoxylin–eosin staining (B) show the main layers of the MOB: olfactory nerve layer (NL), glomerular layer (GIL), external plexiform layer (EPL), mitral cell layer (MCL), internal plexiform layer (IPL) and granular layer (GrL). Scale bars: 250 μ m.

The olfactory nerve layer (Figure 4A,B) shows thick bundles of unmyelinated fibers that spread all over the surface of the OB. It is appreciable how particular bundles penetrate into the underlying layer of glomerulus (Figure 4C,D). The glomerular layer is comprised of large, spherical glomeruli, clearly delineated by the periglomerular cells, especially in their innermost part (Figure 4B). Rarely, the glomerular layer contains large neurons.

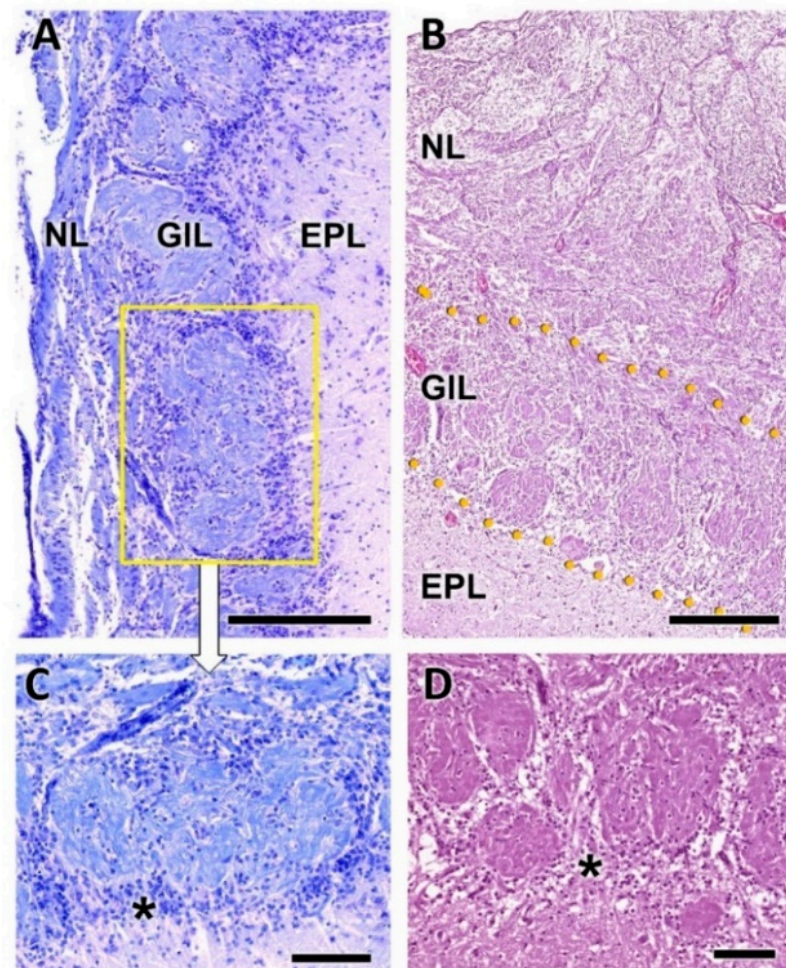


Figure 4. Histological study of the superficial layers of the olfactory bulb of the dog. (A) Nissl staining of the nerve layer (NL), glomerular layer (GIL) and external plexiform layer (EPL). (B) Hematoxylin–eosin staining. The GIL is outlined by yellow dots. (C) Enlargement of the box in (A), showing the periglomerular cells (*) concentrated in the border between the glomeruli and the EPL. Nissl staining. (D) Similar image of the glomerular layer stained by hematoxylin–eosin. Scale bars: (A,B): 250 μ m; (C,D): 100 μ m.

The outer plexiform layer contains some tufted cells, mainly in a deep plane close to the mitral cell layer (Figure 5A,B). The mitral cell layer consists of an irregular alignment of mitral cells, which are intermingled with granular cells. In a sagittal section of the OB, a higher concentration of mitral cells is observed (Figure 5B,C). This allows one to appreciate the different sizes and morphologies—triangular, mitral, elliptical—that mitral cells can present.

Gallego's trichrome staining highlights the arrangement of periglomerular cells (Figure 6A,C) and the granular cells in concentric alignments (Figure 6B,D). In a deeper plane, the white matter can be seen, which, as can be determined with Tolivia staining, is less rich in myelin fibers than the granule cell layer (Figure 6E).

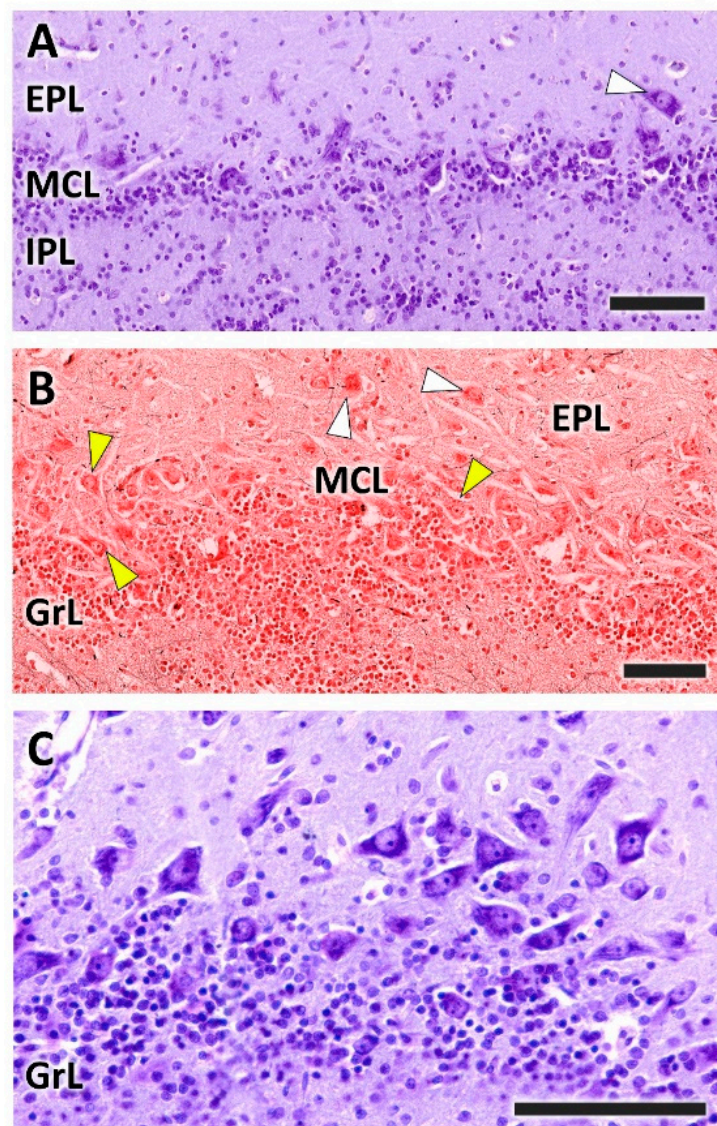


Figure 5. Histological study of the mitral cell layer of the olfactory bulb of the dog. (A,B) Nissl and Tolivia staining, respectively, of the mitral cell layer (MCL) showing typical mitral cells (yellow arrowheads) and deep tufted cells (white arrowheads) scattered along the boundaries between the external (EPL) and internal plexiform layers (IPL). (B,C) Sagittal section of the OB reveals a higher density of mitral cells, which are mitered or triangular in shape. Tolivia and Nissl staining, respectively. Scale bars: (A,B): 250 μ m; (C): 100 μ m.

3.1.2. Immunohistochemical and Lectin Histochemical Study

Each of the antibodies and lectins used had a characteristic labeling pattern. The outermost superficial layers, nerve and glomerular, were labeled in a specific manner by both anti-OMP (Figure 7A), a marker specific for mature olfactory neurons, and by the lectin LEA (Figure 7I), specific for *N*-acetyl-glucosamine. The glomerular morphology appears more sharply demarcated with LEA than with anti-OMP (Figure 8A,I). Anti-Gao, specific for the G protein α subunit, produces equally intense labeling in the superficial layers, but this protein, although with much less intensity, is also expressed in the deep layers of the bulb (Figures 7E and 8E). In contrast, the other G-protein subunit studied, α 2, is only faintly expressed in the glomerular layer (Figures 7F and 8F).

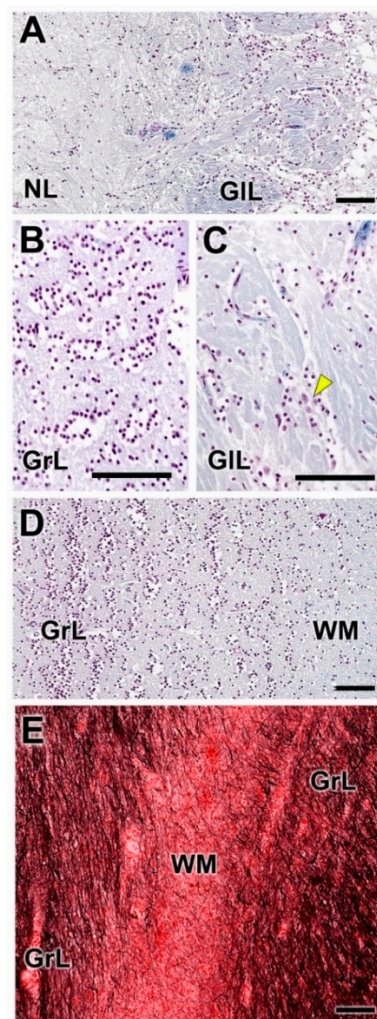


Figure 6. Histological study of the dog olfactory bulb stained with Gallego's trichrome and Tolivia staining. (A,C) Nerve and glomerular layers (NL and GIL, respectively). This staining allows good definition of the periglomerular cells. At higher magnification (C), scattered neurons with large somas are also found (arrowhead). (B,D) The granular layer (GrL) is formed by clusters of granule cells. (E). The deep area of the OB contains the white matter (WM). Tolivia staining shows a higher density of myelinic fibres in the GrL than in the WM. Scale bars: 100 μ m.

The calcium binding proteins calbindin (CB) and calretinin (CR) are expressed in both cases in all layers of the bulb, although with slightly different patterns (Figure 7B,C). In the case of CB, the glomerular, mitral plexiform and granular layers are immunostained (Figure 7B). At the cellular level, the periglomerular cells as well as the first dendritic arborizations of the mitral cell layer show CB immunopositivity (Figure 8B). In the case of CR, the two superficial layers, nerve and glomerular, show immunopositivity. At the cellular level, anti-CR produces immunopositivity in both periglomerular and granular cells (Figure 8C).

The dendritic projections of the mitral cells were labeled with antibodies against microtubule-associated protein 2 (MAP-2) (Figures 7D and 8D). Additionally, the glomerular layer showed intense, diffuse immunolabeling. Astrocytes and ensheathing cells were identified throughout the olfactory bulb by an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Figure 7G), with labeling being concentrated in the superficial layers, especially in the nerve layer, where ensheathing cell processes accompany the olfactory axon terminals (Figure 8G). Finally, UEA, an L-fucose specific lectin, produced a negative pattern in all layers of the olfactory bulb (Figures 7H and 8H).

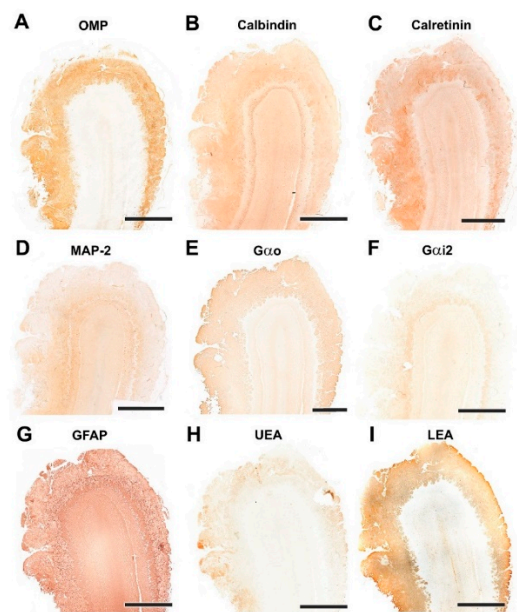


Figure 7. Immunohistochemical and lectin-histochemical study of the OB of the dog. (A) Anti-Olfactory marker protein (OMP). (B) Anti-Calbindin. (C) Anti-Calretinin. (D) Anti-MAP-2. (E) Anti-Gao. (F) Anti-Gai2. (G) Anti-GFAP. (H) UEA histochemical labeling. (I) LEA histochemical labeling. Scale bars: 2 mm.

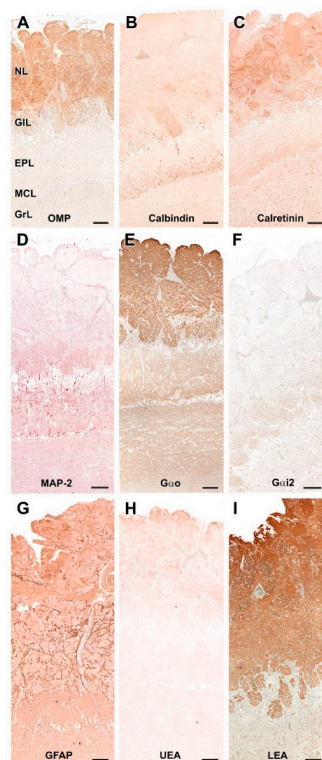


Figure 8. Immunohistochemical and lectin-histochemical study of the OB of the dog. (A) Anti-Olfactory marker protein (OMP). (B) Anti-Calbindin. (C) Anti-Calretinin. (D) Anti-MAP-2. (E) Anti-Gao. (F) Anti-Gai2. (G) Anti-GFAP. (H) UEA histochemical labeling. (I) LEA histochemical labeling. NL, Nerve layer. GIL, Glomerular layer. EPL, External plexiform layer. MCL, Mitral cell layer. IPL, Internal plexiform layer; GrL, Granular layer. Scale bars: 100 μm.

3.2. Wolf Olfactory Bulb

3.2.1. Macroscopic and Microscopic Anatomy

The macroscopic study of the wolf's brain shows well-developed olfactory bulbs, very prominent both in the lateral view of the brain (Figure 9A) and in the medial view of the hemiencephalon (Figure 9C,E). Also remarkable are the well-developed rhinencephalon, which features a broad olfactory pedunculi (Figure 9F) and piriform lobes of considerable width and convexity (Figure 9D).

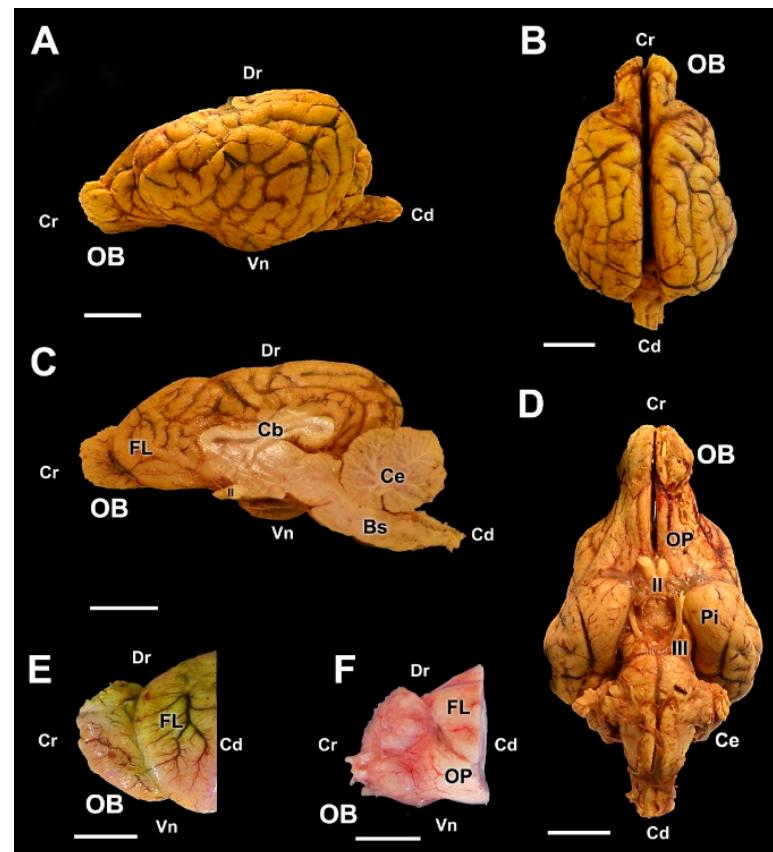


Figure 9. Macroscopic anatomy of the olfactory bulb (OB) of the wolf. (A,B) Lateral and dorsal view of the encephalon, respectively. (C) Medial view of the right hemiencephalon. (D) Ventral view of the encephalon. (E) Medial view of the right OB and the frontal lobe (FL) of the telencephalon. (F) Lateral view of the left OB and the frontal lobe of the telencephalon. (II) Optical nerve; (III) Oculomotor nerve; Bs, Brainstem; Cb, Callosal body; Ce, Cerebellum; OP, olfactory peduncle; Pi, Piriform lobe. Position terms: Cr, Cranial; Cd, Caudal; Dr, dorsal; Vn, Ventral. (A–E): Bouin's liquid fixation. (F): Unfixed sample. Scale bars: (A–D): 2 cm; (E,F): 1 cm.

Histological examination of the OB shows the typical mammalian lamination (Figures 10 and 11) with a degree of differentiation and development of the layers characteristic of macrosmatic species. The nerve and glomerular layers are particularly thick.

Both the nerve and the glomerular layer were characterized by Nissl and hematoxylin-eosin staining (Figure 12). The GIL consisted of 2–4 layers of glomeruli, surrounded by a high density of periglomerular cells (Figure 12D). The mitral cell layer showed, in both transverse (Figure 13C,E) and sagittal sections (Figure 13A,B), numerous mitral cells (arrowheads) featuring either big triangular or miter-shaped somas and very well-defined multidendritic projections.

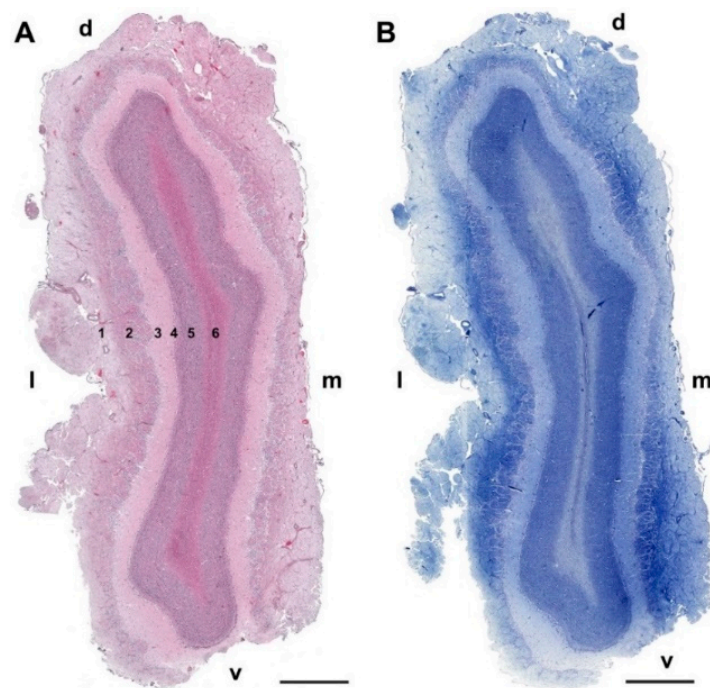


Figure 10. Transverse section of the olfactory bulb of the wolf stained by hematoxylin–eosin (A) and Nissl staining (B). From superficial to deep, the following layers are identified: (1) Olfactory nerve layer (NL); (2) Glomerular layer (GIL); (3) External plexiform layer (EPL); (4) Mitral cell layer (ML); (5) Granular layer (GrL); (6) White matter: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: 2 mm.

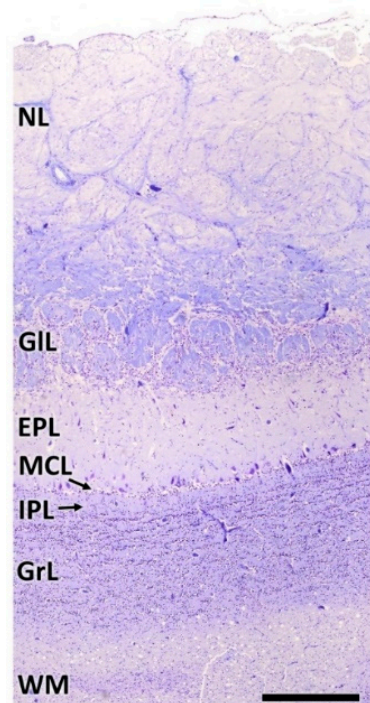


Figure 11. Lamination of the wolf OB. NL, Nerve layer. GIL, Glomerular layer. EPL, External plexiform layer. MCL, Mitral cell layer; IPL, Internal plexiform layer; GrL, Granular layer; WM, White matter. Nissl staining. Scale bar: 1 mm.

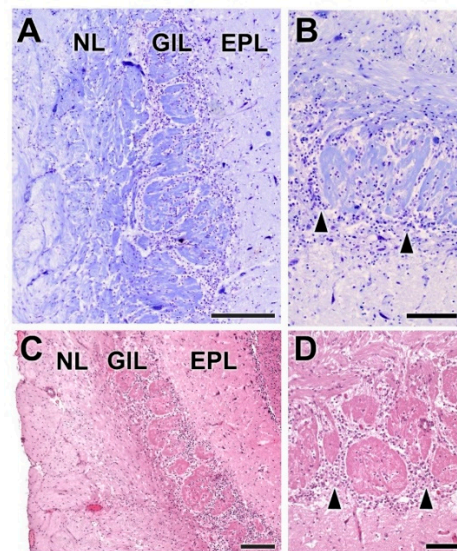


Figure 12. Histological study of the superficial layers of the olfactory bulb of the wolf. (A,B) Nissl staining of the nerve (NL), glomerular (GIL) and external plexiform (EPL) layers. The arrowheads indicate the presence of periglomerular cells. (C,D) Hematoxylin–eosin staining. The periglomerular cells are mainly located in the border between the glomeruli and the EPL (arrowheads). Scale bars: (A): 250 μm ; (B): 125 μm ; (C,D): 100 μm .

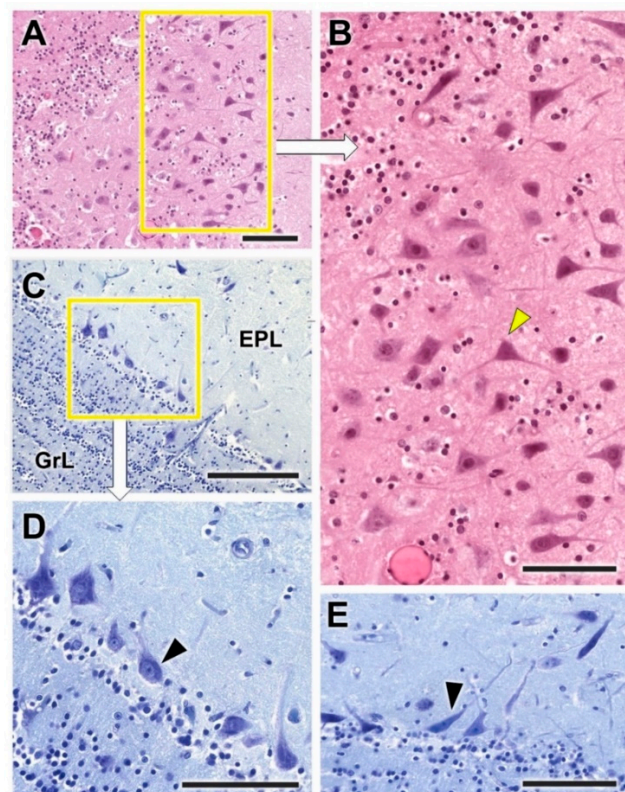


Figure 13. Histological study of the mitral cell layer of the olfactory bulb of the wolf. (A) Hematoxylin–eosin staining (box enlarged in (B)) of a sagittal section of the mitral cell layer (MCL) showing typical mitral cells (arrowheads) with big soma and very well-defined dendritic projections. (C–E) Nissl staining of transverse sections of the MCL showing the diverse morphology of the mitral cell somas. Scale bars: 100 μm .

3.2.2. Immunohistochemical and Lectin Histochemical Study

Immunohistochemical and lectin staining (Figures 14 and 15) show in the wolf a similar labeling pattern to that described in the dog, with a very clear definition of the layers. OMP (Figures 14A and 15A) and LEA (Figures 14I and 15I) are specific markers for the superficial layers of the OB, both nerve and glomerular layers, but do not stain the deep layers. This implies that the glomerular layer labeling derives exclusively from axonal afferences originating from the olfactory nerves. Gao (Figures 14E and 15E) is expressed in both the superficial layers and in the deep layers, mainly at the level of the mitral cell layer, which contributes to the labeling of the glomerular layer. Gai2 (Figures 14F and 15F) is immunonegative for the whole OB. In contrast to LEA, UEA lectin, as happens in the dog, does not stain the OB (Figures 14H and 15H).



Figure 14. Immunohistochemical and lectin-histochemical study of the OB of the wolf. (A) Anti-Olfactory marker protein (OMP); (B) Anti-Calbindin; (C) Anti-Calretinin; (D) Anti-MAP-2; (E) Anti-Gao; (F) Anti-Gai2; (G) Anti-GFAP; (H) UEA histochemical labeling; (I) LEA histochemical labeling. Scale bars: 2 mm.

The calcium-binding proteins CB (Figures 14B and 15B) and CR (Figures 14C and 15C), show a broad labeling pattern comprising both fibers and cellular elements. Both markers are highly expressed in periglomerular cells. Additionally, anti-CR produces intense labeling in granular cells. In addition to the surface layers, anti-CB stains the mitral cell layer intensely, but does not show immunoreactivity in the mitral cells themselves.

Anti-MAP-2 (Figures 14D and 15D) strongly stains the glomerular, external plexiform, mitral and granular layers. Not staining the olfactory nerve layer implies that glomerular immunopositivity corresponds to the dendrites of the deep cells of the OB, the most abundant being the mitral and granular cells. Finally, anti-GFAP (Figure 14G) reveals the dense network shaped by astrocytes and ensheathing cell prolongations. They are mostly concentrated in the superficial layers, where the processes distinctly delimit the fascicles of the olfactory nerves and glomerular formations (Figure 15G).

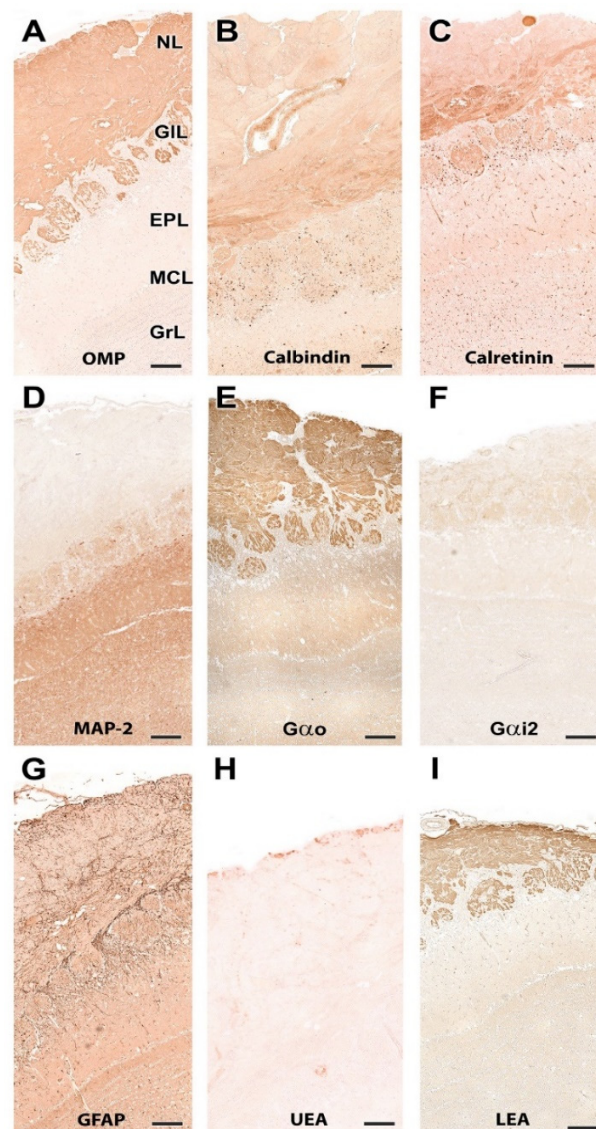


Figure 15. Immunohistochemical and lectin-histochemical study of the OB of the wolf. (A) Anti-Olfactory marker protein (OMP); (B) Anti-Calbindin; (C) Anti-Calretinin; (D) Anti-MAP-2; (E) Anti-Gao; (F) Anti-Gai2; (G) Anti-GFAP; (H) UEA histochemical labeling; (I) LEA histochemical labeling. NL, Nerve layer; GIL, Glomerular layer; EPL, External plexiform layer; MCL, Mitral cell layer; GrL, Granular layer. Scale bars: 100 μ m.

3.3. Fox Olfactory Bulb

3.3.1. Macroscopic and Microscopic Anatomy

A transverse section of the head at the level of the ethmoidal fossa (Figure 16), just between both eyes, shows the topographical relationships of the OB. The olfactory bulb is completely surrounded by the ethmoidal concha, which contains the olfactory neuroepithelium that projects the olfactory axons to the olfactory nerve layer of the olfactory bulb. Relative to brain size, the fox presents well-developed and kidney-shaped olfactory bulbs (Figure 17). In a ventral view of the brain, the rest of the structures of the rhinencephalon are visible: the olfactory peduncle, olfactory tubercle and the piriform lobe (Figure 17B).

Histological study of the fox OB shows a clear lamination (Figure 18) with a degree of differentiation and development of the layers typical of macrosmatic species. Both the nerve and glomerular layers are particularly thick in the lateral half of the OB.



Figure 16. Transverse macroscopic section of the head of the fox at the level of the olfactory bulb (OB) showing its main topographic relationships. (1) Olfactory bulb; (2) Ethmoidal concha; (3) Choanas; (4) Zygomatic gland; (5) Zygomatic arch; (6) Tongue; (7) Mandible; (8) Buccolingual recess. Scale bar: 2 cm.

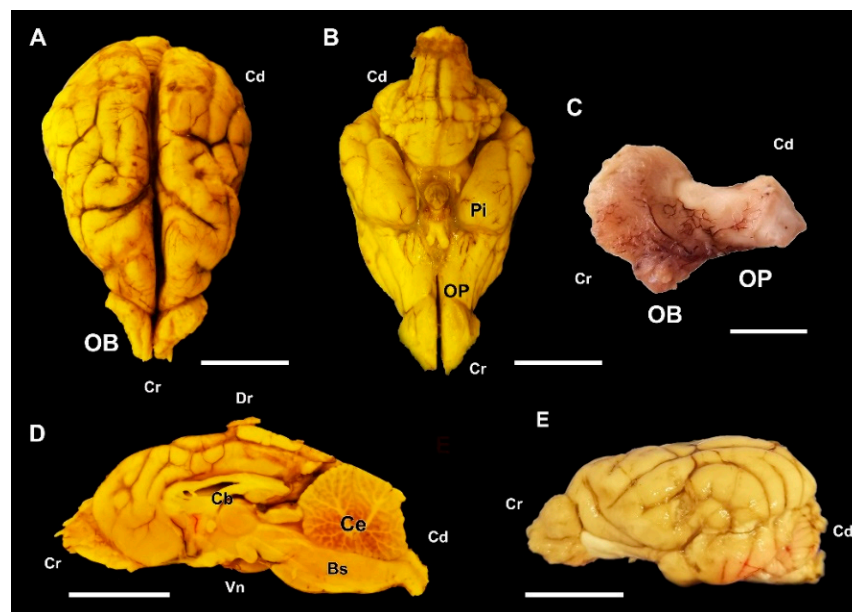


Figure 17. Macroscopic anatomy of the olfactory bulb (OB) of the fox. (A,B) Dorsal and ventral view of the encephalon, respectively. (C) Medial view of the right OB after removing the frontal lobe. (D) Medial view of the right hemiencephalon. (E) Lateral view of the encephalon. Bs, Brainstem; Cb, Callosal body; Ce, Cerebellum; OP, olfactory peduncle; Pi, Piriform lobe. Position terms: Cr, Cranial; Cd, Caudal; Dr, dorsal; Vn, Ventral. (A,B,D): Bouin's liquid fixation. (C,E): Formalin fixation. Scale bars: (A,B,D,E): 2 cm; (C): 0.5 cm.

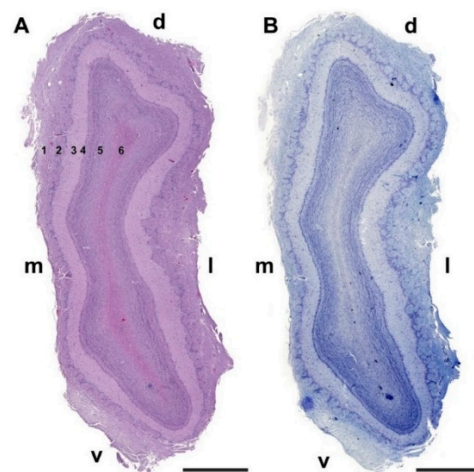


Figure 18. Transverse section of the olfactory bulb of the red fox stained by hematoxylin–eosin (A) and Nissl staining (B) From superficial to deep the following layers are identified: (1) Olfactory nerve layer (NL); (2) Glomerular layer (GIL); (3) External plexiform layer (EPL); (4) Mitral cell layer (ML); (5) Granular layer (GrL); (6) White matter: d, dorsal; l, lateral; m, medial; v, ventral. Scale bars: 2 mm.

Nissl and hematoxylin–eosin staining (Figures 19 and 20) were employed to histologically characterize the OB of the fox. The GIL consisted of 2–3 layers of glomeruli, smaller than those described in the wolf, but likewise surrounded by a high density of periglomerular cells (Figure 19C,D and Figure 21A). The mitral cell layer showed numerous mitral cells in both transverse (Figures 20A and 21B) and sagittal (Figure 20B) Nissl-stained sections, similar in shape and development of their processes to those found in the wolf. Deep to the mitral cell layer there was a thick band corresponding to the inner plexiform layer (Figure 21B), several concentric linear clusters of granular cells (Figure 21B) and a broad layer of white matter, mostly consisting of amyelinic fibers (Figure 21C).

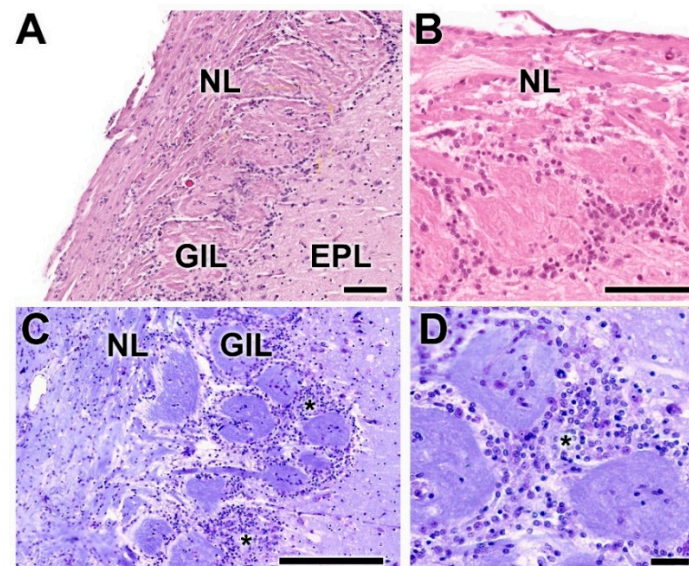


Figure 19. Histological study of the superficial layers of the olfactory bulb of the fox. (A,B) Hematoxylin–eosin staining of the nerve layer (NL), glomerular layer (GIL) and external plexiform layer (EPL). The asterisk indicates the presence of periglomerular cells. (C,D) Nissl staining. There is a high density of periglomerular cells in the border between the glomeruli and the EPL (asterisks). Scale bars: (A,B,D): 100 µm; (C): 250 µm.

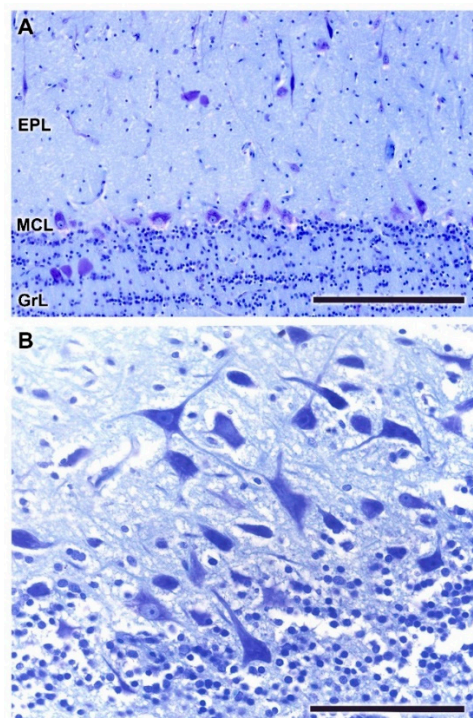


Figure 20. Histological study of the mitral cell layer of the olfactory bulb of the fox. (A) Nissl staining of a transverse section of the olfactory bulb showing mitral cell somas aligned along the MCL. (B) A sagittal section of the mitral cell layer (MCL) stained with Nissl staining shows the typical mitral cells characterized by their big soma and well-defined dendritic projections. Scale bars: (A): 250 μm . (B): 100 μm .

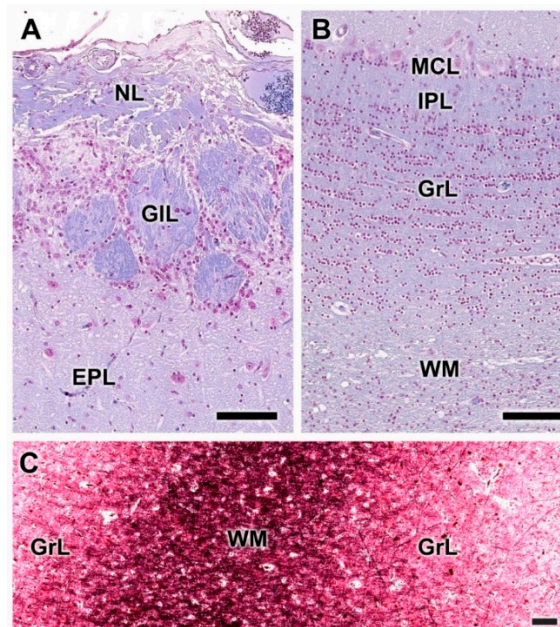


Figure 21. Histological study of the olfactory bulb of the fox stained with Gallego's trichrome. (A,B) Superficial and deep layers, respectively. The glomeruli are wholly surrounded by periglomerular cells. The granular layer (GrL) is formed by aligned clusters of granule cells. (C) Tolivia staining shows a high density of myelinic fibers in white matter (WM). Scale bars: 100 μm .

3.3.2. Immunohistochemical and Lectin Histochemical Study

The pattern of immunohistochemical and histochemical lectin labeling in the fox OB is similar to that observed in dog and wolf, with a high specificity towards the superficial, nervous and glomerular layers by LEA (Figures 22H and 23I) and anti-OMP (Figure 23A). Anti-Gao (Figures 22D and 23E) and anti-Gai2 (Figures 22E and 23F) produced complementary immunolabeling for both markers, immunopositive for the former and immunonegative for the latter. CB (Figures 22A and 23B) and CR (Figures 22B and 23C) are expressed following a laminar distribution, comparable to that observed for dog and wolf. For both markers, in the fox, as in the dog and wolf, the intensity of marking in the glomeruli is variable within the same specimen, with no organized pattern. At the cellular level, both markers strongly stain the periglomerular and granular cells (Figure 23B,C).

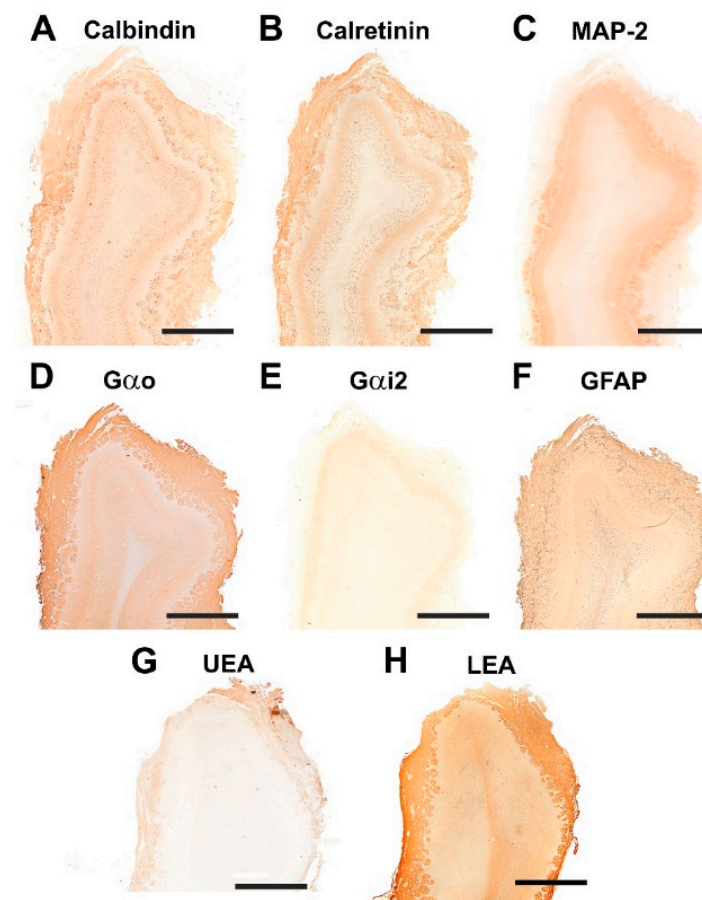


Figure 22. Immunohistochemical and lectin-histochemical study of the OB of the fox. (A) Anti-Calbindin; (B) Anti-Calretinin; (C) Anti-MAP-2; (D) Anti-Gao; (E) Anti-Gai2; (F) Anti-GFAP; (G) UEA histochemical labeling; (H) LEA histochemical labeling. Scale bars: 2 mm.

Anti-MAP-2 (Figures 22C and 23D) produces in the glomerular and external plexiform layer strong labeling of the dendritic arbors originating from mitral cells, similar to that observed in the wolf and more intense than that described in the dog. This result corresponds to the greater morphological development observed with histological staining of mitral cells in wild canids. Anti-GFAP (Figures 22F and 23G) provides evidence of glial cell processes, and UEA lectin (Figures 22G and 23H) produces negative labeling in the OB of the fox, as was the case in dog and wolf.

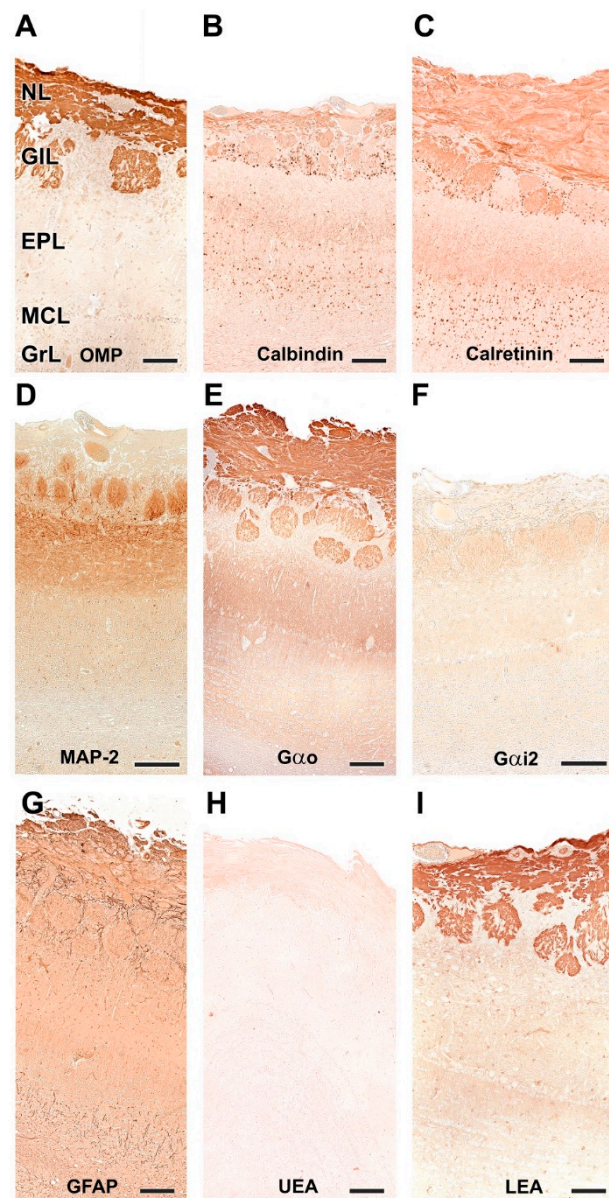


Figure 23. Immunohistochemical and lectin-histochemical study of the olfactory bulb of the fox. (A) Anti-Olfactory marker protein (OMP); (B) Anti-Calbindin; (C) Anti-Calretinin; (D) Anti-MAP-2; (E) Anti-G α o; (F) Anti-G α i2; (G) Anti-GFAP; (H) UEA histochemical labeling; (I) LEA histochemical labeling. NL, Nerve layer; GIL, Glomerular layer; EPL, External plexiform layer; MCL, Mitral cell layer; GrL, Granular layer. Scale bars: 100 μ m.

4. Discussion

The study of the anatomical diversity of the mammalian olfactory system has been defined by the existence of two major subsystems, the olfactory system and the vomeronasal system, both homologous in numerous morphological and functional features due to the extent that both systems present a degree of overlap in the stimuli they detect and the effects that they mediate [13,44]. However, the systems evolved in mammals following different pathways [45]. The olfactory system presents a general pattern of evolutionary conservation whose gene sequences are well-conserved, which is observed in its conserved morphological and neurophysiological traits and in the nature of the olfactory receptors, which specialized to detect a broad range of odors that remain stable in the environment. [46]. The vomeronasal system evolved to detect a limited group of species-specific ligands, primarily pheromones, which are the result of ecological adaptations closely related with the

ecological context of each species. Morphologically, the VNS presents a high morphological diversity [47], and its VNO receptors are associated with a wide range of genes [48].

Perhaps for this reason, while there have been a large number of comparative morpho-functional studies of the vomeronasal system, there has been fewer in-depth studies of the neuroanatomical characteristics of the olfactory mucosa and the main olfactory bulb that take into account the specific and differential features of each species. This fact has meant that the study of the olfactory system has focused on a small number of models, which, although thoroughly explored, involves risk when making interspecies extrapolations [49].

An example of this is the study of the olfactory system of canids, collectively considered as macrosmatic animals par excellence [50], assuming an identical common organization without delving into the differential features between species within the family Canidae. Not only are comparative studies necessary to avoid the risks of extrapolation, but within this group we have the specific case of the domestication of the dog, an excellent model for the study of the effect of selection pressure on the structuring of the nervous system and the functional and molecular bases that have led in a short period of time to such important differences as those that differentiate the dog from its wild ancestors, the wolf and the fox.

One of the aspects that we have taken into account in our study is the macroscopic evaluation of the olfactory encephalon in the three species studied, observing in all the specimens an appreciably greater development of the olfactory bulbs in the wolf (Figure 9) and the fox (Figure 17) than in the dog (Figure 1). This is an observation that needs to be confirmed by morphometric and stereological studies, which faces the difficulty, especially in the case of the wolf, of obtaining samples in good condition from wild animals of similar age and of both sexes that can be compared with a representative sample of domestic dogs of a similar breed, age and conformation. However, our qualitative assessment is consistent with the known greater development of the wolf brain compared to the domestic dog brain [51,52].

In the case of the fox, the seminal study of selective breeding for tameness or aggression known as the Russian farm-fox experiment developed to understand the neural correlates of domestication has found that intense selection based on behavior can produce extremely rapid gross changes in distributed brain morphology [53]. In parallel to this, the comparison of endocranial volume between wild and domesticated foxes belonging to the Russian farm-fox experiment determined a reduction in endocranial volume development is a consequence of domestication [54]. These macroscopic observations on the effects of domestication on the brain have been correlated at the functional level with studies such as that by Bird et al. [32], suggesting that there is a loss of olfactory capacity in dogs compared to wild canids. Moreover, this study did not find evidence of any anatomical advantage in the nose of scent dogs, even in comparison to short-snouted dogs, supporting the hypothesis that scent breeds are scent breeds in name only. On the basis of these observations, we consider that the use in our study of canine individuals of mesaticephalic breeds, similar in conformation to the wolf, constitutes a valid approach. Finally, it is also significant to make reference to the specific study of the human species, where a direct correlation between the shape of the olfactory bulb and olfactory capacity has recently been described [55].

From a histological point of view, the three species show a wide and well-defined lamination, typical of a macrosmatic species, but there are important differences, the most outstanding being the development of the glomerular layer in the wolf and the greater cellularity of the olfactory bulb in the two wild canids studied. The development of the glomerular layer is particularly striking in the wolf (Figures 4, 12 and 19 for comparison), its glomerular distribution in terms of the number of rows of glomeruli (2–4) being similar to that found in elephants [56]. Of particular significance in this regard is the only morphological and neurochemical study in a wild canid of which we are aware, the one conducted on the African wild dog [29], which found that the glomerular diameter in this species was higher than that observed in the domestic dog and within the range observed in the

African elephant [56]. With regard to the cellularity of the OB, the great development of the periglomerular cells and the large size of the mitral cells are striking in both wolves and fox (Figures 5, 13 and 20). The dendritic processes of the mitral cells observed in Nissl staining, especially in sagittal sections of the mitral layer, display much greater development in wolves and foxes than in dogs. The absence of morphological and stereological morphometric studies of the OB of canids does not allow these results to be contrasted, and opens the door to future stereological studies that should explore this aspect in greater depth.

As for immunohistochemical characterization of the OB, there are also no studies in wild canids to which we can compare our observations. To our knowledge, we can only cite the immunohistochemical study of calcium-binding proteins in dogs [28]. In this sense, our results are comparable to the labeling patterns obtained with anti-calbindin and anti-calretinin in the dog by the same authors. In wild canids, a more intense labeling pattern is observed for periglomerular and granular cells in the fox compared to the wolf, and likewise in the wolf compared to the dog. Although this is a descriptive rather than quantitative assessment, it is interesting to note that the aforementioned study by Choi et al. [28] directly correlates by Western blot the intensity of the immunolabeling observed with the levels of the calcium-binding proteins studied. As for the observations of Chengetanai et al. [29] in the African wild dog, this study only coincides with our work in terms of the immunomarkers used in the case of calcium-binding proteins, obtaining results similar to those observed in the wolf. With respect to other markers such as OMP, GFAP, Gao, Gai2 and MAP2, to our knowledge there are no antecedents in dogs and wild canids that allow us to contrast our results. Among these markers, the specific case of MAP-2 and GFAP, which produce a more intense response in both wild canids, are striking. MAP-2 expression is particularly relevant because it can be used to identify mitral cell dendritic trees [57,58]. Therefore, the strong labeling obtained with this marker in both the plexiform and glomerular layers of the wolf (Figure 15D) and fox (Figure 23D) is consistent with the histological observations of these cells. With respect to the somas of mitral cells, none of the markers allowed their characterization, which was also observed by Chengetanai et al. [29] with the markers they used in their study.

The histochemical study with the lectins LEA and UEA produced similar results in all three species. While LEA produces uniform labeling in the two superficial layers of the bulb (Figures 8I, 15I and 22H), UEA produces negative labeling (Figures 8H, 15H and 22G). Studies with LEA in a large number of species confirm this lectin as a universal marker for the mammalian olfactory system [59–61]. The case of UEA is more striking because this lectin, specific to L-fucose, is known to present a specific pattern towards the vomeronasal system in dogs [23] and foxes [34], while there was no information about it in wolves. Our results show that the specificity of the vomeronasal system towards the UEA is a highly conserved characteristic in the main olfactory system of canids. This is not the case in Felidae, as cat vomeronasal systems are not specific for UEA, similar to what happens in other groups of mammals as diverse as rodents [62], rabbits [63], pigs [64], ruminants [65] and marsupials [66].

5. Conclusions

Our study shows the existence of remarkable anatomical and histological differences between the olfactory bulb of dogs and that of the two wild canids studied: their most direct wild ancestors, the wolf and the fox. Further, at the morphofunctional level, the immunohistochemical pattern observed points to a higher degree of neurochemical activity in wild canids. A future step will be to carry out morphometric and stereological studies to quantitatively assess the morphological differences found.

Author Contributions: Conceptualization, I.O.-L., M.V.T. and P.S.-Q.; methodology: I.O.-L., M.V.T., L.N.L.-C., L.E.F., A.L.-B. and P.S.-Q.; investigation, I.O.-L., M.V.T. and P.S.-Q.; writing—original draft preparation, I.O.-L., M.V.T. and P.S.-Q.; writing—review and editing, I.O.-L., M.V.T., L.N.L.-C. and P.S.-Q.; image acquisition, L.N.L.-C.; funding acquisition, P.S.-Q., I.O.-L. and M.V.T. contributed equally to this work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable, as all the animals employed in this study died by natural causes.

Informed Consent Statement: Not applicable, as this research did not involve any humans.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript, and are fully available without restriction.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Baum, M.J.; Cherry, J.A. Processing by the main olfactory system of chemosignals that facilitate mammalian reproduction. *Horm. Behav.* **2015**, *68*, 53–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kokocińska-Kusiak, A.; Woszczyło, M.; Zybala, M.; Maciocha, J.; Barłowska, K.; Dzieciół, M. Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical Applications. *Animals* **2021**, *11*, 2463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Whitlock, K.E.; Palominos, M.F. The Olfactory Tract: Basis for Future Evolution in Response to Rapidly Changing Ecological Niches. *Front. Neuroanat.* **2022**, *16*, 831602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Touhara, K. Odor discrimination by G protein-coupled olfactory receptors. *Microsc. Res. Tech.* **2002**, *58*, 135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Walker, D.B.; Walker, J.C.; Cavnar, P.J.; Taylor, J.L.; Pickel, D.H.; Hall, S.B.; Suarez, J.C. Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2006**, *97*, 241–254. [[CrossRef](#)]
6. Salazar, I.; Sanchez-Quinteiro, P.; Barrios, A.W.; López Amado, M.; Vega, J.A. Anatomy of the olfactory mucosa. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 164, pp. 47–65. ISBN 978-0-444-63855-7.
7. Smith, T.D.; Bhatnagar, K.P. Anatomy of the olfactory system. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 164, pp. 17–28. ISBN 978-0-444-63855-7.
8. Arzi, A.; Rozenkrantz, L.; Gorodisky, L.; Rozenkrantz, D.; Holtzman, Y.; Ravia, A.; Bekinshtein, T.A.; Galperin, T.; Krimchansky, B.-Z.; Cohen, G.; et al. Olfactory sniffing signals consciousness in unresponsive patients with brain injuries. *Nature* **2020**, *581*, 428–433. [[CrossRef](#)]
9. Ennis, M.; Holy, T.E. Anatomy and Neurobiology of the Main and Accessory Olfactory Bulbs. In *Handbook of Olfaction and Gustation*; Doty, R.L., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 157–182. ISBN 978-1-118-97175-8.
10. Torres, M.V.; Ortiz-Leal, I.; Ferreira, A.; Rois, J.L.; Sanchez-Quinteiro, P. Neuroanatomical and Immunohistological Study of the Main and Accessory Olfactory Bulbs of the Meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals* **2021**, *12*, 91. [[CrossRef](#)]
11. Powers, J.B.; Winans, S.S. Vomeronasal Organ: Critical Role in Mediating Sexual Behavior of the Male Hamster. *Science* **1975**, *187*, 961–963. [[CrossRef](#)]
12. Keverne, E.B. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiol. Behav.* **2004**, *83*, 177–187. [[CrossRef](#)]
13. Brennan, P.A.; Zufall, F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* **2006**, *444*, 308–315. [[CrossRef](#)]
14. Wyatt, T.D. *Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2013; ISBN 978-1-139-03074-8.
15. Liberles, S.D. Mammalian Pheromones. *Annu. Rev. Physiol.* **2014**, *76*, 151–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Salazar, I.; Sánchez Quinteiro, P.; Cifuentes, J.M.; Fernández, P.; Lombardero, M. Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. *Anat. Rec.* **1997**, *247*, 129–136. [[CrossRef](#)]
17. Kondoh, D.; Tanaka, Y.; Kawai, Y.K.; Mineshige, T.; Watanabe, K.; Kobayashi, Y. Morphological and Histological Features of the Vomeronasal Organ in African Pygmy Hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Animals* **2021**, *11*, 1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kondoh, D.; Watanabe, K.; Nishihara, K.; Ono, Y.S.; Nakamura, K.G.; Yuhara, K.; Tomikawa, S.; Sugimoto, M.; Kobayashi, S.; Horiuchi, N.; et al. Histological Properties of Main and Accessory Olfactory Bulbs in the Common Hippopotamus. *Brain. Behav. Evol.* **2017**, *90*, 224–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Torres, M.V.; Ortiz-Leal, I.; Villamayor, P.R.; Ferreira, A.; Rois, J.L.; Sanchez-Quinteiro, P. The vomeronasal system of the newborn capybara: A morphological and immunohistochemical study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13304. [[CrossRef](#)]
20. Adams, D.R. The bovine vomeronasal organ. *Arch. Histol. Jpn.* **1986**, *49*, 211–225. [[CrossRef](#)]
21. Ortiz-Leal, I.; Torres, M.V.; Villamayor, P.R.; López-Becero, A.; Sanchez-Quinteiro, P. The vomeronasal organ of wild canids: The fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *J. Anat.* **2020**, *237*, 890–906. [[CrossRef](#)]
22. Nakajima, T.; Sakaue, M.; Kato, M.; Saito, S.; Ogawa, K.; Taniguchi, K. Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on the accessory olfactory bulb of the dog. *Anat. Rec.* **1998**, *252*, 393–402. [[CrossRef](#)]
23. Salazar, I.; Cifuentes, J.M.; Sánchez-Quinteiro, P. Morphological and Immunohistochemical Features of the Vomeronasal System in Dogs. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **2013**, *296*, 146–155. [[CrossRef](#)]
24. Salazar, I.; Barrios, A.W.; Sánchez-Quinteiro, P. Revisiting the Vomeronasal System From an Integrated Perspective: Revisiting the vomeronasal system. *Anat. Rec.* **2016**, *299*, 1488–1491. [[CrossRef](#)]
25. Barrios, A.W.; Sanchez-Quinteiro, P.; Salazar, I. Dog and mouse: Toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Front. Neuroanat.* **2014**, *8*, 106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Jawlowski, H. On the bulbus olfactorius and bulbus olfactorius accessorius of some mammals. *Lub. Univ. Marii Curie-Sklodowskiej Roczniki. Annls Dzialc Nauk. Biol.* **1956**, *10*, 67–86.
27. Miodonski, R. Bulbus olfactorius of the dog (*Canis familiaris*). *Acta Biol. Crac.* **1968**, *11*.
28. Choi, J.H.; Lee, C.H.; Yoo, K.-Y.; Hwang, I.K.; Lee, I.S.; Lee, Y.L.; Shin, H.-C.; Won, M.-H. Age-related Changes in Calbindin-D28k, Parvalbumin, and Calretinin Immunoreactivity in the Dog Main Olfactory Bulb. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2010**, *30*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chengetanai, S.; Bhagwandin, A.; Bertelsen, M.F.; Hård, T.; Hof, P.R.; Spocter, M.A.; Manger, P.R. The brain of the African wild dog. II. The olfactory system. *J. Comp. Neurol.* **2020**, *528*, 3285–3304. [[CrossRef](#)]
30. Kruska, D. Mammalian Domestication and its Effect on Brain Structure and Behavior. In *Intelligence and Evolutionary Biology*; Jerison, H.J., Jerison, I., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1988; pp. 211–250. ISBN 978-3-642-70879-4.
31. Grewal, J.S.; Gloe, T.; Hegedus, J.; Bitterman, K.; Billings, B.K.; Chengetanai, S.; Bentil, S.; Wang, V.X.; Ng, J.C.; Tang, C.Y.; et al. Brain gyrification in wild and domestic canids: Has domestication changed the gyrification index in domestic dogs? *J. Comp. Neurol.* **2020**, *528*, 3209–3228. [[CrossRef](#)]
32. Bird, D.J.; Jacquemetton, C.; Buelow, S.A.; Evans, A.W.; Van Valkenburgh, B. Domesticating olfaction: Dog breeds, including scent hounds, have reduced cribriform plate morphology relative to wolves. *Anat. Rec.* **2021**, *304*, 139–153. [[CrossRef](#)]
33. Bird, D.J.; Murphy, W.J.; Fox-Rosales, L.; Hamid, I.; Eagle, R.A.; Van Valkenburgh, B. Olfaction written in bone: Cribriform plate size parallels olfactory receptor gene repertoires in Mammalia. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, *285*, 20180100. [[CrossRef](#)]
34. Ortiz-Leal, I.; Torres, M.V.; Villamayor, P.R.; Fidalgo, L.E.; López-Beceiro, A.; Sanchez-Quinteiro, P. Can domestication shape canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Ann. Anat. Anat. Anz.* **2021**, *240*, 151881. [[CrossRef](#)]
35. Tolivia, J.; Tolivia, D.; Navarro, A. New technique for differential staining of myelinated fibers and nerve cells on paraffin sections. *Anat. Rec.* **1988**, *222*, 437–440. [[CrossRef](#)]
36. Villamayor, P.R.; Arana Álvaro, J.; Coppel, C.; Ortiz-Leal, I.; Torres, M.V.; Sanchez-Quinteiro, P.; Sánchez, L. A comprehensive structural, lectin and immunohistochemical characterization of the zebrafish olfactory system. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P. A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microsc. Res. Tech.* **2011**, *74*, 1109–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. de la Rosa-Prieto, C.; Saiz-Sanchez, D.; Ubeda-Bañon, I.; Argandoña-Palacios, L.; Garcia-Muñozguren, S.; Martínez-Marcos, A. Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice. *Dev. Neurobiol.* **2010**, *70*, 961–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Koo, J.H.; Saraswati, M.; Margolis, F.L. Immunolocalization of Bex protein in the mouse brain and olfactory system. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *487*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hermanowicz-Sobieraj, B.; Bogus-Nowakowska, K.; Robak, A. Calcium-binding proteins expression in the septum and cingulate cortex of the adult guinea pig. *Ann. Anat. Anat. Anz.* **2018**, *215*, 30–39. [[CrossRef](#)]
41. Adrio, F.; Rodríguez-Moldes, I.; Anadón, R. Distribution of glycine immunoreactivity in the brain of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*): Comparison with γ -aminobutyric acid. *J. Comp. Neurol.* **2011**, *519*, 1115–1142. [[CrossRef](#)]
42. Kotani, T.; Murata, Y.; Ohnishi, H.; Mori, M.; Kusakari, S.; Saito, Y.; Okazawa, H.; Bixby, J.L.; Matozaki, T. Expression of PTPRO in the interneurons of adult mouse olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* **2010**, *518*, 119–136. [[CrossRef](#)]
43. Shibata, S.; Cho, K.H.; Kim, J.H.; Abe, H.; Murakami, G.; Cho, B.H. Expression of hyaluronan (*hyaluronic acid*) in the developing laminar architecture of the human fetal brain. *Ann. Anat. Anat. Anz.* **2013**, *195*, 424–430. [[CrossRef](#)]
44. Zufall, F.; Leinders-Zufall, T. Mammalian pheromone sensing. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, *17*, 483–489. [[CrossRef](#)]
45. Swaney, W.T.; Keverne, E.B. The evolution of pheromonal communication. *Behav. Brain Res.* **2009**, *200*, 239–247. [[CrossRef](#)]
46. Grus, W.E.; Zhang, J. Distinct Evolutionary Patterns between Chemoreceptors of 2 Vertebrate Olfactory Systems and the Differential Tuning Hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 1593–1601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Meisami, E.; Bhatnagar, K.P. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc. Res. Tech.* **1998**, *43*, 476–499. [[CrossRef](#)]
48. Grus, W.E.; Zhang, J. Rapid turnover and species-specificity of vomeronasal pheromone receptor genes in mice and rats. *Gene* **2004**, *340*, 303–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Salazar, I.; Sánchez-Quinteiro, P. The risk of extrapolation in neuroanatomy: The case of the mammalian accessory olfactory bulb. *Front. Neuroanat.* **2009**, *3*, 22. [[CrossRef](#)]
50. Siniscalchi, M. Olfaction and the canine brain. In *Canine Olfaction Science and Law*; Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2016; pp. 31–37.
51. Kruska, D.C.T. On the Evolutionary Significance of Encephalization in Some Eutherian Mammals: Effects of Adaptive Radiation, Domestication, and Feralization. *Brain. Behav. Evol.* **2005**, *65*, 73–108. [[CrossRef](#)]
52. Jardim-Messeder, D.; Lambert, K.; Noctor, S.; Pestana, F.M.; de Castro Leal, M.E.; Bertelsen, M.F.; Alagaili, A.N.; Mohammad, O.B.; Manger, P.R.; Herculano-Houzel, S. Dogs Have the Most Neurons, Though Not the Largest Brain: Trade-Off between Body Mass and Number of Neurons in the Cerebral Cortex of Large Carnivoran Species. *Front. Neuroanat.* **2017**, *11*, 118. [[CrossRef](#)]
53. Hecht, E.E.; Kukekova, A.V.; Gutman, D.A.; Acland, G.M.; Preuss, T.M.; Trut, L.N. Neuromorphological Changes following Selection for Tameness and Aggression in the Russian Farm-Fox experiment. *J. Neurosci.* **2021**, *41*, 6144–6156. [[CrossRef](#)]

54. Kistner, T.M.; Zink, K.D.; Worthington, S.; Lieberman, D.E. Geometric morphometric investigation of craniofacial morphological change in domesticated silver foxes. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2582. [[CrossRef](#)]
55. Yan, X.; Joshi, A.; Zang, Y.; Assunção, F.; Fernandes, H.M.; Hummel, T. The Shape of the Olfactory Bulb Predicts Olfactory Function. *Brain Sci.* **2022**, *12*, 128. [[CrossRef](#)]
56. Ngwenya, A.; Patzke, N.; Ihunwo, A.O.; Manger, P.R. Organisation and chemical neuroanatomy of the African elephant (*Loxodonta africana*) olfactory bulb. *Brain Struct. Funct.* **2011**, *216*, 403–416. [[CrossRef](#)]
57. Dehmelt, L.; Halpain, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **2005**, *6*, 204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Villamayor, P.R.; Cifuentes, J.M.; Quintela, L.; Barcia, R.; Sanchez-Quinteiro, P. Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Struct. Funct.* **2020**, *225*, 203–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Shapiro, L.S.; Halpern, M.; Ee, P.-L. Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in opossum chemosensory systems during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. *J. Morphol.* **1995**, *224*, 331–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Salazar, I.; Quinteiro, P.S.; Cifuentes, J.M.; Lombardero, M. The Accessory Olfactory Bulb of the Mink, *Mustela vison*: A Morphological and Lectin Histochemical Study. *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med. Ser. C* **1998**, *27*, 297–300. [[CrossRef](#)]
61. Yang, W.; Choi, Y.; Park, C.; Lee, K.-H.; Ahn, M.; Kang, W.; Heo, S.-D.; Kim, J.; Shin, T. Histological and lectin histochemical studies in the vomeronasal organ of the Korean black goat, *Capra hircus coreanae*. *Acta Histochem.* **2021**, *123*, 151684. [[CrossRef](#)]
62. Kondoh, D.; Kamikawa, A.; Sasaki, M.; Kitamura, N. Localization of α 1-2 Fucose Glycan in the Mouse Olfactory Pathway. *Cells Tissues Organs* **2017**, *203*, 20–28. [[CrossRef](#)]
63. Villamayor, P.R.; Cifuentes, J.M.; Fdz-de-Troconiz, P.; Sanchez-Quinteiro, P. Morphological and immunohistochemical study of the rabbit vomeronasal organ. *J. Anat.* **2018**, *233*, 814–827. [[CrossRef](#)]
64. Salazar, I. The Prenatal Maturity of the Accessory Olfactory Bulb in Pigs. *Chem. Senses* **2004**, *29*, 3–11. [[CrossRef](#)]
65. Park, C.; Ahn, M.; Lee, J.-Y.; Lee, S.; Yun, Y.; Lim, Y.-K.; Taniguchi, K.; Shin, T. A morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochem.* **2014**, *116*, 258–264. [[CrossRef](#)]
66. Torres, M.V.; Ortiz-Leal, I.; Villamayor, P.R.; Ferreiro, A.; Rois, J.L.; Sanchez-Quinteiro, P. Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Struct. Funct.* **2021**, *227*, 881–899. [[CrossRef](#)]

4.4 PUBLICACIÓN NÚMERO 4

Ortiz-Leal I, Torres MV, Vargas-Barroso V, Fidalgo LE, López-Beceiro AM, Larriva-Sahd JA, Sánchez-Quinteiro P. The olfactory limb of the red fox (*Vulpes vulpes*). New insights regarding a noncanonical olfactory bulb pathway. *Frontiers in Neuroanatomy*. 16:1097467 (2023).

doi: 10.3389/fnana.2022.

Revista: Frontiers in Neuroanatomy

Año de publicación: 2023

Editorial: Frontiers Media SA

ISSN: 1662-5129

Citas en Google Scholar: 4

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2022): 2.9

Factor de impacto de 5 años (2022):

Categoría (2022):

Anatomy & Morphology Q1 (D1): (2/20)

Contribución del doctorando: I. O. L. procesó los tejidos, analizó y discutió los resultados y escribió el manuscrito.

Autorización de la revista/editorial: Contenido reproducido bajo las condiciones de Copyright (2023) Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

COPYRIGHT
© 2023 Ortiz-Leal, Torres,
Vargas-Barroso, Fidalgo,
López-Beceiro, Larriva-Sahd and
Sánchez-Quinteiro. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Thomas E. Finger,
University of Colorado Anschutz
Medical Campus, United States

REVIEWED BY

Julian P. Meeks,
University of Texas Southwestern
Medical Center, United States
Enrique Lanuza,
University of Valencia, Spain

*CORRESPONDENCE

Pablo Sanchez-Quinteiro
✉ pablo.sanchez@usc.es

†These authors share first authorship

RECEIVED 13 November 2022

ACCEPTED 20 December 2022

PUBLISHED 10 January 2023

CITATION

Ortiz-Leal I, Torres MV,
Vargas-Barroso V, Fidalgo LE,
López-Beceiro AM, Larriva-Sahd JA
and Sánchez-Quinteiro P (2023) The
olfactory limbus of the red fox (*Vulpes
vulpes*). New insights regarding a
noncanonical olfactory bulb pathway.
Front. Neuroanat. 16:1097467.
doi: 10.3389/fnana.2022.1097467

COPYRIGHT

© 2023 Ortiz-Leal, Torres,
Vargas-Barroso, Fidalgo,
López-Beceiro, Larriva-Sahd and
Sánchez-Quinteiro. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.



The olfactory limbus of the red fox (*Vulpes vulpes*). New insights regarding a noncanonical olfactory bulb pathway

Irene Ortiz-Leal^{1†}, Mateo V. Torres^{1†}, Víctor Vargas-Barroso²,
Luis Eusebio Fidalgo¹, Ana María López-Beceiro¹,
Jorge A. Larriva-Sahd³ and Pablo Sánchez-Quinteiro^{1*}

¹Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain, ²Cellular Neuroscience, IST Austria (Institute of Science and Technology Austria), Klosterneuburg, Austria, ³Institute of Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

Introduction: The olfactory system in most mammals is divided into several subsystems based on the anatomical locations of the neuroreceptor cells involved and the receptor families that are expressed. In addition to the main olfactory system and the vomeronasal system, a range of olfactory subsystems converge onto the transition zone located between the main olfactory bulb (MOB) and the accessory olfactory bulb (AOB), which has been termed the olfactory limbus (OL). The OL contains specialized glomeruli that receive noncanonical sensory afferences and which interact with the MOB and AOB. Little is known regarding the olfactory subsystems of mammals other than laboratory rodents.

Methods: We have focused on characterizing the OL in the red fox by performing general and specific histological stainings on serial sections, using both single and double immunohistochemical and lectin-histochemical labeling techniques.

Results: As a result, we have been able to determine that the OL of the red fox (*Vulpes vulpes*) displays an uncommonly high degree of development and complexity.

Discussion: This makes this species a novel mammalian model, the study of which could improve our understanding of the noncanonical pathways involved in the processing of chemosensory cues.

KEYWORDS

olfaction, fox, Canidae, immunohistochemistry, lectins, olfactory limbus

Introduction

Modern neuroanatomical, electrophysiological, and genomic studies have revealed that the concept of a single olfactory system is an oversimplification. Instead, the seemingly simple mammalian nasal cavity contains a significant number of olfactory systems, some of which have only been discovered relatively recently (Barrios et al., 2014a). The mammalian olfactory system can be divided into

several subsystems based on the anatomical locations of the involved neuroreceptor cells, the receptors families that are expressed, the signaling transduction mechanisms employed, the chemosensory stimuli detected, and the targets of the sensory neuron axons within the rhinencephalon (Munger, 2009). However, growing evidence supports synergistic and cooperative interactions among these olfactory subsystems (Mucignat-Caretta et al., 2012; Pardo-Bellver et al., 2022).

The best-studied systems are the main olfactory system (MOS) and the vomeronasal system (VNS), which are both found in most mammalian groups, with a few exceptions (Trotier and Døving, 1998). The olfactory receptors (ORs) of the MOS are located in cilia within the mucosa lining the ethmoidal turbinates and in the caudal portion of the nasal septum (Salazar et al., 2019). Neuroepithelial axons project to the glomeruli of the main olfactory bulb (MOB; Scalia and Winans, 1975; Crespo et al., 2013). The MOS responds to thousands of volatile chemosignals, which carry information regarding food, pathogens, prey, predators, and conspecifics (Firestein, 2001).

The receptors of the VNS are located in the microvilli lining the neuroepithelium of the vomeronasal organ (VNO; Salazar et al., 1997, 2003). The vomeronasal neurons project to the accessory olfactory bulb (AOB; McCotter, 1912; Halpern et al., 1995). Among mammalian groups expressing the two vomeronasal receptors families, V1R and V2R (Herrada and Dulac, 1997), a morphofunctional antero-posterior subdivision is established within the AOB (Shinohara et al., 1992; Torres et al., 2022). The sensory neurons of the VNO detect a range of non-volatile natural ligands found in the exocrine secretions of conspecifics, which are involved in innate socio-sexual behaviors (Krieger et al., 1999; Villafranca-Faus et al., 2021).

In addition to the MOS and VNS, a range of sensory olfactory subsystems, including the Grüneberg ganglion (GG), the septal organ of Maserà (SO), and guanylyl cyclase-D-expressing (GC D+) chemosensory neurons, have been characterized, primarily in laboratory rodents (Zimmerman and Munger, 2021). The GG (Grüneberg, 1973) consists of cells located in the dorsal region of the nasal vestibule that are immunopositive for olfactory-marker-protein (OMP) and are involved in the detection of highly membrane-permeant stimuli (Breer et al., 2006). GG cells project to the dorsal regions of the caudal MOB near the AOB (Fuss et al., 2005; Storan and Key, 2006). The SO is an isolated patch of sensory epithelium identified in Rodentia and located near the base of the nasal septum at the entrances to the nasopalatine ducts (Adams, 1972). The SO expresses 50–80 genes in the OR family (Kaluzka et al., 2004). These neurons project to a small cluster of glomeruli located in the caudal, ventromedial aspect of the MOB (Levai et al., 2003).

The GC-D+ chemosensory neurons are a subpopulation of olfactory neurons that project to the well-defined necklace glomeruli, the most caudal glomeruli in the MOB. The necklace glomeruli, identified by Shinoda et al. (1993), were

first defined in rats as a subset of OSNs immunoreactive to human placental antigen X-P2 (PAX) that converge on 7–9 glomeruli. These glomeruli overlap with a subset of “atypical” glomeruli with acetylcholinesterase (AChE) reactivity (Zheng et al., 1987; Weruaga et al., 2001). The projections from the GG and SO also overlap with the necklace complex. Although this receptor system remains minimally studied and poorly understood (Zimmerman and Munger, 2021), GC-D+ chemosensory neurons are not OMP+ and function as receptors for uroguanylin, guanylin, and urine components (Leinders-Zufall et al., 2007).

All known olfactory subsystems converge onto the transition zone located between the MOB and the AOB. This transition zone is a modified bulbar cortex, bounded anteriorly by the dorsal MOB and posteriorly by the anterior AOB (Larriva-Sahd, 2012) and has been named the olfactory limbus (OL). The OL contains specialized glomeruli that receive noncanonical sensory afferents and interact with the MOB and AOB, indicating that the OL may serve as an integration site for non-olfactory and atypical vomeronasal sensory inputs (Vargas-Barroso et al., 2017).

Little is known regarding the olfactory subsystems present in carnivores. No sensory systems equivalent to the SO, GG, or necklace glomeruli have been described in either dogs or cats (Salazar and Sánchez-Quinteiro, 2011; Barrios et al., 2014b). However, studies characterizing the AOB in minks, meerkats, and dogs have indicated a more complex glomerular organization in the OB than has been described for other mammalian orders. The presumptive AOB in minks comprises not only the main dorsocaudal protuberance but also smaller lateral and medial regions (Salazar et al., 1998), whereas a recent study of the meerkat OB found a subpopulation of atypical glomeruli with a strong calcitonin receptor-like receptor (CR)-positive neuropil in the vicinity of the AOB (Torres et al., 2021). A study by Miodonski in the dog (1968) described the AOB as consisting of distinct glomerular aggregations, both “in the dorsomedial side of the OB, at the posterior margin of the MOB and downward along the caudal edge of the MOB, descending to its base both on the medial and on the lateral side.” Miodonski’s observations may represent the erroneous attribution of atypical glomerular structures to the accessory olfactory system instead of alternative olfactory subsystems; however, the multiform characterization of the dog AOB was not confirmed by subsequent lectin and immunohistochemical studies (Nakajima et al., 1998; Salazar et al., 2013). Only Nakajima et al. (1998) identified a small group of glomeruli with NADPH-diaphorase reactivity “between the glomeruli at the most caudal portion of the MOB,” which they attributed to the specific projections from subsets of neurochemically distinct OR cells.

Recent studies of the AOB in wild canids, including the African wild dog (*Lycaon pictus*; Chengetanai et al., 2020) and the red fox (*Vulpes vulpes*; Ortiz-Leal et al., 2022a) indicate

significant differences in the AOB between domestic and wild canids. In the red fox, a small atypical glomerular formation was identified in the proximity of the AOB. In the present study, we focused on characterizing the OL in the red fox by performing general and specific histological stainings on serial sections, using both single and double immunohistochemical and lectin-histochemical labeling techniques. We describe an OL in the red fox that displays an uncommonly high degree of development and complexity, suggesting that the red fox may represent a novel mammalian model, the study of which could improve our understanding of the noncanonical pathways involved in the processing of chemosensory cues.

Materials and methods

Samples

For this investigation, three male and two female adult red foxes (*Vulpes vulpes*) were employed. They were obtained through hunting expeditions led by the Galician Hunting Federation with the required authorizations granted by the Galician Environment, Territory, and Tenement Council. The animals were brought to the Veterinary Faculty of Lugo's facilities as soon as they were shot, in the field, with no more than a 2-h interval. There, the rostral section of the encephalon was removed using an electric plaster cutter and a gouge clamp and preserved in Bouin's fixative (Bf). Afterwards, the olfactory bulbs in conjunction with the rostral frontal lobes were embedded in paraffin wax and serially cut by a microtome in a horizontal plane along its entire length with a thickness of 6–7 μm . Hematoxylin-eosin and Nissl stains, lectin histochemistry, and both single and double immunohistochemistry were used to stain the slides.

Lectin histochemistry staining

Ulex europaeus agglutinin lectin (UEA) was employed as a first step in some of the sequential double immunohistochemical labelings. UEA labels the VNS pathway in several species, including the fox (Ortiz-Leal et al., 2022a) and dog (Salazar et al., 1994).

All sample slides were deparaffinized and rehydrated prior to beginning the lectin histochemistry procedure. The samples were then incubated in 3% H_2O_2 solution for 15 min to inhibit endogenous peroxidase activity, followed by two rinses in pH 7.2, 0.1 M phosphate buffer (PB). Then, sections were incubated for 30 min in a 2% BSA solution, which blocked non-specific binding. The slides were then washed three times for 5 min in a PB solution, followed by an incubation period of 1 h at room temperature in a 0.5% BSA/UEA solution. Further overnight incubation with an anti-UEA peroxidase-conjugated

antibody was performed on the slides. The samples were rinsed in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.61 for 10 min the next day, followed by a PB wash, before being developed using a Diaminobenzidine (DAB) chromogen. Controls involved removing the UEA and allowing the lectin to be preabsorbed by employing an excessive quantity of the matching sugar, L-fucose.

Simple immunohistochemical staining

The fox olfactory limbus was examined in-depth using immunohistochemistry. Among the antibodies employed (Table 1), the anti-G α o and anti-G α i2 antibodies are particularly useful because they label the transduction cascade for V2R and V1R vomeronasal receptors, respectively. Using antibodies against microtubule-associated protein 2 (MAP-2), neuronal dendritic development in the olfactory limbus was studied. Prior research has shown that the distribution of calcium-binding proteins may be used as a neuronal marker to distinguish between distinct brain areas and neuronal subpopulations (Baimbridge et al., 1992). Therefore, the calcium-binding proteins calbindin (CB), calretinin (CR), and secretagogin (SG), which play a role in controlling the levels of cytosolic free calcium ions in neurons, were studied using immunohistochemistry.

Antibody characterization and specificity

Table 1 provides details for all antibodies, including their suppliers, dilutions, target immunogens, and Research Resource Identifiers (RRID). In every instance, the immunostaining patterns produced in the red fox using these antibodies matched those previously obtained in a number of mammalian species. Table 1 lists relevant references for each antibody.

Simple immunohistochemical protocol

Deparaffinized and rehydrated samples were treated for 15 min in a 3% H_2O_2 solution to inactivate endogenous peroxidase activity prior to the immunohistochemistry reaction. To prevent non-specific binding sites, 2.5% horse normal serum from the ImmPRESS reagent kit Anti-mouse IgG/Anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used for 30 min (Table 1). After that, the samples were treated with the primary antibody for an overnight incubation at 4°C with humidity. Using either the ImmPRESS VR Polymer HRP Anti-Rabbit IgG or the Anti-Mouse IgG reagent, samples were incubated for 30 min (Table 1). In every instance, 3 \times 3 min PB washes were carried out in between steps. Finally, slides were developed with a DAB chromogen (using the same procedure as for the lectin histochemical labeling) and then dehydrated and mounted.

TABLE 1 Detailed information on the antibodies and lectins used in this study.

Antibody	1st Ab species/dilution	1st Ab catalog number	Immunogen	Reference	RRID	2nd Ab species/dilution, catalog number
Anti-G α o	Rabbit 1:200	MBL-551	Bovine GTP Binding Protein G α o subunit	Prince et al. (2009)	AB_591430	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-G α i2	Rabbit 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-7276	Peptide mapping within a highly divergent domain of G α i2 of rat origin	de la Rosa-Prieto et al. (2010)	AB_2111472	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-MAP-2	Mouse 1:400	Sigma M4403	Rat brain microtubule-associated proteins	Kotani et al. (2010)	AB_477193	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-CB	Rabbit 1:6,000	Swant CB38	Rat recombinant calbindin D-28k	Hermanowicz-Sobieraj et al. (2018)	AB_10000340	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CR	Rabbit 1:6,000	Swant 7697	Recombinant human calretinin containing a 6-his tag at the N-terminus	Adrio et al. (2011)	AB_2619710	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-SG	Rabbit 1:1,000	Gift from Ludwig Wagner (University of Vienna, Austria)	Recombinant human secretagogin	Alpár et al. (2012)	AB_1079874	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
UEA	1:60	Vector L-1060			AB_2336767	Rabbit 1:50 DAKO P289

Abbreviations: ABC, avidin-biotin complex; CB, calbindin; CR, calretinin; HRP, horseradish peroxidase; MAP-2, microtubule-associated protein 2; SG, secretagogin; UEA, *Ulex europaeus* agglutinin.

The omission of the primary antibody was employed as a negative control for all immunohistochemistry methods, and none of the negative control samples showed any labeling or non-specific background staining. We repeated the immunohistochemistry process on previously unstained mouse or rabbit tissue from earlier investigations as a positive control. These samples were all known to express the desired proteins, and each time, the expected positive results were obtained.

Double-immunohistochemical protocol

A sequential twice-repeated enzyme-labeled approach was used for double immunostaining (Hasui et al., 2003). The sections were given a 5-min dip in 0.1 M glycine solution (pH 2.2) in between both immunolabelings. To select the most suitable dye to visualize the immunoreaction, both DAB and Vector VIP Peroxidase Substrate Kit (SK-4600, Vector Laboratories) were combined exchanging their order. Using first DAB and then VIP was the optimal combination for our immunostaining.

Image acquisition and digital processing

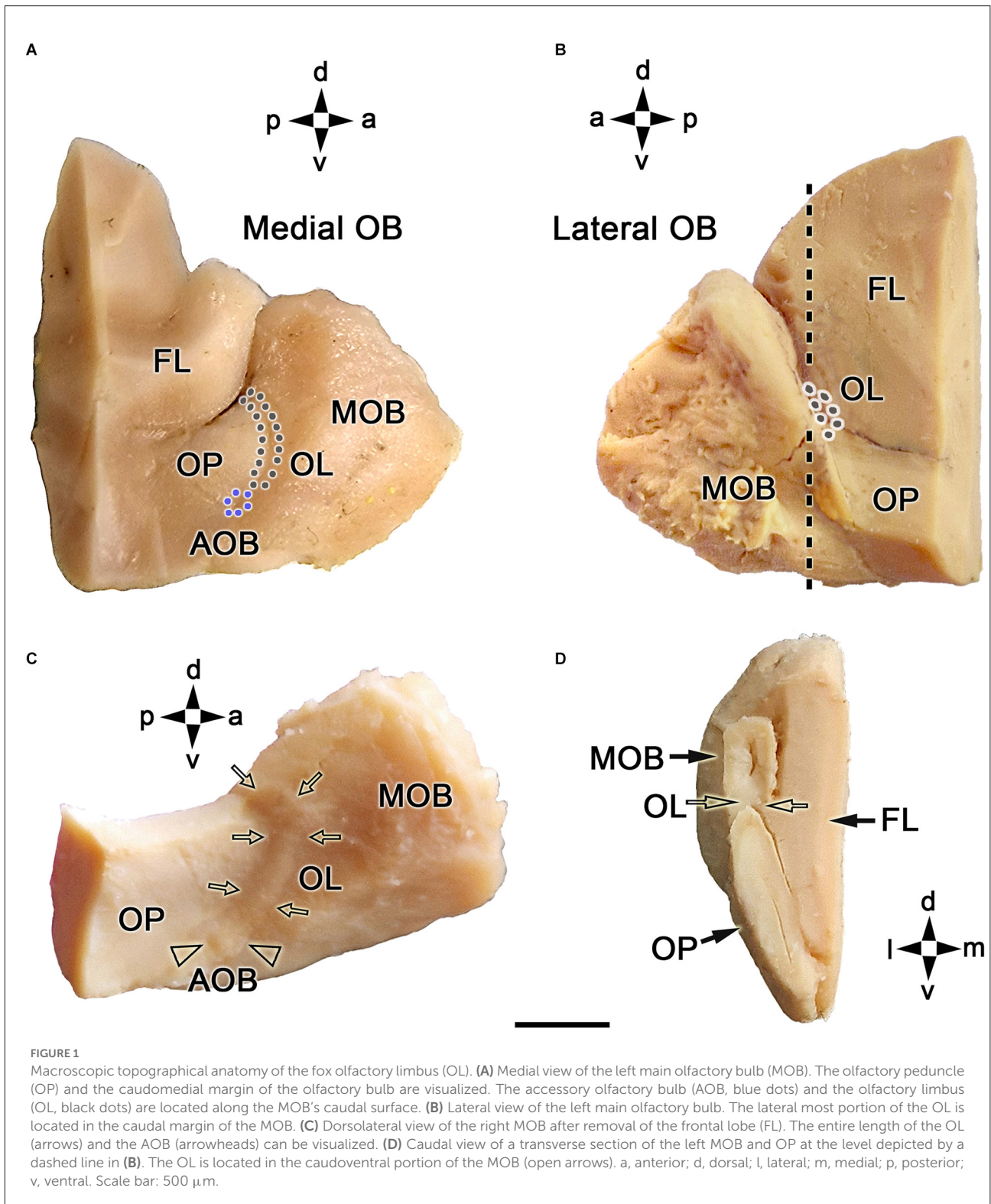
A Zeiss Axiophot microscope and a Karl Zeiss Axiocam MRc5 digital camera were used for image acquisition. Using Adobe Photoshop CS4 the white balance settings were adjusted (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). No particular

details were added, relocated, improved, or removed from the photographs.

Results

Both macroscopic and microscopic studies were performed on the OB to describe the topographical anatomy of the fox OL (Figure 1). The OL is mainly located along the caudomedial margin of the OB, rostrally to the olfactory peduncle (Figure 1A). A minor portion projects along the caudolateral margin of the OB (Figure 1B). The entire length of the OL and AOB can be better visualized on a dorsolateral view of the OB after removing the telencephalic frontal lobe (Figure 1C). The AOB is located caudoventrally to the OL, on the OB medial surface. A transverse section of the OB at the level of the OL (Figure 1B) shows from a caudal viewpoint the topographic relationship between the OL, the MOB, and the olfactory peduncle (OP; Figure 1D).

A microscopic study of the fox OL was performed on serial, horizontal sections obtained from the anterior region of the telencephalon across an area that includes the AOB, MOB, and frontal lobe (FL). The OL was defined as the transition zone between the MOB and AOB, consisting of a large area located in the medial OB, delimited by the dorsocaudal edge of the MOB and the anterior end of the AOB (Figure 2). The OL is not a sharp frontier but is instead a heterotypical bulbar cortex with distinct cytological characteristics relative to the MOB and AOB. A laminar pattern can be observed throughout the OB,



whereas the OL features varying degrees of lamination, which is its most obvious characteristic. The widespread presence of atypical glomeruli in the fox OL is remarkable (Figures 2B,C). In contrast to the linear arrangement and uniform size of glomeruli

in the MOB (100–150 μ m maximum diameter), glomeruli in the OL are characterized by an atypical, disarrayed arrangement, irregular shapes, and a wide range of sizes (50–500 μ m maximum diameter).

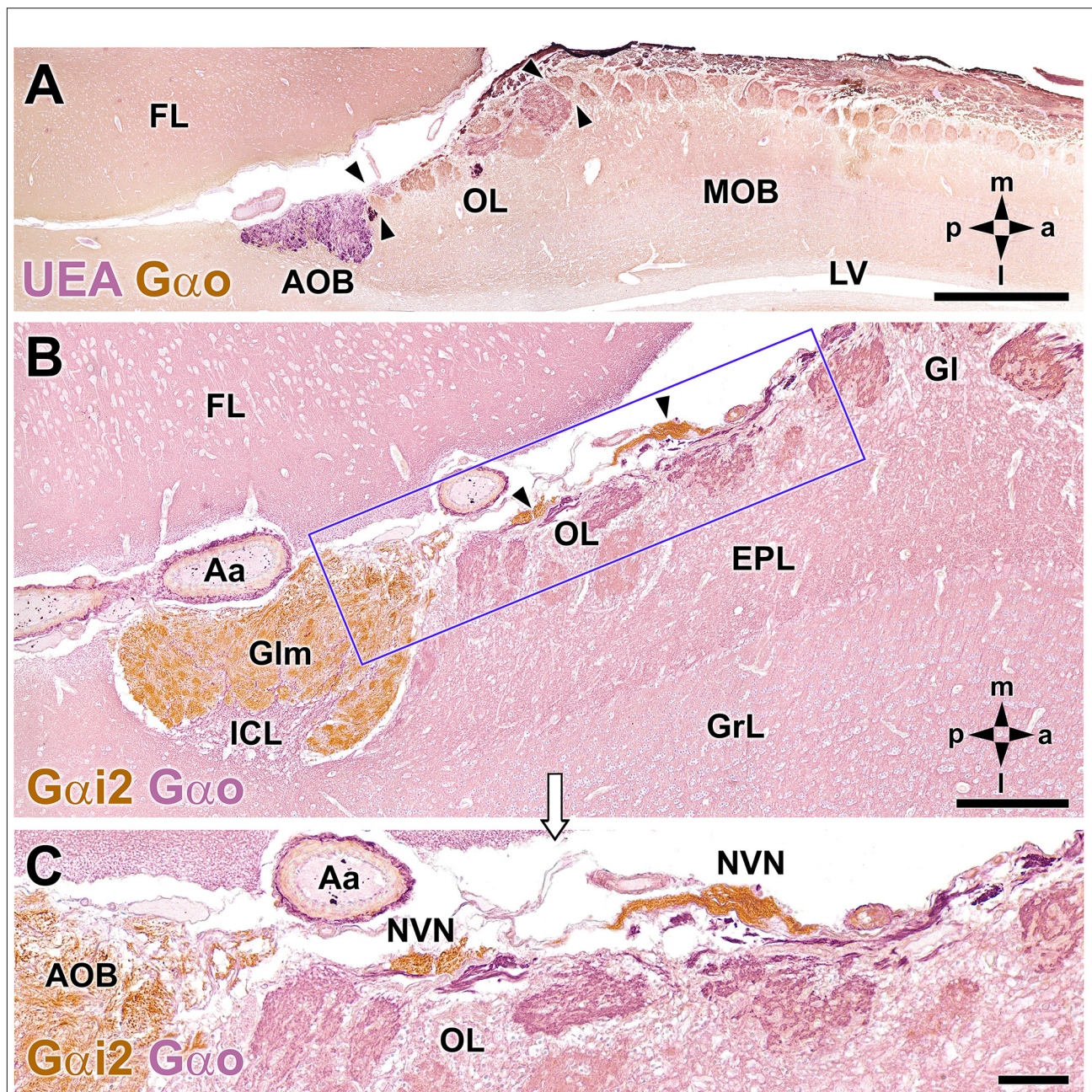


FIGURE 2
 Double-immunohistochemical labeling of the fox olfactory limbus (OL). **(A)** Double immunostaining with *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) lectin (magenta) and $G\alpha o$ antibody (brown). The vomeronasal nerve and glomerular layers of the accessory olfactory bulb (AOB) are strongly labeled with UEA. Anti- $G\alpha o$ immunolabeling shows a widespread immunopositive pattern, more intensely in both the olfactory nerve and glomerular layers of the MOB. The OL, delimited by arrowheads, comprises irregularly shaped glomeruli, without a homogeneous immunostaining pattern. **(B,C)** Double immunostaining for $G\alpha i 2$ (brown) and $G\alpha o$ (magenta). Anti- $G\alpha i 2$ stains the superficial AOB and the *nervus vomeronasalis* (NVN, arrowheads). Anti- $G\alpha o$ stains the internal cellular layer (ICL) of the AOB and the neuropil of the olfactory bulb. The box in **(B)** is enlarged in **(C)**, showing that the OL comprises irregularly shaped glomeruli without a homogeneous immunostaining pattern. The branches of the NVN, which are $G\alpha i 2$ -immunopositive, contrast with the $G\alpha o$ -immunopositive nerve endings that project to the OL glomeruli. Aa, artery; EPL, external plexiform layer; FL, frontal lobe; GI, MOB glomerular layer; Gln, AOB glomerular layer; GrL, MOB granular cell layer; LV, lateral ventricle. The compass indicates the orientation, as follows: m, medial; l, lateral; p, posterior; a, anterior. Scale bars: **(A)**: 1 cm. **(B,C)**: 250 μ m.

Double immunohistochemical labeling against different markers allowed us to characterize the topographical relationships between the atypical glomeruli in the OL

(Figure 2A), the AOB, and the axonal endings of the vomeronasal nerve (NVN; Figure 2B). Double immunolabeling against *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) lectin and the G

protein subunit $G\alpha_o$ (Figure 2A) identified two superficial layers in the AOB, the NVN, and glomerular layers, both of which were intensely stained by UEA. Conversely, anti- $G\alpha_o$ staining was observed in the deep layers of the AOB and throughout the MOB, with more intense staining observed in both the olfactory nerve and glomerular layers. Strikingly, the OL, delimited by arrowheads in Figure 2A, was comprised of irregularly shaped glomeruli with no homogeneous immunostaining pattern.

Double immunolabeling against the G protein subunits, $G\alpha_o$ and $G\alpha_i2$ (Figure 2B), is equally useful to double staining with UEA and $G\alpha_o$. $G\alpha_i2$ is expressed exclusively in the VNS, at both the AOB surface and in the NVN (Figure 2C). By contrast, the nerve endings projecting to the OL glomeruli were $G\alpha_o$ -immunopositive (Figure 2C).

Using both hematoxylin-eosin (Figure 3A) and Nissl staining (Figure 3B) revealed the OL texture, which is characterized by high structural complexity. The two most striking features are dense, compact clusters of neuronal somata (Figures 3A.1,B.1) and a broad nervous formation consisting of less densely aggregated neuronal somas distributed within a neuropil that is distinct from the underlying glomeruli (Figures 3A.2,B.2). We have termed this previously undescribed nervous formation the macroglomerular complex (MGC). Both features are characterized by a remarkably high concentration of neuronal somata located in the most superficial bulb layer, proximal to the pial surface. Small, irregularly shaped glomeruli deep into both structures complete the organization of the OL.

To exclude the possibility that these atypical formations are the result of interindividual anatomical variability, we performed Nissl staining in four additional animals, as shown in Figures 4 and 5. In the first specimen (Figure 4), horizontal OL sections were stained at three levels dorsal to the AOB, which allowed for the detailed characterization of the appearance and dimensions of both neuronal clusters (Figures 4A,A.1) and the MGC (Figures 4A,A.2,B,B.1,C). Somata in the clusters were similarly sized, with polyhedral, ellipsoid, or oval morphologies (Figures 4A.1,A.2,B.1,C). The MGC was always located on the bulbar surface, close to glomeruli populations located in the immediately deeper plane, and the magnitude of the MGC was notable, extending over several millimeters in some sections (Figures 4A,B). Most of the glomeruli associated with the MGC featured irregular, atypical shapes (Figures 4A,B), although some glomeruli with typical spherical shapes and well-defined boundaries were also observed (Figure 4A). Nissl staining of the other three individuals (Figures 5A–C) verified these findings.

Figure 6 summarizes our interpretation of the histological data in a schematic drawing of a histological MOB section (Figure 6A) and an enlargement of the caudodorsal area, showing the irregular arrangement and dimensions of atypical glomeruli and the structure of the MGC (Figure 6B). To further

characterize the fox OL neurochemically and identify potentially distinctive features relative to the AOB and MOB, we conducted an immunostaining study using various antibodies and the lectin UEA.

Immunolabeling against the G protein subunit $G\alpha_o$ resulted in the well-characterized pattern of immunopositivity throughout the neuropil of the FL and OB, with $G\alpha_o$ immunonegativity observed only in the nerve and glomerular layers of the AOB (Figure 7A). However, the atypical glomeruli proximal to the AOB showed more intense immunolabeling than the typical glomeruli of the MOB. The MGC showed a labeling intensity similar to that observed for typical glomeruli. When the MGC was observed at higher magnification (Figure 7B), two clearly differentiated areas could be identified, one containing numerous $G\alpha_o$ -immunopositive neuronal somata and the other devoid of them, in contrast with the $G\alpha_o$ -immunonegative mitral cell somata of the MOB (Figure 7C).

We returned to the original double immunolabeled sections shown in Figure 2 to more closely examine the structural organization of the MGC. Figure 8 shows higher magnifications of the double immunolabeled OL sections presented in Figure 2. In Figures 8A,B, the nerve and glomerular layers of the AOB appear intensely labeled by the lectin UEA, whereas the MOB glomeruli are not labeled. In the OL, some glomeruli are UEA-negative, whereas the remaining, primarily smaller glomeruli, are strongly labeled with UEA (Figure 8A). Remarkably, $G\alpha_o$ -positive somata belonging to the nervous formation are embedded in a dense network of UEA-positive fibers (Figures 8B,C). The NVN fibers segregate into UEA-positive (Figure 8B, black asterisk) and $G\alpha_o$ -positive (Figure 8B, white asterisk) components.

Immunolabeling with the anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2) antibody, a consistent marker for the dendritic branching of neuronal cells in all species, results in the uniform staining of glomeruli and the external plexiform layer of the MOB (Figure 9A). In the OL, anti-MAP-2 also stains atypical glomerular formations, but a patch of the MGC remains unstained (Figure 9B, asterisk). Counterstaining of an immunolabeled section with hematoxylin (Figure 9C) confirmed that the unlabeled area corresponds to the superficial area rich in neuronal bodies receiving UEA-positive innervations, shown in Figure 8B.

Calcium-binding proteins are commonly used as markers in the study of the OB. We selected three markers to characterize the OL: anti-calretinin (CR, Figure 10), anti-calbindin (CB, Figure 10), and anti-secretagogin (SG, Figure 11).

Anti-CR immunostaining resulted in intense labeling in the MGC of the OL and in the AOB (Figure 10A). However, the glomeruli of the MOB did not show anti-CR immunolabeling in the neuropil, although the periglomerular cells were clearly labeled (insets A.1 and B in Figure 10A). In the MGC, both the neuronal somata and the neuropil (Figure 10B) were anti-CR

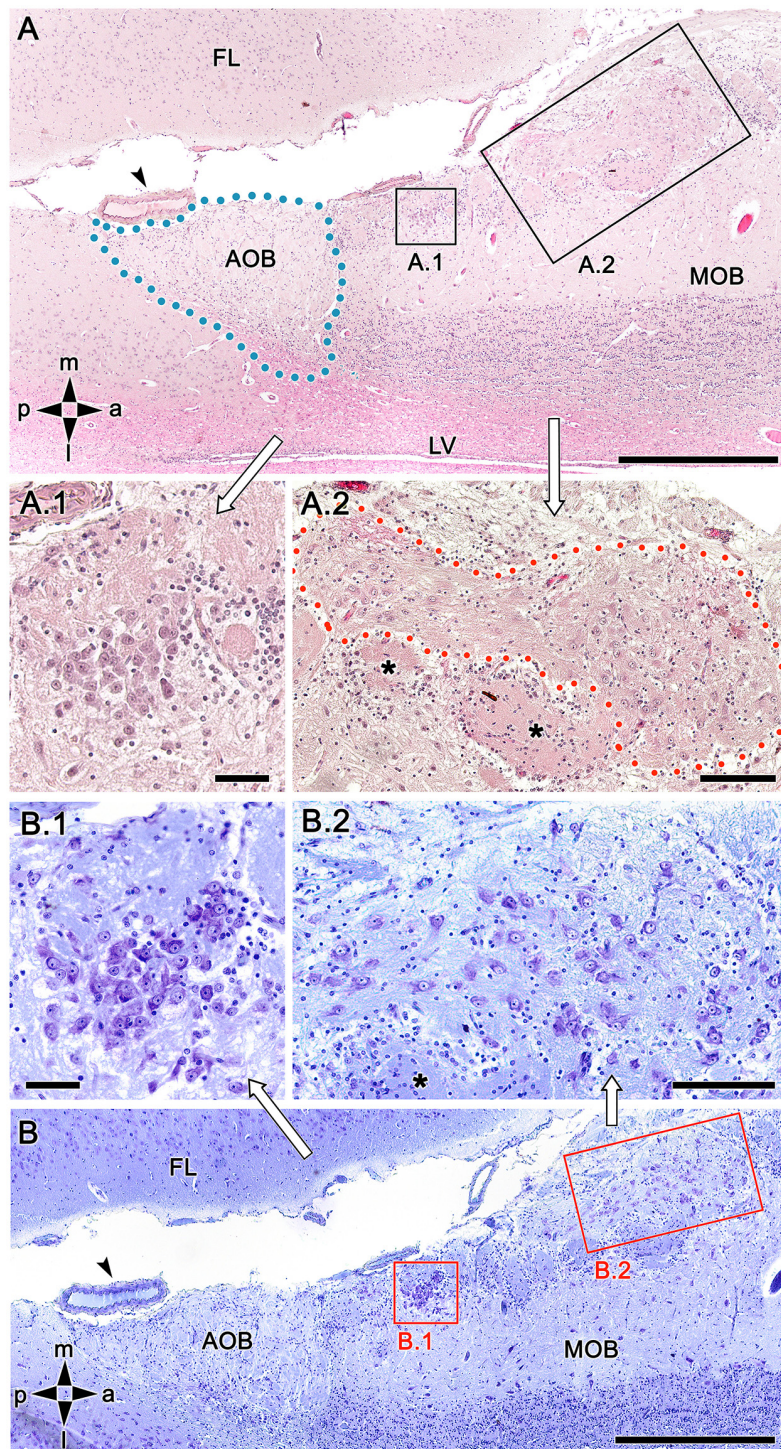


FIGURE 3

Histological study of the fox olfactory limbus (OL). **(A)** General view of the OL, in the horizontal plane. The accessory olfactory bulb (AOB), close to a large artery (arrowhead), is framed by dots. The two most strikingly discernible features of the OL are framed and shown at higher magnification in **(A.1)** and **(A.2)**: the dense neuronal cluster **(A.1)** and the macrogglomerular complex (MGC, delimited by red dots in **A.2**), a broad nervous formation consisting of neuronal somata distributed within a neuropil with clearly distinct boundaries. Small, irregularly shaped glomeruli were observed deep to both structures (asterisks). **(B)** Consecutive, Nissl-stained serial sections showing the morphology of the neuronal somata. Both the denser aggregates **(B.1)** and the MGC **(B.2)**, possess polygonal, ellipsoidal, and rounded somata. FL, frontal lobe; LV, lateral ventricle; MOB, main olfactory bulb. Orientation: m, medial; l, lateral; p, posterior; a, anterior. Scale bars: **(A,B)**: 500 μm . **(A.1,B.1)**: 100 μm . **(A.2,B.2)**: 250 μm .



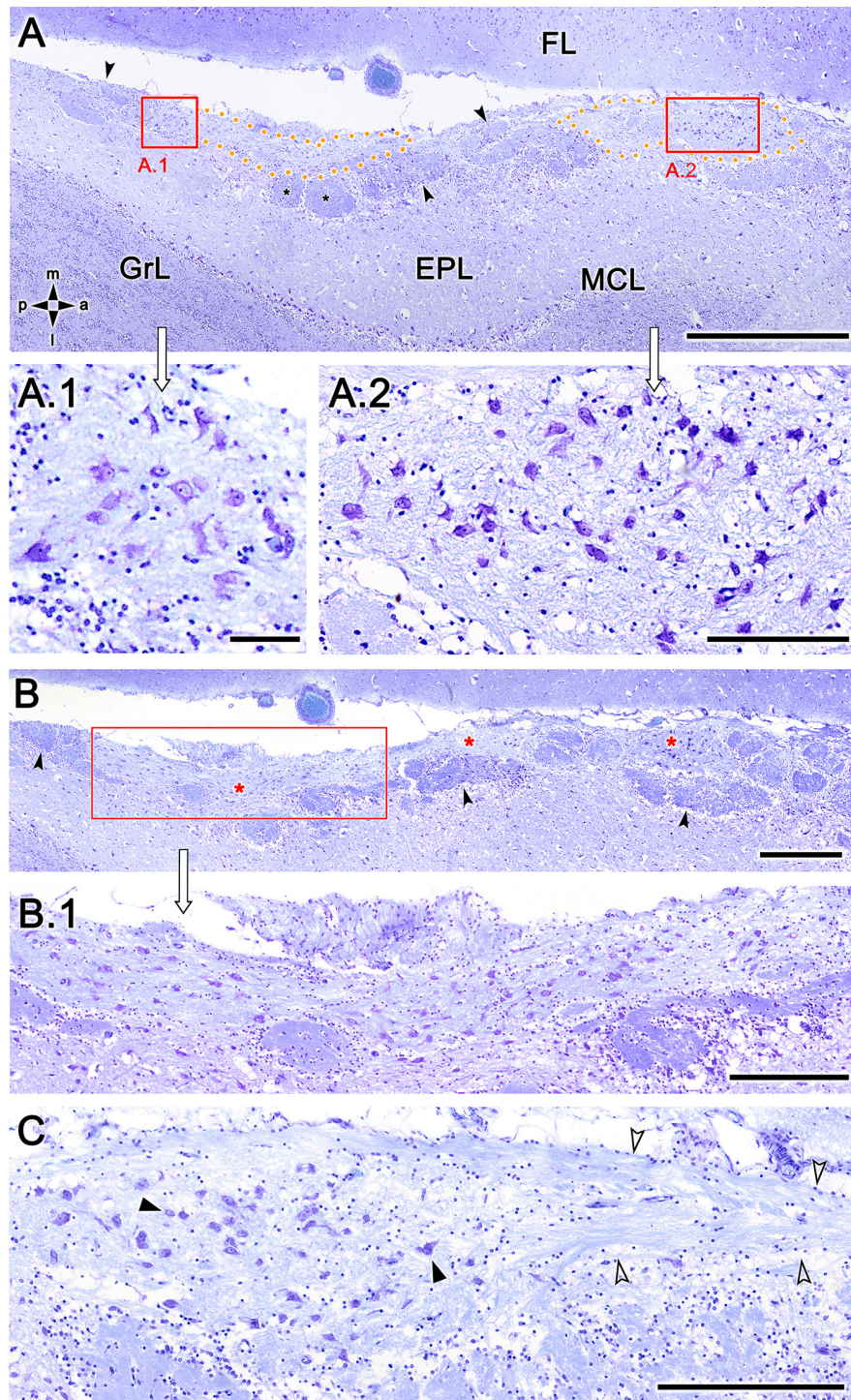


FIGURE 4

Nissl-stained sections of the fox olfactory limbus (OL) at different horizontal levels. Serial Nissl-stained sections from a single specimen reveal the development of the OL in this species. **(A)** A neuronal cluster (box enlarged in **A.1**) and the superficial macroglomerular complex (MGC, encircled by yellow dots and partially enlarged in **A.2**) were observed in a section at the ventral level. Most glomeruli proximal to the MGC had irregular and atypical shapes (arrowheads), but some appeared spherical (black asterisk). **(B)** A more dorsal section shows the extent of the MGC (red asterisks). The red box is shown at a higher magnification in **(B.1)**. Atypical glomeruli were also observed (arrowheads). **(C)** An even more dorsal section shows the morphologies of MGC neurons (black arrowheads) and their association with a prominent fascicle of nerve fibers (open arrowheads). FL, frontal lobe of the telencephalon; GrL, granular layer; EPL, external plexiform layer; MCL, mitral cell layer. Orientation: m, medial; l, lateral; p, posterior; a, anterior. Scale bars: **(A)**: 1 mm. **(B)**: 500 μ m. **(A.2,B.1,C)**: 250 μ m. **(A.1)**: 100 μ m.

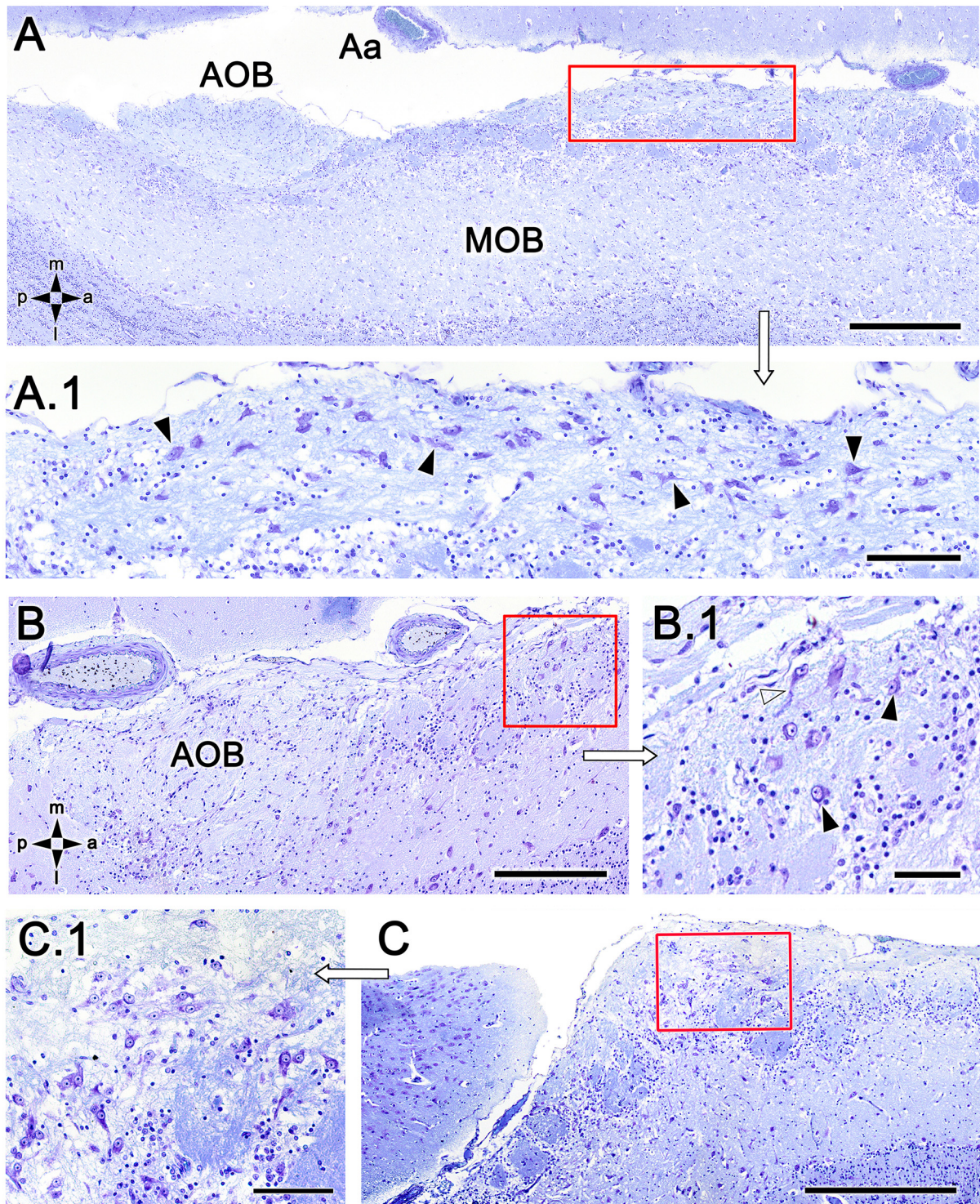
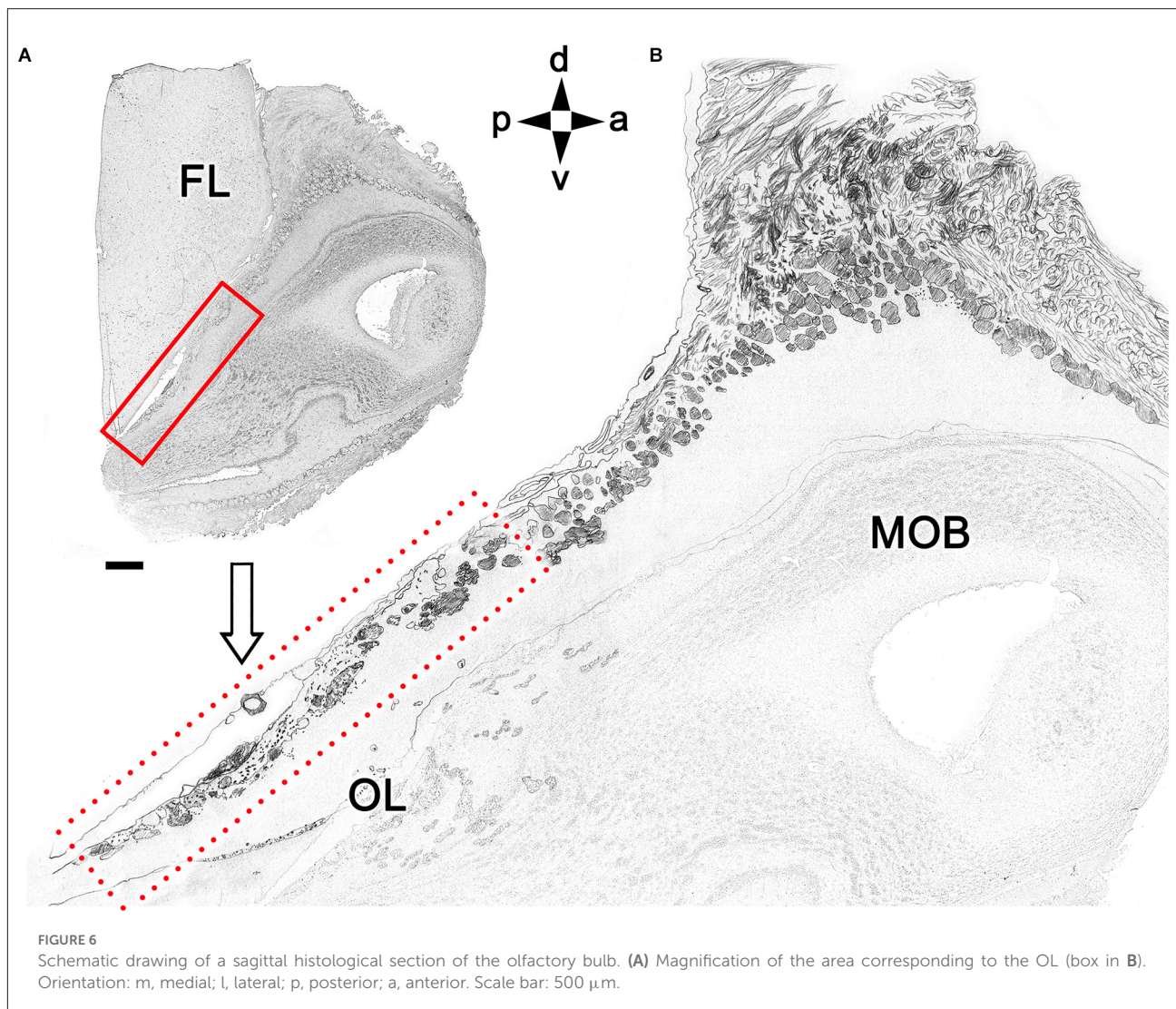


FIGURE 5

Nissl-stained sections of the fox olfactory limbus (OL). **(A)** A ventral section shows the topography of the nervous formation, located on the bulbar surface, superficial to the glomeruli. **(A.1)** A higher magnification of the red box in **(A)** shows numerous neuronal somata (arrowheads). **(B)** Horizontal section at the level of the AOB. Anterior to the AOB, a superficial neuronal cluster surrounded by atypical glomeruli can be observed (red box, magnified in **B.1**). **(B.1)** The neuronal somata have oval shapes (arrowheads), and the origin of thick processes is visible (open arrowhead). **(C)** In this specimen, the neuronal cluster is located in a more anterior position, very close to the pial surface. **(C.1)** At a higher magnification, the neurons show similar morphology to that of the specimen shown in **(B)**. Aa, artery; AOB, accessory olfactory bulb; MOB, main olfactory bulb. Orientation: m, medial; l, lateral; p, posterior; a, anterior. Scale bars: **(A,C)**: 500 μm . **(B)**: 250 μm . **(A.1,C.1)**: 100 μm . **(B.1)**: 50 μm .



immunopositive. Remarkably, anti-CR did not stain the mitral somata of the MOB. In sections performed at the level of the NVN, where the MGC is elongated and the neuronal somata are dispersed, the pattern of anti-CR immunopositivity was maintained (**Figure 10C**), although not all atypical glomeruli were CR-positive at this level.

The immunolabeling pattern obtained with anti-CB immunostaining was similar to that observed with anti-CR immunostaining. Somata belonging to the MGC were intensely stained, and atypical glomeruli were variably labeled, differentiating CB-positive and CB-negative subpopulations of atypical glomeruli (**Figures 10D–F**).

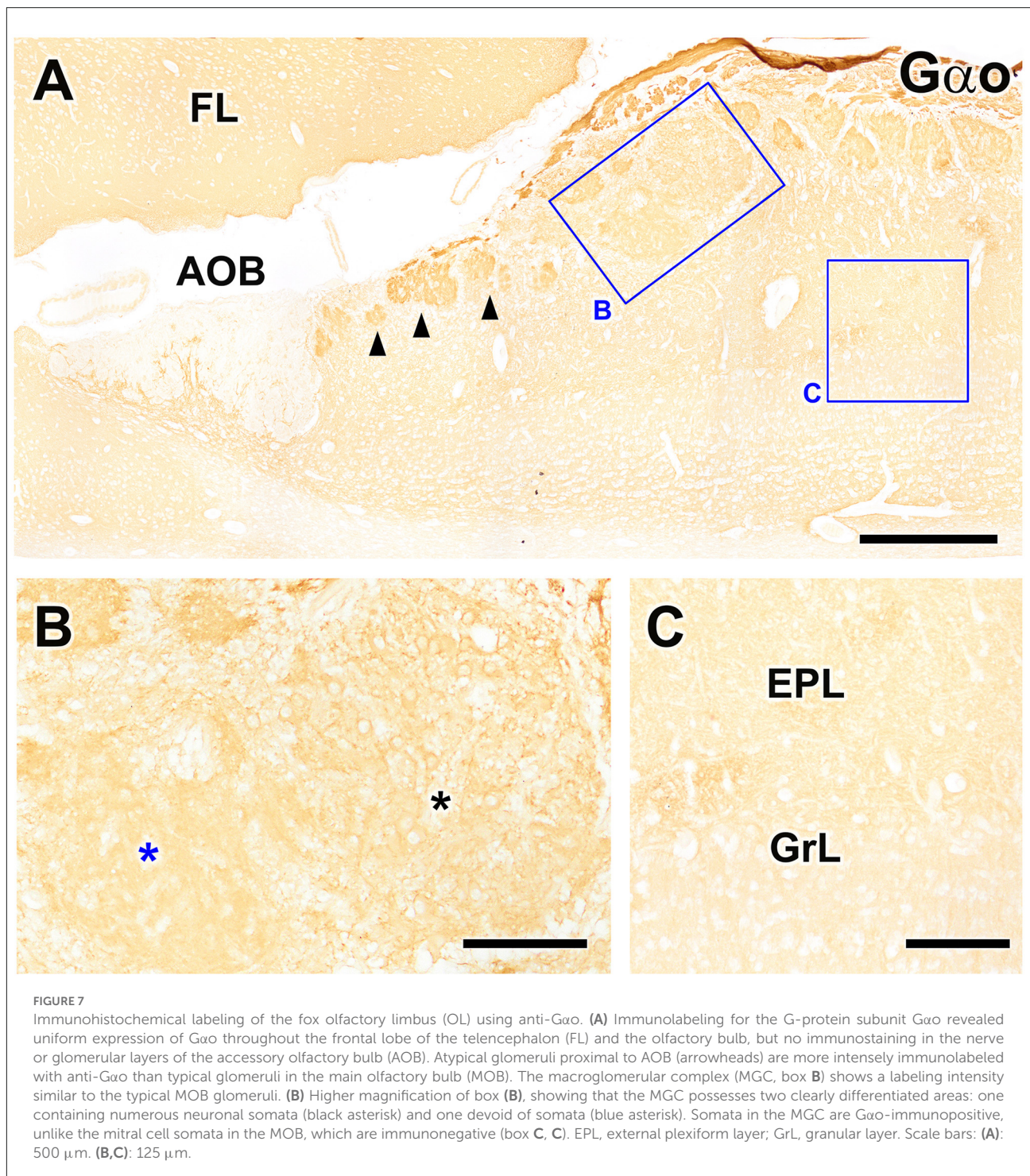
Anti-SG immunostaining produces a different immunolabeling pattern from anti-CR and anti-CB immunostaining. Anti-SG immunostaining labeled the entire glomeruli population in the OL and MOB, and periglomerular cells were intensely labeled (**Figure 11A**). Both the neuropil and the neurons scattered in the MGC were

anti-SG immunopositive, although with varying degrees of labeling (**Figure 11B**).

As a summary of the results obtained, **Table 2** shows an overview of the main immunohistochemical and structural features of the olfactory limbus in comparison to those of the glomeruli in both the main and accessory olfactory bulb.

Discussion

Prior OB investigations have primarily focused on the MOS and the VNS. Although we have made substantial advancements in our understanding of other subsystems, particularly the necklace region, which consists of a ring of interconnected glomeruli encircling the caudal end of the MOB and the anterior AOB, most research has been performed in rats and mice, and the presence and organization of olfactory subsystems in other mammalian groups remain



very poorly studied. However, neuroanatomical studies of the MOB and AOB comparing laboratory rodents with other mammals, such as lagomorphs (Villamayor et al., 2020), bats (Frahm and Bhatnagar, 1980), canids (Choi et al., 2010; Ortiz-Leal et al., 2022b), artiodactyls (Park et al., 2014; Kondoh et al., 2017a), and primates (Alonso et al., 1998) have identified substantial differences in their organization between

orders. Therefore, undescribed integrated olfactory subsystems may exist in other species, characterized by noncanonical morphological patterns, and these should be thoroughly investigated to comprehend interspecies differences in olfactory physiology from a solid and reliable morphological basis. The present study presents neuroanatomical, immunohistochemical, and lectin-histochemical evidence supporting the presence

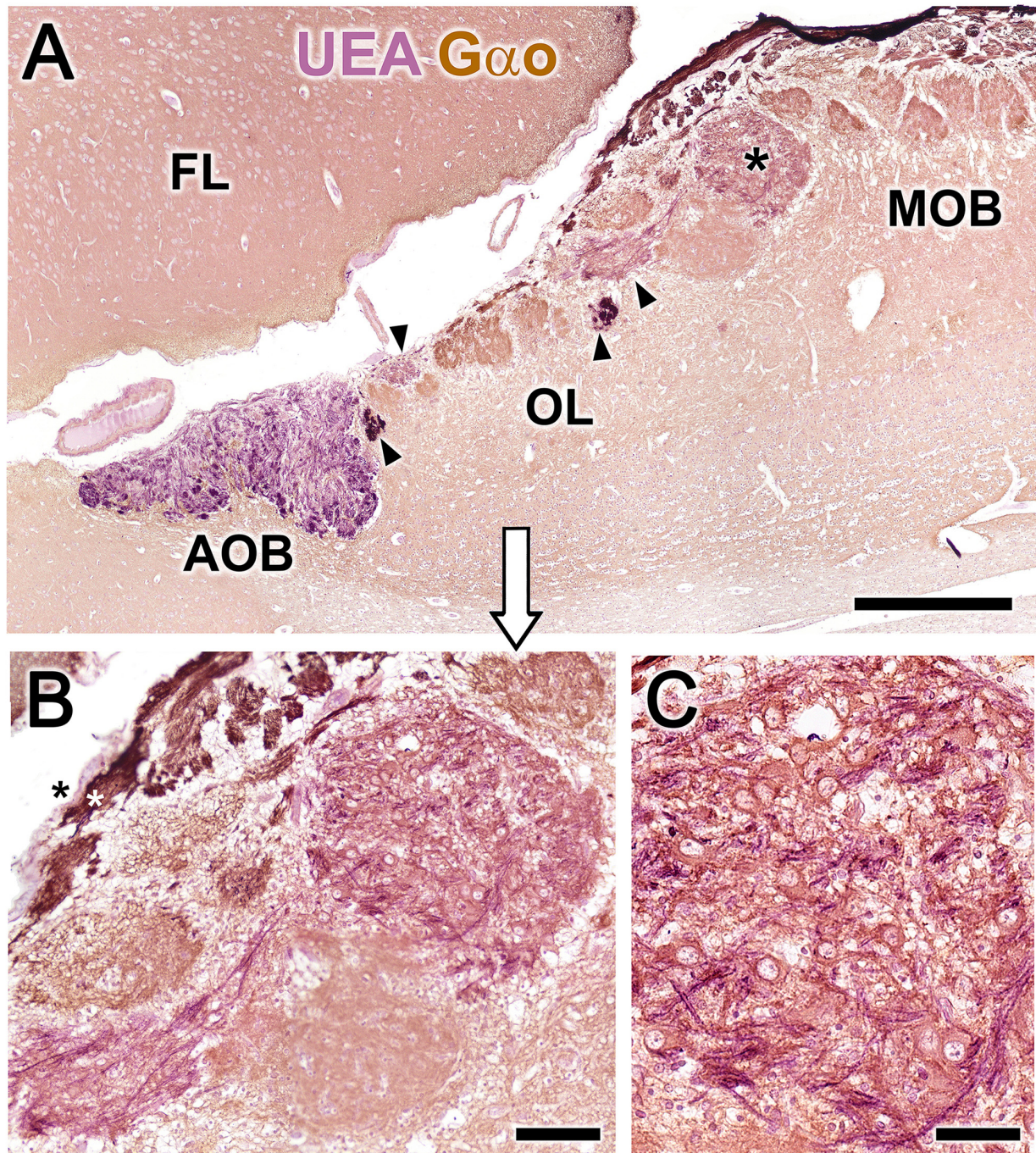
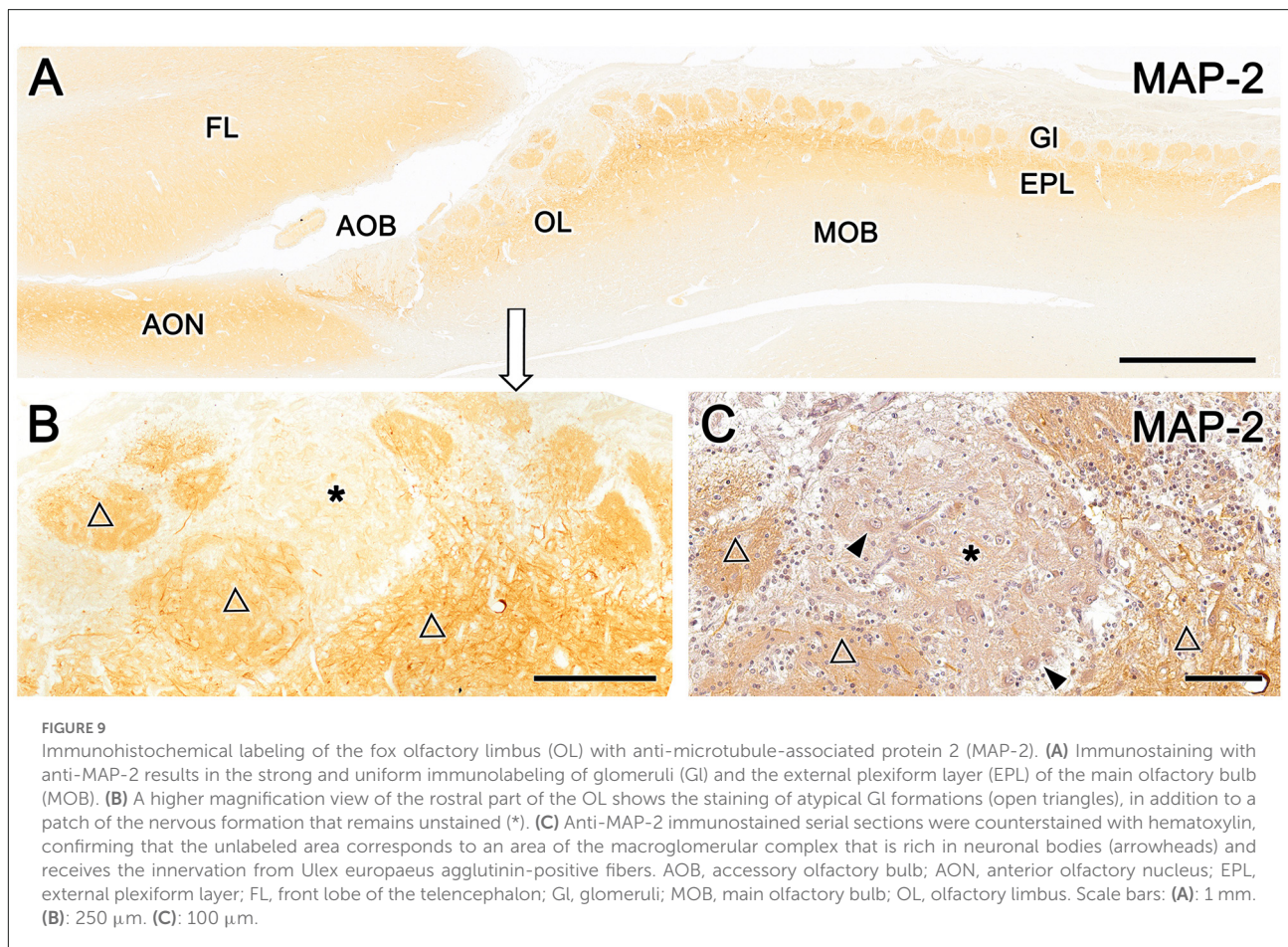


FIGURE 8
 Double-immunohistochemical labeling of the fox olfactory limb (OL). Double immunostaining with the lectin *Ulex europaeus* agglutinin (UEA, magenta) and $G\alpha_o$ antibody (brown). **(A)** The nerve and glomerular layers of the accessory olfactory bulb (AOB) are intensely labeled by UEA, whereas the main olfactory bulb (MOB) is not. In the OL, some glomeruli are UEA-negative, whereas smaller glomeruli are strongly UEA-positive (arrowheads). The macroglomerular complex (MGC, asterisk) is also UEA-positive. **(B)** Higher magnification of the MGC area, showing $G\alpha_o$ -positive somata embedded in a dense network of UEA-positive fibers. The vomeronasal nerve fibers segregate into UEA-positive (black asterisk) and $G\alpha_o$ -positive (white asterisk) components. **(C)** The MGC somata are oval in shape and $G\alpha_o$ -positive. FL, Frontal lobe of the telencephalon. Scale bars: **(A)**: 500 μm . **(B)**: 50 μm .

of an OL region characterized by a complex anatomical and morphofunctional organization that can consistently

be detected in the fox, a wild Canidae model species. This finding supports the need for additional research



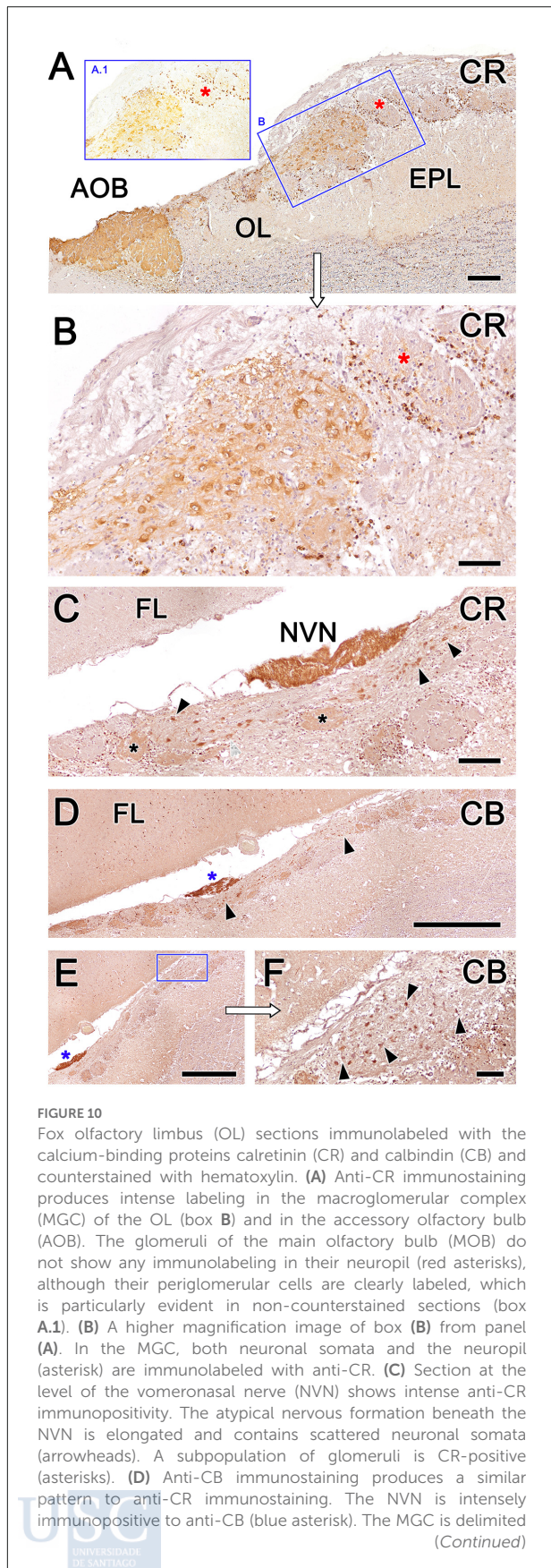
exploring the organization of potential olfactory subsystems such as the OL in other mammalian species, including humans, as these have been poorly defined in most mammals thus far.

The histology of the olfactory limb of the fox

The serial histological study of fox OL revealed the presence of a complex glomerular organization extending along the area between the caudal end of the MOB and the anterior extremity of the AOB that was detected in all examined animals. To our knowledge, the studies performed by Miodonski (1968) and Nakajima et al. (1998) characterizing the dog OB represent the only descriptions of a similar atypical organization in canids. Both authors describe an unusual organization in the transition zone between the AOB and the MOB that did not extend beyond a population of atypical glomeruli, which Miodonski ascribed to the AOB and which Nakajima ascribed to the processing of information from a subset of ORs by the MOB. However, in our serial study of the fox, we identified a complex organization that goes beyond the mere presence

of atypical glomeruli, which differed from typical glomeruli both in size and in neurochemical and lectin-histochemical properties. The presence of neuronal aggregates comprising large somata and nascent prolongations that were clearly visible with Nissl staining was remarkable. These somas were organized as both compact aggregates with a high neuronal density (Figures 3A.1, B.1, 4A.1) and scattered along the MGC, a superficial nervous formation extending over several millimeters consisting of a broad neuropil formed by bundles of nerve fibers (Figures 3A.2, B.2, 4A–C, 5A). The superficial location of the MGC and the presence of multiple neuronal somata inside it appear to preclude the existence of a direct relationship with the lateral olfactory tract. The presence of superficial neuronal clusters in the OB is surprising and has not been described previously, to our knowledge. Existing descriptions of atypical glomerular formations (Giannetti and Le Jeune, 1996; Gómez et al., 2005) in the necklace complex (Ring et al., 1997; Luo, 2008) and OL in rodents (Vargas-Barroso et al., 2017) do not include the presence of superficial clusters of neuronal somata similar to those detected here.

The sub-bulbar formations described by Larriva-Sahd (2012) in the rat associated with the anterior portion of the anterior olfactory nucleus and Villamayor et al. (2020) in the rabbit,

**FIGURE 10 (Continued)**

by arrowheads. (E) Atypical glomeruli are variably labeled with anti-CB. (F) Higher magnification of the inset in (E). Somata belonging to the MGC are intensely stained (arrowheads). AOB, accessory olfactory bulb; OL, olfactory limbus; EPL, external plexiform layer; FL, the frontal lobe of the telencephalon; NVN, vomeronasal nerve. Scale bars: (D,E): 1 mm. (A,C): 250 μm . (B,F): 100 μm .

associated with the AOB may be similar to the superficial clusters identified in the present study. However, these formations consist of clusters of large and polygonal neurons, differentiated by their locations in the deepest part of the caudal OB, directly associated with the anterior olfactory nucleus and the lateral olfactory tract, into which they incorporate their axons.

Neurochemistry of the olfactory limbus of the fox

The immunohistochemical and lectin analysis performed in the present study provided an in-depth study of the neurochemical characteristics of these neurons and their associated neuropil. Both the somas and the neuropil of the atypical glomeruli were immunopositive for the $G\alpha_o$ G protein subunit, which is widely expressed in the OB but is absent from the mitral cell somata of the fox MOB. This feature differentiates the two systems and excludes the possibility that these cells represent ectopic MOB clusters. The extensive UEA-positive innervation observed in the MGC by double immunohistochemistry is also significant (Figure 7B). UEA is an excellent histochemical marker of α -fucose (Kondoh et al., 2017b), which serves as a VNS pathway marker in several mammalian species (e.g., dogs and pigs; Salazar et al., 1994, 2000) and mediates processes that include learning and memory, neurite outgrowth, and synaptic plasticity (Matthies et al., 1996; Kalovidouris et al., 2005; Murrey et al., 2009). We recently verified that α -fucose could be used as a VNS pathway marker in our study of the fox AOB (Ortiz-Leal et al., 2022a), and our present study of the OL reveals that UEA-positive nerve endings projecting from the NVN innervate the AOB, a subpopulation of atypical glomeruli in the OL, and $G\alpha_o$ -positive neuronal clusters of the MGC (Figure 7B).

MAP-2 is a useful marker for the dendritic trees of mitral and principal cells (Dehmelt and Halpain, 2005) and is not expressed in axons (Bernhardt and Matus, 1984). Anti-MAP-2 staining in the OL is, therefore, a good tool for characterizing glomeruli shapes. We found that atypical glomeruli stain in the OL more intensely for anti-MAP-2 than glomeruli in the MOB and show greater morphological diversity (Figure 7A). A similar pattern was described in a morphometric study of the mouse glomerular necklace complex (Walz et al., 2007). Another difference between the OL and the MOB is the more intense

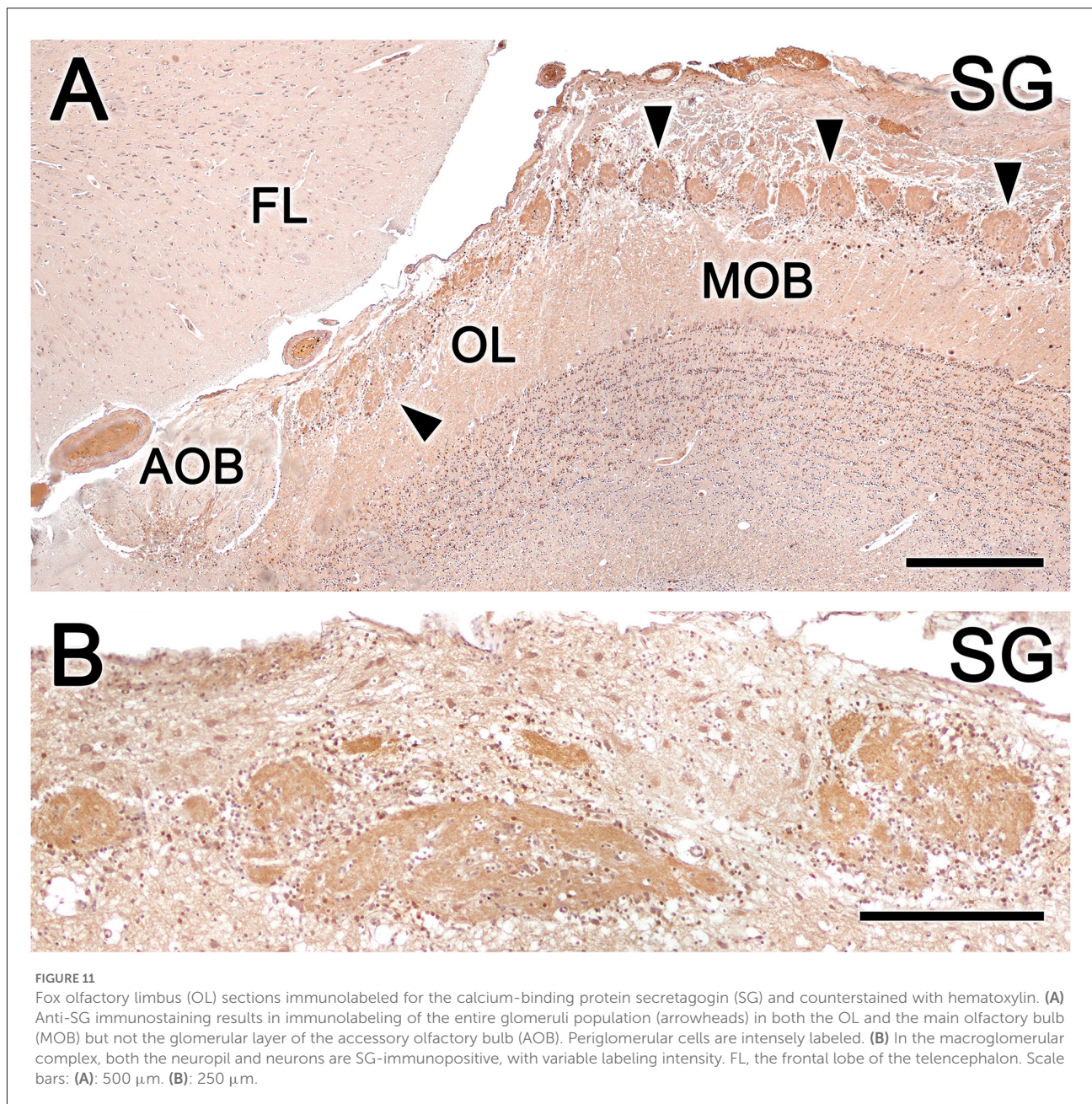
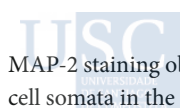


TABLE 2 Comparison of immunohistochemical and structural features of the olfactory limb, and the glomeruli of the main and accessory olfactory bulb.

	UEA	G α _o	G α _{i2}	MAP2	CB	CR	SG	Principal cells size (μm)	Principal cells arrangement
OL	+++ ^a	+++ ^a	-	+++ ^a	++	++	+++	50–500	Compact clusters/MGC
MOB Glomeruli	-	+++	-	+++	+ ^b	+ ^b	+++	100–150	Mitral cell layer
AOB Glomeruli	+++	-	+++	-	+++	+++	-	50–100	Internal cell layer

Abbreviations: a, Heterogeneous immunopositivity; b, Immunolabeling restricted to periglomerular cells. +++, strong positive; ++, moderate positive; +, weak expression; -, negative.



MAP-2 staining observed in MGC somata compared with mitral cell somata in the MOB (Figure 7B).

Calcium-binding proteins are widely used as markers in the study of the OB (Crespo et al., 1997; Defterali et al., 2021), and

staining patterns revealed neurochemical differences between the OL and MOB. Atypical glomeruli and neuronal aggregates in the OL were intensely stained with both CR and CB, which were observed in both the neuronal somata and neuropil. However, little labeling was observed in the neuropil of MOB glomeruli, although periglomerular cells were immunopositive. Abundant CB and CR immunopositive periglomerular cells proximal to atypical glomeruli are similar to the descriptions of the rat OB (Crespo et al., 1997). Strikingly, the principal neurons of the OL were both CB and CR immunopositive, unlike the mitral cells of the fox MOB. The absence of immunoreactivity to CR in the MOB mitral cells seems to be specific to canids as it has been described in dogs (Choi et al., 2010), wolves, and fox (Ortiz-Leal et al., 2022b), but not in other species such as rats (Wouterlood and Härtig, 1995) or meerkats (Torres et al., 2021). SG is a more recently discovered calcium-binding protein (Wagner et al., 2000) that has been less studied in the olfactory bulb than CR and CB; however, SG has been shown to be widely expressed throughout the OB layers (Kosaka and Kosaka, 2013; Pérez-Revuelta et al., 2020). In the fox, this broad pattern of SG immunolabeling was conserved in the OL and MOB but not in the AOB.

Functional correlates for the fox olfactory limb

The innervation of OL neuronal clusters by UEA-positive fibers establishes a clear morphofunctional link between the OL and VNS, as UEA is a highly specific marker for the fox VNS, labeling the VNS neuroepithelium, NVN, and nerve and glomerular layers of the AOB. Neuronal clusters of the OL were also G α -positive in both somata and the neuropil, which functionally differentiates OL neuronal clusters from the primary neurons in the MOB. In addition, different neurochemical patterns between the primary cells of the OL and the mitral cells of the MOB were identified by immunostaining for MAP-2, CB, and CR.

These morphological and neurochemical observations suggest a potential functional link between the OL and the extensive G α immunoreactivity observed in the fox VNO neuroepithelium (Ortiz-Leal et al., 2020). Subsequent neurochemical characterization of the fox AOB (Ortiz-Leal et al., 2022a) failed to detect G α immunoreactivity in the AOB nerve layer, suggesting that sensory information detected by the vomeronasal receptors associated with G α -positive neurons project to a different bulbar territory. The functional linkage of the OL through UEA-positive fibers projecting from the VNO, the high level of OL-associated G α immunoreactivity, and the topographical detection of G α -positive axons in the OL and the NVN (Figure 8B) lead us to hypothesize that the OL is at least partially involved in the processing of sensory information from G α -positive neuroepithelial cells in the VNO.

The link between the fox OL with the VNS and the strategic location of the OL between the AOB and the MOB suggest that the fox OL may be involved in the processing of specific stimuli signaling relevant intraspecific socio-sexual cues, similar to the suggested functionality of this region in laboratory rodents (Weruaga et al., 2001; Leinders-Zufall et al., 2007; Larriva-Sahd, 2012; Vargas-Barroso et al., 2017).

Our observations do not enable us to determine if the OL of the fox contains glomerular structures functionally similar to those found in rodent OL: the necklace glomeruli and the subset of “atypical” glomeruli with acetylcholinesterase (AChE) reactivity. This is a question that is still far from being answered, since the presence of the olfactory subsystems identified in rodents that project to both structures, including the Grüneberg ganglion, septal organ, and GC-D+ chemosensory neurons, has not been identified in the fox or in any other canid. The study of the expression in the fox OL of human placental antigen X-P2 (PAX), a marker of rodent necklace glomeruli, and acetylcholinesterase, characteristic of atypical glomeruli, could shed light on this question.

Nevertheless, features discussed in the preceding sections, such as the large development of the fox OL, both in terms of dimensions and structural complexity, and the remarkably high concentration of neuronal somata located in the most superficial bulb layer, proximal to the pial surface, suggest that the fox OL is a structure of greater complexity and functional significance than the necklace complex or the subset of atypical glomeruli described in rodents.

Canids domestication and olfactory limb morphology

The high degree of development and structural and neurochemical complexity found in the fox OL has not been described in the dog, which is the best-studied canid, with only the studies by Miodonski (1968) and Nakajima et al. (1998) indicating the presence of atypical glomerular organizations in the dog. However, neither of these studies described a level of structural or neurochemical complexity in the dog comparable to that observed in the fox.

The fox represents a particularly good model for researching the impacts of domestication in Canidae due to long-term experiments aimed at replicating the early domestication of this species (Belyaev et al., 1985; Wang et al., 2018). Selection for tameness resulted in similar changes in behavior, physiology, and genetic diversity in foxes as those observed in domesticated dogs (Trut et al., 2009; Kukekova et al., 2018).

Our previous studies of the fox VNS indicated the presence of striking structural differences between the dog and fox AOB, which we hypothesize might partially be the result of the domestication process (Ortiz-Leal et al., 2020, 2022a).

The current theory is that the domestication of dogs has resulted in an involution of olfactory development associated with the detection of pheromones and other semiochemicals (Jeziński et al., 2016) which is supported by the anatomical differences in the fox OL and currently available descriptions of the dog OB.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

Ethical review and approval was not required for the animal study because all the animals employed in this study died by natural causes. Accordingly, the Bioethics Committee of the University of Santiago de Compostela has determined that ethics approval was not required for this study. Their report has been added to the submission.

Author contributions

PS-Q, AL-B, and LF collected the tissues. IO-L, MT, and PS-Q processed the tissue. IO-L, MT, PS-Q, AL-B, LF, VV-B, and JL-S analyzed and discussed the results. IO-L, MT, PS-Q, VV-B, and JL-S wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

References

- Adams, D. R. (1972). Olfactory and non-olfactory epithelia in the nasal cavity of the mouse, *Peromyscus*. *Am. J. Anat.* 133, 37–49. doi: 10.1002/aja.1001330104
- Adrio, F., Rodríguez-Moldes, I., and Anadón, R. (2011). Distribution of glycine immunoreactivity in the brain of the siberian sturgeon (*Acipenser baeri*): comparison with γ -aminobutyric acid. *J. Comp. Neurol.* 519, 1115–1142. doi: 10.1002/cne.22556
- Alonso, J. R., Porteros, A., Crespo, C., Arevalo, R., Briñon, J. G., Weruaga, E., et al. (1998). Chemical anatomy of the macaque monkey olfactory bulb: NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase activity. *J. Comp. Neurol.* 402, 419–434. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981221)402:3<3C419::AID-CNE9%3E3.0.CO;2-C
- Alpár, A., Attems, J., Mulder, J., Hökfelt, T., and Harkany, T. (2012). The renaissance of Ca^{2+} -binding proteins in the nervous system: secretagogin takes center stage. *Cell. Signal.* 24, 378–387. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.09.028
- Baimbridge, K. G., Celio, M. R., and Rogers, J. H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15, 303–308. doi: 10.1016/0166-2236(92)90081-i
- Barrios, A. W., Núñez, G., Sanchez Quinteiro, P., and Salazar, I. (2014a). Anatomy, histochemistry and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front. Neuroanat.* 8:63. doi: 10.3389/fnana.2014.00063
- Barrios, A. W., Sanchez-Quinteiro, P., and Salazar, I. (2014b). Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Front. Neuroanat.* 8:106. doi: 10.3389/fnana.2014.00106
- Belyaev, D. K., Plyusnina, I. Z., and Trut, L. N. (1985). Domestication in the silver fox (*Vulpes fulvus Desm*): changes in physiological boundaries of the sensitive period of primary socialization. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 13, 359–370. doi: 10.1016/0168-1591(85)90015-2
- Bernhardt, R., and Matus, A. (1984). Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J. Comp. Neurol.* 226, 203–221. doi: 10.1002/cne.902260205
- Breer, H., Fleischer, J., and Strotmann, J. (2006). Signaling in the chemosensory systems: the sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1465–1475. doi: 10.1007/s00018-006-6108-5
- Chengetanai, S., Bhagwandin, A., Bertelsen, M. F., Hård, T., Hof, P. R., Spocter, M. A., et al. (2020). The brain of the african wild dog. II. the olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 528, 3285–3304. doi: 10.1002/cne.25007
- Choi, J. H., Lee, C. H., Yoo, K.-Y., Hwang, I. K., Lee, I. S., Lee, Y. L., et al. (2010). Age-related changes in calbindin-d28k, parvalbumin and calretinin

Funding

This work was partially supported by a grant from “Consello Social Universidade de Santiago de Compostela” 2022-PU004.

Acknowledgments

We would like to show special gratitude to Prof. Ludwig Wagner (Medical University, Vienna) for kindly providing us with the secretagogin antibody. We thank the Wildlife Recovery Centres of Galicia, Dirección Xeral de Patrimonio Natural (Xunta de Galicia, Spain), and Federación Galega de Caza for providing the red foxes used in this study.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- immunoreactivity in the dog main olfactory bulb. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1–12. doi: 10.1007/s10571-009-9425-z
- Crespo, C., Alonso, J. R., Briñón, J. G., Weruaga, E., Porteros, A., Arévalo, R., et al. (1997). Calcium-binding proteins in the periglomerular region of typical and atypical olfactory glomeruli. *Brain Res.* 745, 293–302. doi: 10.1016/s0006-8993(96)01185-7
- Crespo, C., Liberia, T., Blasco-Ibáñez, J. M., Nácher, J., and Varea, E. (2013). The circuits of the olfactory bulb. The exception as a rule: the olfactory bulb. The exception as a rule. *Anat. Rec. (Hoboken)* 296, 1401–1412. doi: 10.1002/ar.22732
- de la Rosa-Prieto, C., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Bañon, I., Argandoña-Palacios, L., García-Muñozguren, S., and Martínez-Marcos, A. (2010). Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice. *Dev. Neurobiol.* 70, 961–970. doi: 10.1002/dneu.20838
- Defterali, Ç., Moreno-Estellés, M., Crespo, C., Díaz-Guerra, E., Díaz-Moreno, M., Vergaño-Vera, E., et al. (2021). Neural stem cells in the adult olfactory bulb core generate mature neurons *in vivo*. *Stem Cells* 39, 1253–1269. doi: 10.1002/stem.3393
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6:204. doi: 10.1186/gb-2004-6-1-204
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–218. doi: 10.1038/35093026
- Frahm, H. D., and Bhatnagar, K. P. (1980). Comparative morphology of the accessory olfactory bulb in bats. *J. Anat.* 130, 349–365.
- Fuss, S. H., Omura, M., and Mombaerts, P. (2005). The Gruenberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2649–2654. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04468.x
- Giannetti, N., and Le Jeune, H. (1996). Atypical olfactory glomeruli subset of the rat: quantitative study and organization of the peripheral afferents. *Chem. Senses* 21, 303–312. doi: 10.1093/chemse/21.3.303
- Gómez, C., Briñón, J. G., Barbado, M. V., Weruaga, E., Valero, J., and Alonso, J. R. (2005). Heterogeneous targeting of centrifugal inputs to the glomerular layer of the main olfactory bulb. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 238–254. doi: 10.1016/j.jchemneu.2005.01.005
- Grüneberg, H. (1973). A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 140, 39–52. doi: 10.1007/BF00520716
- Halpern, M., Shapiro, L. S., and Jia, C. (1995). Differential localization of g proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res.* 677, 157–161. doi: 10.1016/0006-8993(95)00159-n
- Hasui, K., Takatsuka, T., Sakamoto, R., Matsushita, S., Tsuyama, S., Izumo, S., et al. (2003). Double autoimmunostaining with glycine treatment. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1169–1176. doi: 10.1177/002215540301500907
- Hermanowicz-Sobieraj, B., Bogus-Nowakowska, K., and Robak, A. (2018). Calcium-binding proteins expression in the septum and cingulate cortex of the adult guinea pig. *Ann. Anat.* 215, 30–39. doi: 10.1016/j.aanat.2017.09.009
- Herrada, G., and Dulac, C. (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90, 763–773. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80536-x
- Jeziński, T., Ensminger, J., and Papet, L. E. (2016). *Canine Olfaction Science and Law: Advances in Forensic Science, Medicine, Conversation, and Environmental Remediation*. Boca Raton: CRC PRESS.
- Kalovidouris, S. A., Gama, C. I., Lee, L. W., and Hsieh-Wilson, L. C. (2005). A role for fucose (1–2) galactose carbohydrates in neuronal growth. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 1340–1341. doi: 10.1021/ja044631v
- Kaluza, J. F., Gussing, F., Bohm, S., Breer, H., and Strotmann, J. (2004). Olfactory receptors in the mouse septal organ. *J. Neurosci. Res.* 76, 442–452. doi: 10.1002/jnr.20083
- Kondoh, D., Watanabe, K., Nishihara, K., Ono, Y. S., Nakamura, K. G., Yuhara, K., et al. (2017a). Histological properties of main and accessory olfactory bulbs in the common hippopotamus. *Brain. Behav. Evol.* 90, 224–231. doi: 10.1159/000479180
- Kondoh, D., Kamikawa, A., Sasaki, M., and Kitamura, N. (2017b). Localization of α -2 fucose glycan in the mouse olfactory pathway. *Cells Tissues Organs* 203, 20–28. doi: 10.1159/000447009
- Kosaka, K., and Kosaka, T. (2013). Secretagogin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci. Res.* 77, 16–32. doi: 10.1016/j.neures.2013.08.006
- Kotani, T., Murata, Y., Ohnishi, H., Mori, M., Kusakari, S., Saito, Y., et al. (2010). Expression of ptpro in the interneurons of adult mouse olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 518, 119–136. doi: 10.1002/cne.22239
- Krieger, J., Schmitt, A., Löbel, D., Gudermann, T., Schultz, G., Breer, H., et al. (1999). Selective activation of g protein subtypes in the vomeronasal organ upon stimulation with urine-derived compounds. *J. Biol. Chem.* 274, 4655–4662. doi: 10.1074/jbc.274.8.4655
- Kukekova, A. V., Johnson, J. L., Xiang, X., Feng, S., Liu, S., Rando, H. M., et al. (2018). Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 1479–1491. doi: 10.1038/s41598-018-0611-6
- Larriba-Sahd, J. (2012). Cytological organization of the alpha component of the main olfactory nucleus and olfactory limb. *Front. Neuroanat.* 6:23. doi: 10.3389/fnana.2012.00023
- Leinders-Zufall, T., Cockerham, R. E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D. L., Reed, R. R., et al. (2007). Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 14507–14512. doi: 10.1073/pnas.0704965104
- Levai, O., Breer, H., and Strotmann, J. (2003). Subzonal organization of olfactory sensory neurons projecting to distinct glomeruli within the mouse olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 458, 209–220. doi: 10.1002/cne.10559
- Luo, M. (2008). The necklace olfactory system in mammals. *J. Neurogenet.* 22, 229–238. doi: 10.1080/01677060802340228
- Matthies, H., Staak, S., and Krug, M. (1996). Fucose and fucosyllactose enhance *in vitro* hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 725, 276–280. doi: 10.1016/0006-8993(96)00406-4
- McCotter, R. E. (1912). The connection of the vomeronasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other mammals. *Anat. Rec.* 6, 299–318. doi: 10.1002/ar.1090060802
- Miodonski, R. (1968). Bulbus olfactorius of the dog (*Canis familiaris*). *Acta Biol. Cracov* 11, 65–76.
- Mucignat-Caretta, C., Redaelli, M., and Caretta, A. (2012). One nose, one brain: contribution of the main and accessory olfactory system to chemosensation. *Front. Neuroanat.* 6:46. doi: 10.3389/fnana.2012.00046
- Munger, S. D. (2009). Noses within noses. *Nature* 459, 521–522. doi: 10.1038/459521a
- Murrey, H. E., Ficarro, S. B., Krishnamurthy, C., Domino, S. E., Peters, E. C., and Hsieh-Wilson, L. C. (2009). Identification of the plasticity-relevant fucose- α (1–2)-galactose proteome from the mouse olfactory bulb. *Biochemistry* 48, 7261–7270. doi: 10.1021/bi900640x
- Nakajima, T., Sakaue, M., Kato, M., Saito, S., Ogawa, K., and Taniguchi, K. (1998). Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on the accessory olfactory bulb of the dog. *Anat. Rec.* 252, 393–402. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199811)252:3<393::AID-AR7>3.0.CO;2-T
- Ortiz-Leal, I., Torres, M. V., Villamayor, P. R., Fidalgo, L. E., López-Beceiro, A., and Sanchez-Quintero, P. (2022a). Can domestication shape Canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Ann. Anat.* 240:151881. doi: 10.1016/j.aanat.2021.151881
- Ortiz-Leal, I., Torres, M. V., López-Callejo, L. N., Fidalgo, L. E., López-Beceiro, A., and Sanchez-Quintero, P. (2022b). Comparative neuroanatomical study of the main olfactory bulb in domestic and wild canids: dog, wolf and red fox. *Animals (Basel)* 12:1079. doi: 10.3390/ani12091079
- Ortiz-Leal, I., Torres, M. V., Villamayor, P. R., López-Beceiro, A., and Sanchez-Quintero, P. (2020). The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *J. Anat.* 237, 890–906. doi: 10.1111/joa.13254
- Pardo-Bellver, C., Vila-Martin, M. E., Martínez-Bellver, S., Villafranca-Faus, M., Teruel-Sanchis, A., Savarelli-Balsamo, C. A., et al. (2022). Neural activity patterns in the chemosensory network encoding vomeronasal and olfactory information in mice. *Front. Neuroanat.* 16:988015. doi: 10.3389/fnana.2022.988015
- Park, C., Ahn, M., Lee, J.-Y., Lee, S., Yun, Y., Lim, Y.-K., et al. (2014). A morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochem.* 116, 258–264. doi: 10.1016/j.acthis.2013.08.003
- Pérez-Revuelta, L., Téllez de Meneses, P. G., López, M., Briñón, J. G., Weruaga, E., Díaz, D., et al. (2020). Secretagogin expression in the mouse olfactory bulb under sensory impairments. *Sci. Rep.* 10:21533. doi: 10.1038/s41598-020-78499-5
- Prince, J. E. A., Cho, J. H., Dumontier, E., Andrews, W., Cutforth, T., Tessier-Lavigne, M., et al. (2009). Robo-2 controls the segregation of a portion of basal vomeronasal sensory neuron axons to the posterior region of the accessory olfactory bulb. *J. Neurosci.* 29, 14211–14222. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3948-09.2009

- Ring, G., Mezza, R. C., and Schwob, J. E. (1997). Immunohistochemical identification of discrete subsets of rat olfactory neurons and the glomeruli that they innervate. *J. Comp. Neurol.* 388, 415–434. doi: 10.1002/(SICI)1096-8961(19971124)388:3%3C415::AID-CNE5%3E3.0.CO;2-3
- Salazar, I., Cifuentes, J. M., Quinteiro, P. S., and Caballero, T. G. (1994). Structural, morphometric and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. *Anat. Rec.* 240, 277–285. doi: 10.1002/ar.1092400216
- Salazar, I., Cifuentes, J. M., and Sánchez-Quintero, P. (2013). Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *Anat. Rec. (Hoboken)* 296, 146–155. doi: 10.1002/ar.22617
- Salazar, I., Lombardero, M., Cifuentes, J. M., Quinteiro, P. S., and Aleman, N. (2003). Morphogenesis and growth of the soft tissue and cartilage of the vomeronasal organ in pigs. *J. Anat.* 202, 503–514. doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00183.x
- Salazar, I., Quinteiro, P. S., Cifuentes, J. M., and Lombardero, M. (1998). The accessory olfactory bulb of the mink, *Mustela vison*: a morphological and lectin histochemical study. *Anat. Histol. Embryol.* 27, 297–300. doi: 10.1111/j.1439-0264.1998.tb00197.x
- Salazar, I., and Sánchez-Quintero, P. (2011). A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microsc. Res. Tech.* 74, 1109–1120. doi: 10.1002/jemt.21002
- Salazar, I., Sanchez-Quintero, P., Barrios, A. W., López Amado, M., and Vega, J. A. (2019). Anatomy of the olfactory mucosa. *Handb. Clin. Neurol.* 247, 47–65. doi: 10.1016/B978-0-444-63855-7.00004-6
- Salazar, I., Sánchez Quinteiro, P., Cifuentes, J. M., Fernández, P., and Lombardero, M. (1997). Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. *Anat. Rec.* 247, 129–136. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199701)247:1<129::AID-AR15>3.0.CO;2-R
- Salazar, I., Sanchez-Quintero, P., Lombardero, M., and Cifuentes, J. M. (2000). A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. *J. Anat.* 196, 15–22. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.1961.0015.x
- Scalia, F., and Winans, S. S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* 161, 31–55. doi: 10.1002/cne.901610105
- Shinoda, K., Ohtsuki, T., Nagano, M., and Okumura, T. (1993). A possible functional necklace formed by placental antigen X-P2-immunoreactive and intensely acetylcholinesterase-reactive (PAX/IAE) glomerular complexes in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 618, 160–166. doi: 10.1016/0006-8993(93)90440-x
- Shinohara, H., Asano, T., and Kato, K. (1992). Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. *J. Neurosci.* 12, 1275–1279. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-04-01.1992
- Storan, M. J., and Key, B. (2006). Septal organ of Grüneberg is part of the olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 494, 834–844. doi: 10.1002/cne.20858
- Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Ferreira, A., Rois, J. L., and Sanchez-Quintero, P. (2021). Neuroanatomical and immunohistological study of the main and accessory olfactory bulbs of the meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals (Basel)* 12:91. doi: 10.3390/ani12010091
- Torres, M. V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P. R., Ferreira, A., Rois, J. L., and Sanchez-Quintero, P. (2022). Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Struct. Funct.* 227, 881–899. doi: 10.1007/s00429-021-02425-2
- Trotter, D., and Døving, K. B. (1998). 'Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals' by ludvig jacobson(1813). *Chem. Senses* 23, 743–754. doi: 10.1093/chemse/23.6.743
- Trut, L., Oskina, I., and Kharlamova, A. (2009). Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *BioEssays* 31, 349–360. doi: 10.1002/bies.200800070
- Vargas-Barroso, V., Peña-Ortega, F., and Larriva-Sahd, J. A. (2017). Olfaction and pheromones: uncanonical sensory influences and bulbar interactions. *Front. Neuroanat.* 11:108. doi: 10.3389/fnana.2017.00108
- Villafranca-Faus, M., Vila-Martín, M. E., Esteve, D., Merino, E., Teruel-Sanchis, A., Cervera-Ferri, A., et al. (2021). Integrating pheromonal and spatial information in the amygdalo-hippocampal network. *Nat. Commun.* 12:5286. doi: 10.1038/s41467-021-25442-5
- Villamayor, P. R., Cifuentes, J. M., Quintela, L., Barcia, R., and Sanchez-Quintero, P. (2020). Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Struct. Funct.* 225, 203–226. doi: 10.1007/s00429-019-01997-4
- Wagner, L., Oliyarnyk, O., Gartner, W., Nowotny, P., Groeger, M., Kaserer, K., et al. (2000). Cloning and expression of secretagogin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of langerhans-specific Ca²⁺-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 24740–24751. doi: 10.1074/jbc.M001974200
- Walz, A., Feinstein, P., Khan, M., and Mombaerts, P. (2007). Axonal wiring of guanylate cyclase-D-expressing olfactory neurons is dependent on neuropilin 2 and semaphorin 3F. *Development* 134, 4063–4072. doi: 10.1242/dev.008722
- Wang, X., Pipes, L., Trut, L. N., Herbeck, Y., Vladimirova, A. V., Gulevich, R. G., et al. (2018). Genomic responses to selection for tame/aggressive behaviors in the silver fox (*Vulpes vulpes*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 10398–10403. doi: 10.1073/pnas.1800889115
- Weruaga, E., Briñón, J. G., Porteros, A., Arévalo, R., Aijón, J., and Alonso, J. R. (2001). A sexually dimorphic group of atypical glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Chem. Senses* 26, 7–15. doi: 10.1093/chemse/26.1.7
- Wouterlood, F. G., and Härtig, W. (1995). Calretinin-immunoreactivity in mitral cells of the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 682, 93–100. doi: 10.1016/0006-8993(95)00326-1
- Zheng, L. M., Ravel, N., and Jourdan, F. (1987). Topography of centrifugal acetylcholinesterase-positive fibres in the olfactory bulb of the rat: evidence for original projections in atypical glomeruli. *Neuroscience* 23, 1083–1093. doi: 10.1016/0306-4522(87)90183-7
- Zimmerman, A. D., and Munger, S. D. (2021). Olfactory subsystems associated with the necklace glomeruli in rodents. *Cell Tissue Res.* 383, 549–557. doi: 10.1007/s00441-020-03388-2

4.5 PUBLICACIÓN NÚMERO 5

Ortiz-Leal I, Torres MV, Barreiro-Vázquez JD, López-Beceiro A, Fidalgo L, Shin T, Sanchez-Quinteiro P. The vomeronasal system of the wolf (*Canis lupus signatus*): The singularities of a wild canid. *Journal of Anatomy* (2024).

doi: 10.1111/joa.14024. Epub ahead of print.

Revista: Journal of Anatomy

Año de publicación: 2024

Editorial: Wiley

ISSN: 0021-8782

Citas en Google Scholar: 0

Índices de calidad de la revista:

Factor de impacto (2022): 2.4

Factor de impacto de 5 años (2022): 2.6

Categoría (2022):

Anatomy & Morphology Q2 (7/20)


Contribución del doctorando: I. O. L. diseñó la investigación, realizó el trabajo, analizó y discutió los resultados y escribió el artículo.

Autorización de la revista/editorial: El artículo tiene una licencia de uso “Creative Commons CC-BY-NC-ND”, lo que indica que se puede utilizar el contenido del artículo sin fines comerciales y sin alterar o modificar el mismo. La revista indica que los autores del artículo tienen el derecho a utilizar la totalidad del mismo en una tesis doctoral.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](#) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Journal of Anatomy* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Anatomical Society.

The vomeronasal system of the wolf (*Canis lupus signatus*): The singularities of a wild canid

Irene Ortiz-Leal¹ | Mateo V. Torres¹ | José-Daniel Barreiro-Vázquez¹ |
Ana López-Beceiro¹ | Luis Fidalgo¹ | Taekyun Shin² | Pablo Sanchez-Quinteiro¹ 

¹Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

²College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju, Republic of Korea

Correspondence

Pablo Sanchez-Quinteiro, Department of Anatomy, Animal Production, and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Av Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain.
Email: pablo.sanchez@usc.es

Funding information

Consello Social from the University of Santiago de Compostela, Grant/Award Number: 2022-PU004

Abstract

Wolves, akin to their fellow canids, extensively employ chemical signals for various aspects of communication, including territory maintenance, reproductive synchronisation and social hierarchy signalling. Pheromone-mediated chemical communication operates unconsciously among individuals, serving as an innate sensory modality that regulates both their physiology and behaviour. Despite its crucial role in the life of the wolf, there is a lacuna in comprehensive research on the neuroanatomical and physiological underpinnings of chemical communication within this species. This study investigates the vomeronasal system (VNS) of the Iberian wolf, simultaneously probing potential alterations brought about by dog domestication. Our findings demonstrate the presence of a fully functional VNS, vital for pheromone-mediated communication, in the Iberian wolf. While macroscopic similarities between the VNS of the wolf and the domestic dog are discernible, notable microscopic differences emerge. These distinctions include the presence of neuronal clusters associated with the sensory epithelium of the vomeronasal organ (VNO) and a heightened degree of differentiation of the accessory olfactory bulb (AOB). Immunohistochemical analyses reveal the expression of the two primary families of vomeronasal receptors (V1R and V2R) within the VNO. However, only the V1R family is expressed in the AOB. These findings not only yield profound insights into the VNS of the wolf but also hint at how domestication might have altered neural configurations that underpin species-specific behaviours. This understanding holds implications for the development of innovative strategies, such as the application of semiochemicals for wolf population management, aligning with contemporary conservation goals.

KEYWORDS

accessory olfactory bulb, chemical communication, immunohistochemistry, lectins, pheromones, vomeronasal organ, vomeronasal system, wolf

Irene Ortiz-Leal and Mateo V. Torres are co-joint first authors.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Journal of Anatomy* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Anatomical Society.

1 | INTRODUCTION

After generations of negative interactions between humans and wolves, which have resulted in the decline of wolf populations across most of Europe, new social attitudes towards wildlife and conservation have emerged, leading to the institutionalisation of wolf protection measures (Stohr & Coimbra, 2013). Nevertheless, wolf population control remains a challenging and contentious endeavour. As wolves expand into agricultural regions, human–wolf conflicts intensify. Owing to the wolf's prolific reproductive capacity and tendency to wander, there are few areas where wolves can be reintroduced without some form of population control (Mech, 1995). While lethal measures have historically been employed to mitigate the harm wolves pose to livestock and pets, such measures are becoming less acceptable. However, until non-lethal alternatives become available, lethal methods remain the most effective means to reduce the damages caused by wolves. (Wielgus & Peebles, 2014).

Aversive conditioning (Gustavson & Nicolaus, 1987) has not proven successful with wild wolves (Fritts et al., 1992). Meanwhile, the use of semiochemicals—either pheromones or kairomones (Fortes-Marco et al., 2015)—as a potential population control method has received limited attention (Petrulis, 2013; Riddell et al., 2021; Van Den Berghe et al., 2019). Chemical signals play a significant role in intraspecific communication, mediating the sexual behaviour of the species and the associated physiological processes involved in reproduction. The wolf utilises scent marks to establish territory (Barja et al., 2004; Peters & Mech, 1975), synchronise reproduction (Rothman & Mech, 1979) and convey social status (Barja et al., 2008). Scent marking is primarily observed in mating males and females within a pack, with subordinates only resorting to it during dominance disputes (Asa et al., 1990). This form of social suppression of reproduction is common among wild canids (Macdonald et al., 2019) and extends to rodents like the naked mole-rat, where it is mediated by semiochemicals sensed via a functional vomeronasal organ (VNO) (Dennis et al., 2020).

Despite being a preeminent symbol among endangered species, wolves are among the most extensively studied wild mammals. However, beyond territory-related pheromones in urine and faecal marks (Barja et al., 2004, 2008; Raymer et al., 1985, 1986; Wirobski et al., 2021), there is a surprising lack of research on the neuroanatomical and physiological bases of their chemical communication systems—both the olfactory and vomeronasal systems responsible for processing semiochemicals. To the best of our knowledge, there exists no description of the vomeronasal system (VNS) in the wolf, and information regarding the main olfactory system (MOS) is confined to comparative morphological and neurochemical investigations of the main olfactory bulb (MOB) in domestic and wild canids (Ortiz-Leal, Torres, López-Callejo, et al., 2022).

The MOS comprises millions of neuroreceptor cells situated in the olfactory epithelium covering the olfactory turbinates (Barrios, Sanchez Quinteiro, & Salazar, 2014; Bressel et al., 2016). These cells are responsible for transmitting olfactory information to the MOB

(Doucette et al., 1983; Su et al., 2009). Given its close connection with the limbic system, the MOS has been linked to memory and conscious sensory perception (Slotnick, 2001; Ubeda-Bañon et al., 2011). In contrast, the VNO, a sensorial component of the VNS (Kratzing, 1971; Tomiyasu et al., 2022), contains neuroreceptor cells that transmit signals via the vomeronasal nerves (NVN) (McCotter, 1912; Smith et al., 2015) to the accessory olfactory bulb (AOB) (Frahm & Bhatnagar, 1980; Mohrhardt et al., 2018). The VNS specialises in detecting pheromones (Kunkhyen et al., 2017; Powers & Winans, 1975), kairomones (Fortes-Marco et al., 2013; Isogai et al., 2011) and molecules of the major histocompatibility complex (Leinders-Zufall et al., 2000, 2014). Its functions encompass non-conscious roles in socio-sexual behaviours (Abellán-Álvaro et al., 2022; Baum & Cherry, 2015), maternal recognition (Kohl et al., 2017; Navarro-Moreno et al., 2020), sickness avoidance behaviour (Boillat et al., 2015; Bufe et al., 2019) and predator detection (Tsunoda et al., 2018).

While extrapolations from other species can be problematic when studying the neuroanatomy of the VNS (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2009), the Rodentia Order has served as a major referent for VNO research on mammalian species (Salazar et al., 2013). Consequently, available neuroanatomical data on the VNS of canids is predominantly focused on the domestic dog's VNO (Dennis et al., 2003; Mahdy et al., 2019; Salazar et al., 2013) and AOB (Jawlowski, 1956; Miodonski, 1968; Nakajima et al., 1998; Salazar, Cifuentes, Sánchez Quinteiro, & García Caballero, 1994), along with their secondary projections to the vomeronasal amygdala. Concerning wild canids, until recently, the primary body of research was limited to the study of the rhinencephalon in the African wild dog *Lycaon pictus* brain by Chengetanai et al. (2020) and research on the vomeronasal amygdala in the fox (Równiak et al., 2022; Równiak & Bogus-Nowakowska, 2020). However, a recent comprehensive investigation of the VNO, MOB, AOB and olfactory limb in the red fox (Ortiz-Leal et al., 2020; Ortiz-Leal, Torres, López-Callejo, et al., 2022; Ortiz-Leal, Torres, Villamayor, et al., 2022) has revealed significant deviations in neuroanatomical structure compared to that observed in the canine VNS. Dogs exhibit noteworthy limitations in the development of the VNO epithelium, inadequate differentiation of the glomerular and nerve layers of the AOB, the smaller size of the VNO and the absence of the characteristic cytoarchitecture found in other mammalian species (Meisami & Bhatnagar, 1998). In contrast, fox studies report a highly differentiated VNS with unique features not documented in the dog, particularly at the VNS level. Likewise, in the case of the African wild dog, the level of development observed in the AOB suggests heightened sensitivity compared to domestic dogs (Chengetanai et al., 2020). All these anatomical differences lend support to the current hypothesis that the domestication of the dog has led to a regression in the detection of pheromones and other semiochemicals, mediated by the VNS.

However, it remains an ongoing question whether, over approximately 10,000 years that separate the wolf and the dog phylogenetically (Bergström et al., 2022; Graphodatsky et al., 2008), the intense selection pressure associated with domestication may have brought

about alterations to the configuration of neural structures that support species-specific behaviours, as is the case with the VNS. As such, this study aims to not only address the significant gap in our morphological and immunohistochemical understanding of the vomeronasal system of the wolf but also shed light on how the domestication process may have impacted the organisation of the central nervous system. We employed various tissue dissection and microdissection techniques and computed tomography imaging, followed by general and specific histological staining methods, including immunohistochemical and lectin histochemical labelling techniques.

Among the array of antibodies used for the immunohistochemical analysis of the wolf's VNS, particular attention should be paid to the study of the G protein expression pattern in the sensory epithelium of the VNO, the vomeronasal nerves and the AOB. The immunohistochemical characterisation of both $G\alpha 2$ and $G\alpha o$ G proteins is widely regarded as an excellent phenotypic indicator of the expression of the two main families of vomeronasal receptors, V1R and V2R, respectively, within the VNS. The concurrent expression of both G proteins is a feature observed in Rodentia, including mice, rats, octodons (Suárez & Mpodozis, 2009), guinea pigs (Takigami, 2004) and capybaras (Suárez, Santibáñez, et al., 2011; Torres et al., 2020); Lagomorpha, such as rabbits (Villamayor et al., 2020); Marsupialia, including opossums (Halpern et al., 1995) and wallabies (Torres et al., 2022); and Tenrecidae (Suárez et al., 2009). However, in other mammals, such as the dog, cat, sheep and goat, the differential expression of G proteins and vomeronasal receptors has not been observed, as these species exclusively express the V1R receptor family (Salazar et al., 2007, 2013; Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2011; Takigami, 2004). The absence of V2R receptors has been theorised to result from the domestication process, during which artificial selection may have led to an involution of the VNS in canids (Barrios, Sanchez-Quinteiro, & Salazar, 2014; Jezierski et al., 2016). Therefore, investigating the expression patterns of these receptors and the overall anatomy of the VNS in a wild canid with close phylogenetic proximity to the dog, such as the wolf, could provide deeper insights into this theory.

2 | METHODS

In this study, we utilised a sample of five adult male wolves. These wolves originated from wildlife recovery centres in the provinces of Galicia and were unfortunately involved in fatal traumatic accidents. Only those that had died recently and displayed no external or internal head injuries were included in our research. All samples were used with the compulsory permissions by the Galician Environment, Territory and Tenement Council (CMATV approval numbers EB-009/2020 and EB-007/2021).

All the heads were dissected as soon as they arrived at the Faculty of Veterinary, unless one head that was frozen and transverse-sectioned, to compose a macroscopic photographic series. The rest of the heads were dissected extracting the whole brains after opening dorsally the cranium and removing the lateral walls of both the cranial cavity and the ethmoidal fossa with the help of an electric

plaster cutter and a gouge clamp. The VNOs were identified after removing the nasal bones and the lateral walls of the nasal cavity. The bone tissue surrounding the VNO ventrally and medially was dissected from all samples, unless one sample which was decalcified for 2 weeks to microscopically study the topographic relationship of the VNO with the incisive duct. The decalcifying agent used was Shandon TBD-1 Decalcifier (Thermo), and it was applied while stirring continuously at room temperature.

All the samples were fixed in Bouin's fluid (BF) for 24 h, then transferred to 70% ethanol, embedded in paraffin and cut by a microtome. The olfactory bulbs were cut transversely and sagittally by a microtome with a thickness of 8 μm , whereas the VNO samples were sectioned with a thickness of 6–7 μm . The VNO was serially transverse-sectioned along its entire length, from caudal to rostral. The slides were stained using haematoxylin–eosin, Alcian Blue (AB) and Gallego's Trichome stains (Ortiz-Hidalgo, 2011). The staining protocols are explained in detail in Salazar et al. (2003) and Torres, Ortiz-Leal, Ferreiro, et al. (2023).

2.1 | Computed tomography scans

Computed tomography of the head was performed in a 16-slice helical multidetector scanner (Hitachi Eclis 16), obtaining both bone and soft tissue algorithm series in sternal recumbency. For the bone series, a 1.25-mm slice thickness every 0.625 mm, while for the soft tissue series, a 2.5-mm slice thickness every 1.25 mm was applied. Exposure factors were 120 kVp and 200 mA, with 1 s per rotation and a pitch of 0.5.

2.2 | Lectin histochemistry protocol

Lycopersicon esculentum agglutinin (LEA) and the B4 subunit from *Bandeiraea simplicifolia* lectin (BSI-B₄) were employed as biotinylated conjugates. Deparaffinised and rehydrated slides were incubated in a solution of 3% hydrogen peroxide to quench endogenous peroxidase activity. Following this, the sections were incubated in a 2% solution of bovine serum albumin (BSA) in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.2 for 30 min. Overnight incubation was performed with LEA and BSI-B₄ lectins, separately, in a 0.5% BSA mixture. After two brief washes in PB, the slides were incubated in avidin–biotin–peroxidase (ABC) complex (Vector Laboratories) at room temperature for 90 min. A 0.003% hydrogen peroxide and 0.05% 3,3-diaminobenzidine (DAB) solution in a 0.2 M Tris–HCl buffer were used to visualise the ensuing reaction, which resulted in a brown-coloured deposit.

For *Ulex europaeus* lectin (UEA), the initial two steps mirrored those used for LEA and BSI-B₄. Slides were subsequently incubated for 60 min in a 0.5% BSA–UEA mixture. Then, anti-UEA peroxidase-conjugated antibody was added, and overnight incubation ensued. The reaction was revealed through the application of a DAB solution, as described for the LEA and BSI-B₄ procedure.

As controls, tests without lectin addition and also pre-absorbed lectins with excessive corresponding sugars, were performed.

2.3 | Immunohistochemistry methodology

The first step involved treating all samples with a 3% hydrogen peroxide solution to inhibit endogenous peroxidase. Subsequently, samples were immersed in either a 2.5% horse serum solution, compatible with the ImmPRESS Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG reagent kit (Vector Laboratories), or 2% BSA for half an hour to preclude non-specific binding. Samples were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (Table 1). The next day, depending on the blocking agent used, samples were incubated for 30min with either the ImmPRESS VR Polymer HRP Anti-Rabbit IgG or Anti-mouse IgG reagents, with the exception of samples treated with anti-OMP antibodies derived from goats, which were first incubated in a biotinylated anti-goat IgG and afterwards incubated in ABC reagent for 1.5h under humid conditions. Three sequential 5-min PB washes were carried out between steps. Prior to the visualisation stage, all samples were rinsed for 10min in 0.2M Tris-HCl buffer at pH 7.61. DAB chromogen was used for visualising, following the same protocol used for lectin histochemical labelling. Negative controls omitted the primary antibodies.

2.4 | Double immunohistochemical protocol for paraffin-embedded tissue

For double immunostaining, a sequential twice-repeated enzyme-labelled method was employed (Hasui et al., 2003; Villamayor et al., 2020). Between both immunolabelling, the sections were subjected to treatment with 0.1M glycine solution (pH 2.2) for 5min. To select the most suitable dye to visualise the immunoreaction, both DAB and Vector VIP Peroxidase Substrate Kit (SK-4600, Vector Laboratories) were combined exchanging their order.

2.5 | Image capture

Images were digitally captured using a Karl Zeiss Axiocam MRc5 camera coupled with a Zeiss Axiophot microscope. Adobe Photoshop CS4 was employed for brightness, contrast and balance adjustment; however, no enhancements, additions or relocations of the image features were made. Additionally, an image-stitching software (PTGuiPro) was used for low magnification images composed of several photographs.

3 | RESULTS

The VNS was studied at both the macroscopic and microscopic levels. For each of these levels, detailed descriptions of the vomeronasal organ, vomeronasal nerves and AOB are provided.

3.1 | Macroscopic study of the VNS

3.1.1 | Vomeronasal organ (Figures 1–5)

As a preliminary step towards dissecting the vomeronasal organ, a cross sectional macroscopic anatomical study of the nasal cavity was performed on a single specimen (Figure 1a–e). Eight sections were selected, spanning from the nasal vestibule to the ethmoid turbinates (Figure 1c), with the section corresponding to level 6 encompassing the central part of the VNO (Figure 1b,d). At higher magnification, the VNO corresponds to two tubular structures located in the ventral region of the nasal septum, laterally to the vomer bone and ventrally to the cartilage of the nasal septum (Figure 1b). Enveloping the VNO is a cartilaginous capsule (indicated by arrowheads), which fully surrounds the parenchyma of the organ, except for its dorsal region. In its central part, the vomeronasal ducts are clearly visible (Figure 1d).

The study of the topographic relationships of the vomeronasal organ was expanded to computed tomography scans, which provided clear images of the head cavities including the nasal turbinates, nasal meatuses, teeth, vomer bone and nasal septum. Special attention was given to the bony configuration of the vomer bone and palatine fissure (Figure 2a), as previous anatomical studies of the nasal cavity have shown that the VNO is located on the lateral surface of the vomer. The results of the study are presented in three computed tomography sections: horizontal (Figure 2b), sagittal (Figure 2c) and transverse (Figure 2d). In all three planes, levels, including the VNO, have been chosen. The vomeronasal organ is situated bilaterally on each side of the vomer bone, positioned at the most rostral and ventral regions of the nasal cavity. It occupies a narrow compartment located dorsomedially to the palatine fissure, extending to the level of the root of the upper canine tooth.

To access the VNO, it was necessary to expose the nasal septum. First, the lateral wall of the cavity formed by the maxillary bone was removed. Then, the large ventral nasal turbinate was extracted (Figure 3). In the basal region of the septum, the VNO lies, covered by the respiratory mucosa layer. The caudal nasal myelinated nerve, which enters the VNO at its most caudal extremity (Figure 3a), serves as a reliable indicator of the VNO's location. On the mucosal surface of the nasal septum, amyelinic fibres of the vomeronasal nerve can be seen running in a caudodorsal direction towards the lamina cribrosa of the ethmoid. In their most rostral segment, the NVN are in direct contact with the respiratory mucosa, and more caudally, they extend into the olfactory mucosa, which is easily distinguished by its yellowish colour (Figure 3b). By removing the lateral wall of the cranial cavity, the size of the telencephalon and the location of the olfactory bulb can be determined (Figure 3c).

Before the removal of the VNO, the nasal cavity was reduced to small blocks, which contain the ventral part of the nasal septum and the bony floor of the palate. This allowed for a clearer verification of the relationship between the VNO and the nasal

TABLE 1 Specifications for each antibody used in this study, encompassing supplier information, dilution ratios, target immunogens and Research Resource Identifiers (RRID).

Antibody	First Ab species/ dilution	First Ab catalogue number/Manufacturer	Immunogen	Reference	RRID	Second Ab species/dilution, catalogue number
Anti-G α	Rabbit 1:200	MBL-551	Bovine GTP binding protein G α subunit	Prince et al. (2009)	AB_591430	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-G α 2	Rabbit 1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-7276	Peptide mapping within a highly divergent domain of G α 2 of rat origin	de la Rosa-Prieto et al. (2010)	AB_2111472	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CB	Rabbit 1:6000	Swant CB38	Rat recombinant calbindin D-28k	Alonso et al. (2001)	AB_10000340	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-CR	Rabbit 1:6000	Swant 7697	Recombinant human calretinin containing a 6-his tag at the N-terminus	Crespo et al. (1997)	AB_2619710	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15
Anti-OMP	Goat 1:400	Wako 544-10001	Rodent olfactory marker protein	Verhaagen et al. (1990)	AB_839504	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GAP43	Mouse 1:400-1:4000	Sigma G9264	HPLC-purified GAP43 from neonatal rat forebrain	Villamayor et al. (2021)	AB_477034	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-MAP2	Mouse 1:200	Sigma M4403	Rat brain microtubule-associated proteins	Tran et al. (2008)	AB_477193	ImmPRESS VR HRP Anti-mouse IgG Reagent MP-6402-15
Anti-GFAP	Rabbit 1:200	DAKO Z0334	GFAP isolated from cow spinal cord	Bignami et al. (1972)	AB_10013382	ImmPRESS VR HRP Anti-rabbit IgG Reagent MP-6401-15

Note: In all cases, the immunoreactivity patterns observed in wolf samples were consistent with those previously documented across various mammalian species. Relevant references for each antibody are included.

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-complex; CB, calbindin; CR, calretinin; GAP-43, growth-associated protein 43; GFAP, glial fibrillary protein; G α 2, Subunit α 2 of G protein; G α , Subunit α of G protein; HRP, horseradish peroxidase; IgG, immunoglobulin G; MAP-2, microtubule associated protein; OMP, olfactory marker protein.

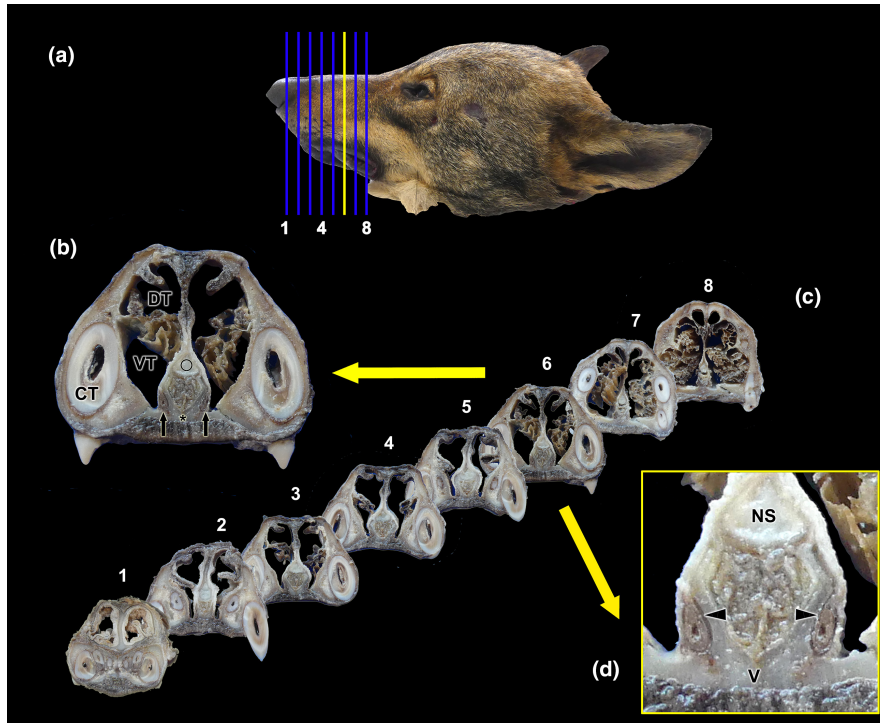


FIGURE 1 Macroscopic cross sectional study of the nasal cavity of the wolf. (a) Lateral view of the head of the wolf showing the eight consecutive levels chosen for the macroscopic sectional study. (b) The central part of the vomeronasal organ (VNO) is located at level 6 (yellow line in “a”, enlarged section in “b and d”). The VNO corresponds to two tubular structures located in the ventral part of the nasal septum (black arrows), lateral to the vomer bone (asterisk) and ventral to the cartilage of the nasal septum (circle). (c) Transverse sections of the nasal cavity ordered from rostral (1) to caudal (8), corresponding to the levels represented in (a). (d) At higher magnification, it can be seen how the VNO is enveloped by a cartilaginous capsule (arrowheads). In the central part of the VNO, the vomeronasal ducts can be observed. CT, canine tooth; DT, dorsal turbinate; NS, nasal septum; VT, ventral turbinate.

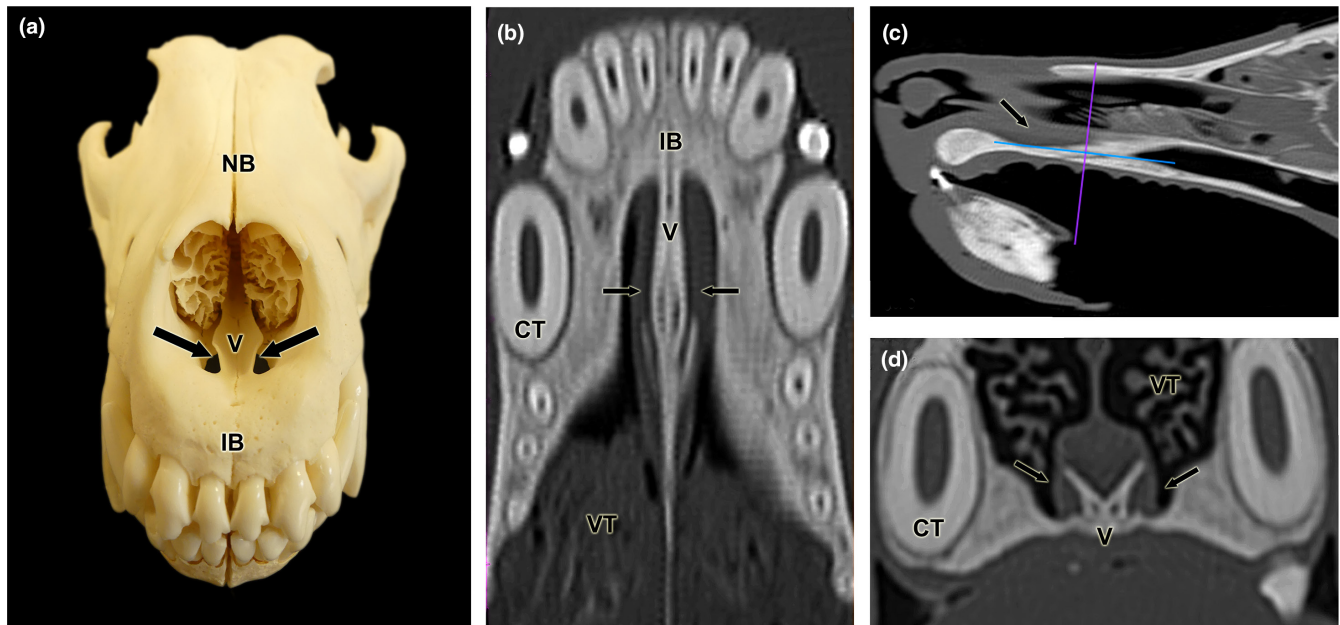


FIGURE 2 Topographical relationship of the wolf VNO. (a) Fronto-dorsal view of the skull skeleton showing the relationship of the lateral part of the vomer bone (V) to the palatine fissure. (b–d) Computerised tomography images of the head in the horizontal (b), parasagittal (c) and transverse (d) planes. Arrows indicate the location of the VNO. CT, canine tooth; IB, incisive bone; NB, nasal bone; VC, vomeronasal cartilage; VT, ventral turbinate.

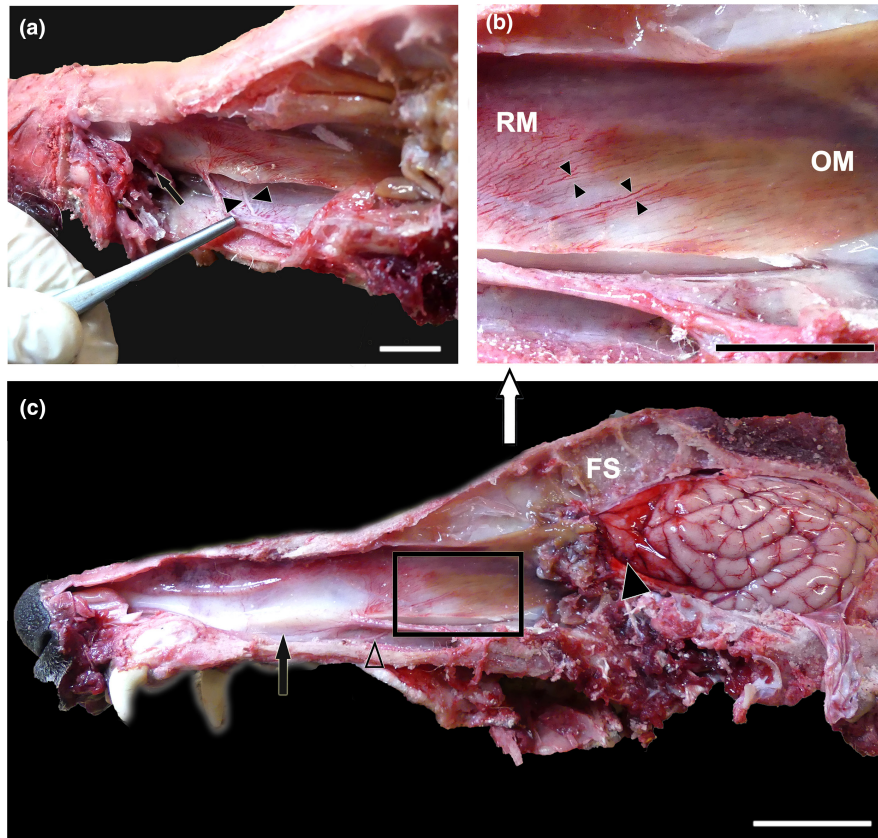


FIGURE 3 Dissection of the nasal and cranial cavities of the wolf. (a) Dorsolateral view of the nasal cavity, showing the projection zone of the VNO (arrow) and the myelinated branches forming the caudal nasal nerve (arrowheads) entering the VNO. (b) Enlargement of the inset shown in (c) displaying the vomeronasal nerves leaving the VNO (arrowheads) in a caudodorsal direction towards the medial portion of the cribriform plate of the ethmoid. RM: Respiratory mucosa. OM: Olfactory mucosa. (c) Lateral view of the nasal and cranial cavities, showing in the latter the left-brain hemisphere. The projection area of the VNO (arrow), the vomeronasal nerves in a caudodorsal direction (inset), the caudal nasal nerve (open arrowhead) and the olfactory bulb (arrowhead) are also indicated. FS, Frontal sinus. Scale bar=1.5 cm.

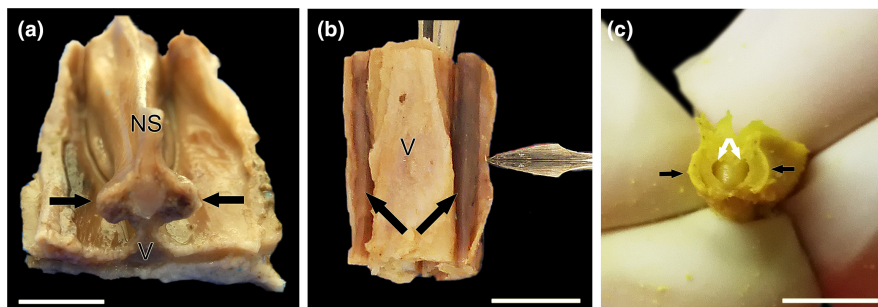


FIGURE 4 Wolf VNO after its full extraction in association to the vomer bone. (a) Transverse cross section of the nasal septum corresponding to the level 9 shown in Figure 1. From a caudodorsal viewpoint, the VNOs (arrows) are visualised on both sides of the base of the nasal septum (NS) over the thin vertical projection of the vomer bone (V). (b) On a more rostral level, corresponding to level 3 of Figure 1, a ventral view of the vomer bone shows both VNOs with its distinctive rounded and elongated shape (arrows). The lancet points to the lifted respiratory mucosa of the nasal cavity that covers the VNO. (c) Dissected out and partially transversely sectioned VNO (black arrows) showing the crescent shape vomeronasal duct (white arrows). a and b, fresh samples; (c), BF-fixed sample. Scale bars: (a–b)=0.5 cm, (c)=0.2 cm.

septum. At a caudal level, the VNO is located on both sides of the base of the nasal septum. It is positioned relatively high, given the vomer bone's vertical projection (Figure 4a). At more rostral levels, the VNO is perfectly adapted to the lateral curvature of the vomer bone, allowing for easy access from a ventral direction. By excising the respiratory mucosa laterally overlying the VNO

within the nasal cavity, its shape and development can be visualised (Figure 4b). Finally, the VNO was dissected from the surrounding bone tissue, where it is held by dense connective tissue. To confirm the VNO's identity, a transverse cut was made in the sample, revealing the vomeronasal duct and the organ's parenchyma (Figure 4c).

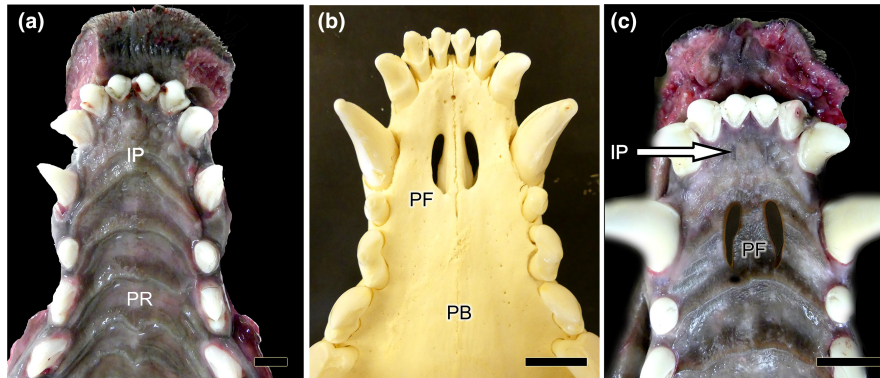


FIGURE 5 Ventral view of the palate of the wolf after removal of the mandible. (a) The mucosa of the roof of the oral cavity is observed, and in its most anterior part, the location of the incisive papilla (IP) and palatine rugae (PR) are indicated. (b) Skeleton of the corresponding area where the palatine fissures (PF) are observed on both sides of the midline. PB: Palatine bone. (c) Superposition of images analogous to “a and b” to show the exact location of the PF on the mucosa of the palate. The IP is also shown (arrow). Scale bar: (a) 1 cm, (b–c) 1.5 cm.

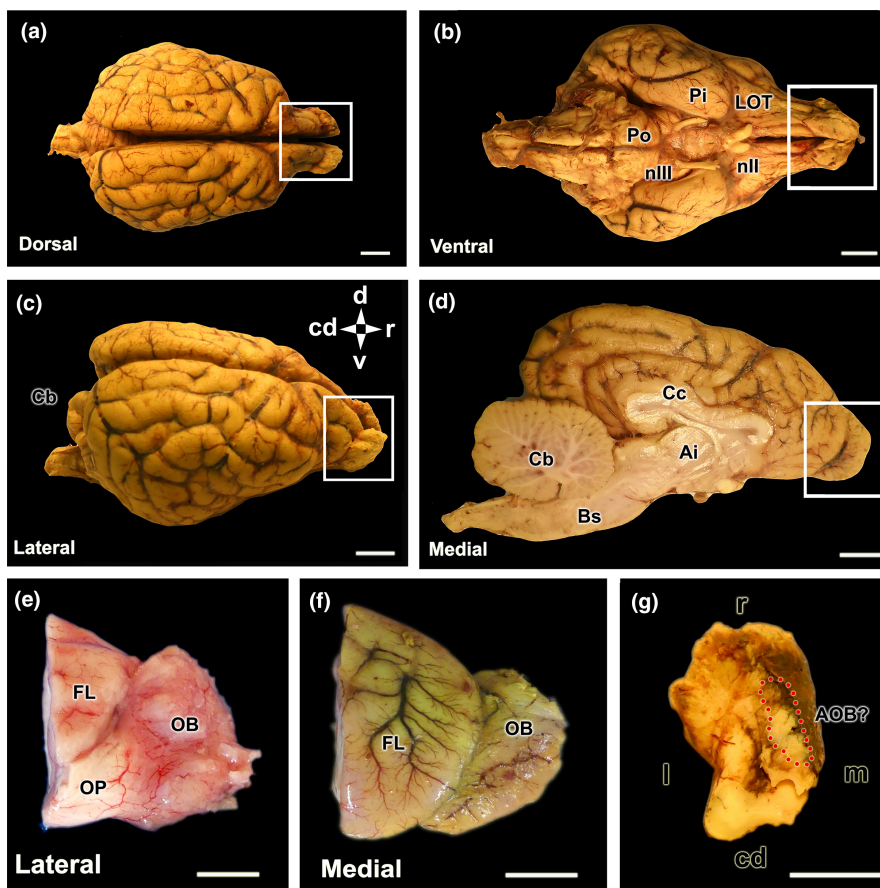


FIGURE 6 Encephalon and olfactory bulb of the wolf. (a–d) Dorsal, ventral, lateral and medial views of BF-fixed encephalon. The white box highlights the dorsal, ventral, lateral and medial views of the olfactory bulb (OB) respectively. (e) Lateral view of the right olfactory bulb, separated from a formalin-fixed brain. (f) Medial view of the left MOB separated from the BF-fixed brain. (g) Dorsocaudal view of the left OB, BF fixed. The area where the accessory olfactory bulb is presumably located is indicated by the broken red circle. Bs, brain stem; Cb, cerebellum; Cc, corpus callosum; Cd, caudal; d, dorsal; FL, frontal lobe; la, interthalamic adhesion; l, lateral; LOT, lateral olfactory tract; m, medial; nll, optical nerve; nlll, oculomotor nerve; OP, olfactory peduncle; Pi, piriform lobe; Po, Pons; R, rostral. Scale bar = 1 cm.

To complete the anatomical study of the VNO, we examined its means of communication with the external environment. This communication is essential for the chemical messenger molecules to reach the neurosensory epithelium (Figure 5). The wolf establishes this link indirectly via the incisive duct (ID), which acts as a conduit

linking the nasal and oral cavities (Figure 5b). The vomeronasal duct is situated between the two. The incisive papilla connects the ID to the oral cavity (Figure 5c). Microscopic evaluation will be performed to ascertain whether the vomeronasal duct enters the ID, as this cannot be observed macroscopically.

3.1.2 | AOB (Figure 6)

The macroscopic investigation of the wolf's brain reveals well-developed olfactory bulbs that are conspicuous from both the lateral and medial views of the hemiencephalon (Figure 6a–d). Particularly remarkable is the well-developed rhinencephalon, characterised by large olfactory pedunculi (Figure 6e) and broad, convex piriform lobes (Figure 6b).

The main objective of the macroscopic study was to identify the AOB in situ. However, in none of the studied specimens were we able to achieve this identification owing to its reduced dimension and the usual presence of blood clots in the ethmoid fossa. The anatomical tracing of the vomeronasal nerves consistently pointed to an area located in the caudomedial part of the MOB, which was the focus of special attention in the sagittal histologic series of the bulb (Figure 6g).

3.2 | Microscopic study of the VNO (Figures 7–14)

As a preliminary microscopic approximation, the VNO comprises a vomeronasal capsule and a vomeronasal duct, surrounded by parenchyma that contains blood vessels, nerves and vomeronasal

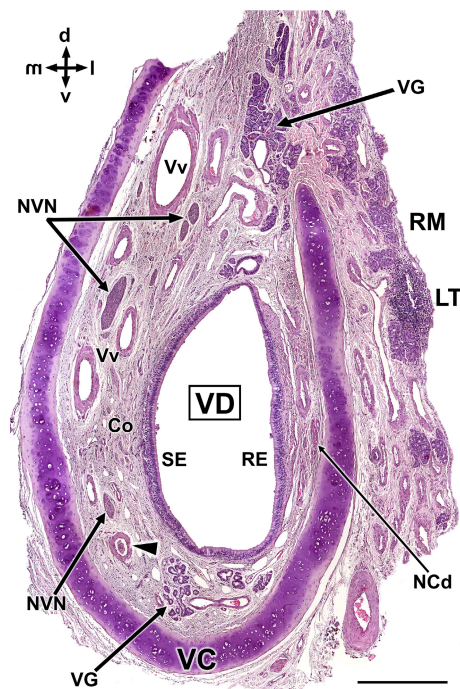


FIGURE 7 Histological transverse section of the wolf vomeronasal organ in its central portion, stained with haematoxylin-eosin. This central level exemplifies the major histological features of the VNO. VC, vomeronasal cartilage. In its central portion, it forms an incomplete ring which opens dorsally. Arrowhead, artery; Co, connective tissue; D, dorsal; l, lateral; LT, Lymphoid tissue; m, medial; NCd, caudal nasal nerve; NVN, vomeronasal nerves; RE, respiratory epithelium; RM, respiratory mucosa; SE, neurosensory epithelium; v, ventral; VD, vomeronasal duct; VG, vomeronasal glands; Vv, vomeronasal veins. Scale bar = 500 μ m.

glands (Figure 7). The capsule, comprising hyaline cartilage and adopting a 'U' shape, encases the parenchyma and prevents the lumen from collapsing. The lumen is typically elliptical and lined by pseudostratified epithelium. The epithelium's lateral portion exhibits a respiratory nature, while the medial portion is neurosensory in type, with both portions appearing to be of comparable size and development.

The parenchyma of the organ primarily comprises blood vessels, which are evenly distributed around its circumference. However, they are particularly prominent in the dorsal and lateral regions, where numerous large and muscular veins are present. Arteries, meanwhile, are scarce and relatively small. The medial veins are interspersed with numerous branches of the vomeronasal nerves. In the lateral parenchyma, the nerves are of smaller calibre and correspond to branches of the caudal nasal nerve. The glandular component is not very abundant, with the glands concentrated near the ventral and especially dorsal commissures. The dorsal glands extend into the parenchyma of the respiratory mucosa, which itself features profuse irrigation, abundant glandular tissue and diffuse lymphoid tissue. The parenchyma of the VNO is rich in connective tissue.

The histological study encompassed sections from both the rostral and caudal thirds of the VNO (Figure 8). In both segments, the overall organisational pattern of the organ remains consistent. Within the anterior third (Figure 8a), the cartilage is more open dorsally, the venous vessels possess larger calibres but thinner walls, and the nerve branches are less abundant. The distinction between the two epithelia becomes evident. Gallego's trichrome staining reveals the remarkable development of connective tissue. In a more

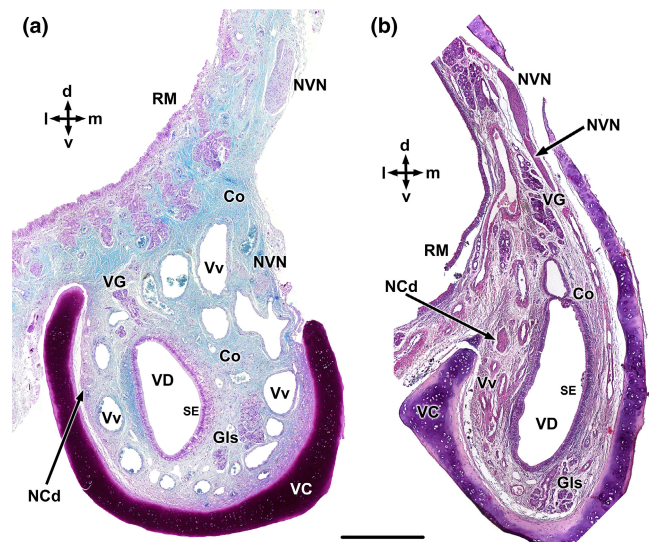


FIGURE 8 Transverse sections of the wolf VNO at two selected levels. (a) Rostral level. (b) Caudal level. Co, connective tissue; Gls, vomeronasal glands; NCd, caudal nasal nerve; NVN, vomeronasal nerve; RM, respiratory mucosa; SE, Sensory epithelium; VG, vomeronasal glands; VC, vomeronasal cartilage; VD, vomeronasal duct; and Vv, vomeronasal veins. Staining: Gallego's trichrome (a) and haematoxylin-eosin (b). d, dorsal; l, lateral; m, medial; and v, ventral. Scale bar = 500 μ m.

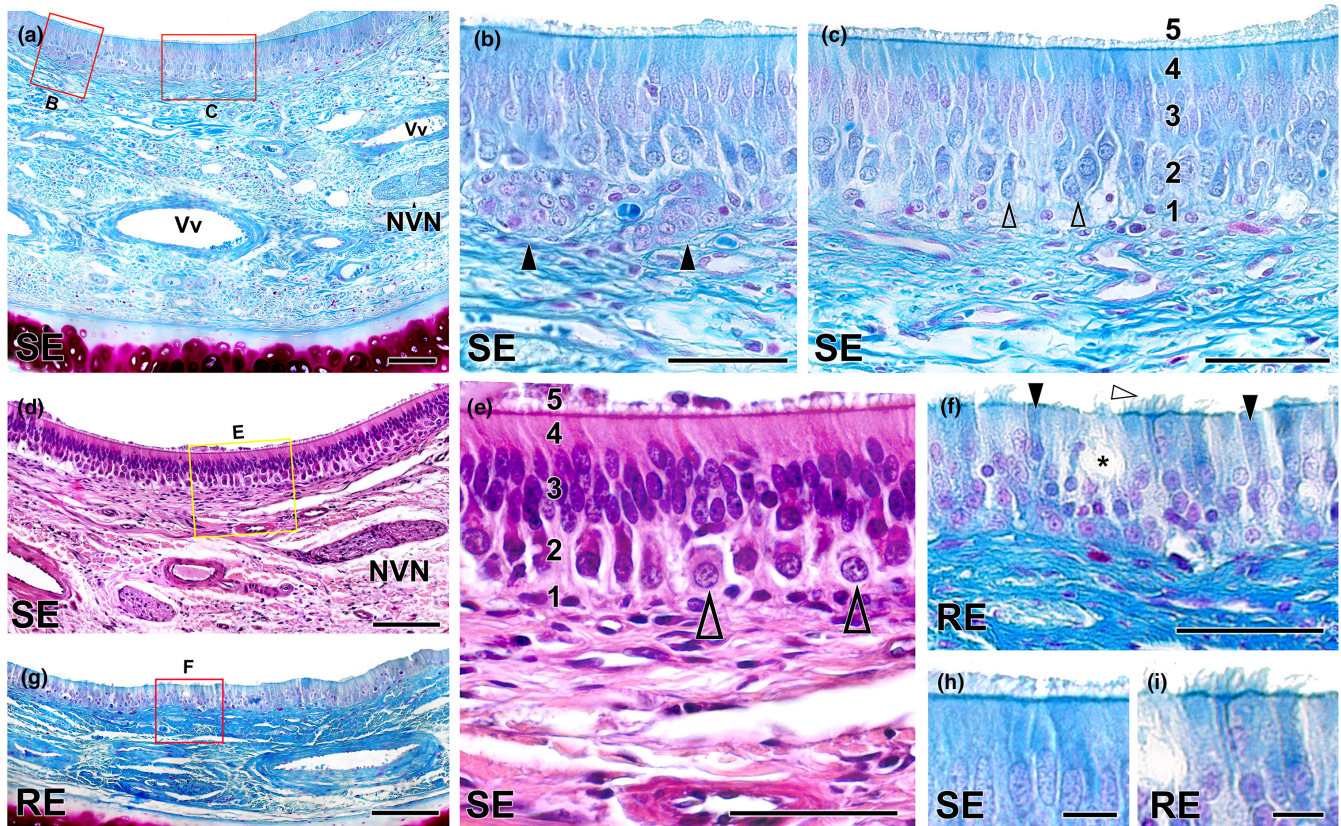


FIGURE 9 Histological study of the epithelia of the wolf vomeronasal duct. (a) Medial parenchyma of the organ stained with Gallego's trichrome. The overlying sensory neuroepithelium (SE), enlarged in (b, c), shows a large lamina propria with veins (Vv), vomeronasal nerves (NVN) and connective tissue. (b) Two large clusters of cells similar in appearance to neuroreceptor cells (arrowheads) are observed in the lamina propria. (c) Cellular components of the neuroepithelium: 1, basal cells; 2, neuroreceptor cells (open arrowheads); 3, sustentacular cells; 4, cell processes layer; and 5, mucomicrovillar complex. (d) Neurosensory epithelium and lamina propria, stained with haematoxylin-eosin. (e) Enlargement of the area is shown in "d" showing the five components of the sensory neuroepithelium. Open arrowheads: neurosensory cells. (f) Enlargement of the area of respiratory epithelium (RE) is shown in (g), stained with Gallego's trichrome. Note the presence of cilia (white arrowhead), chemosensory cells (black arrowheads) and goblet cells (*). (g) Respiratory epithelium stained with Gallego's trichrome. (h) Enlargement of the Figure "c", displaying the luminal surface of the SE, covered by the microvillar complex. (i) Enlargement of the luminal surface of the RE, showing the ciliated covering. Scale bars: (a, d, g) = 100 μ m; (b, c, e, f) = 50 μ m; (h, i) = 10 μ m.

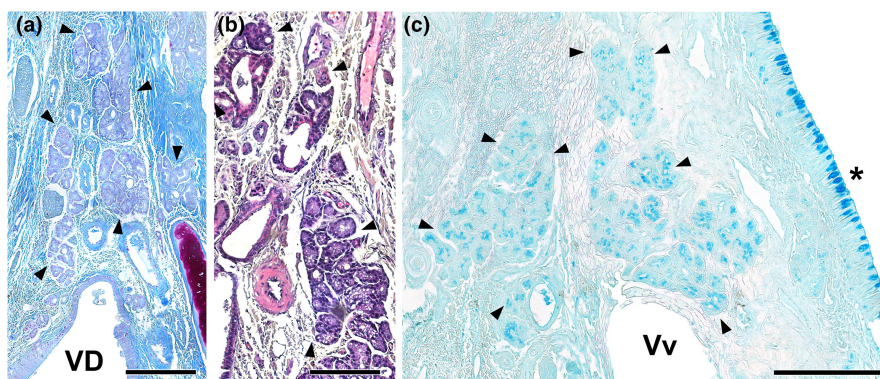


FIGURE 10 Vomeronasal glands of the wolf. The VNO parenchyma presents an abundant number of glands, which are more developed in its dorsal area. (a, b) The arrowheads delimit the glandular areas of interest. Both Gallego's trichrome (a) and haematoxylin-eosin (b) stainings show the serous tubuloalveolar nature of the wolf vomeronasal glands. (c) Alcian blue staining shows the positivity of these acini to this stain. VD, vomeronasal duct; Vv, vomeronasal veins; (*) Respiratory mucosa. Scale bar = 250 μ m.

caudal section (Figure 8b), the medial branch of the cartilage shows increased development, assuming a 'J' shape. At this level, the vomeronasal nerves exit the parenchyma from their dorsal extremity, forming large nerve trunks.

The histological examination of the two epithelia lining the vomeronasal duct (Figure 9) was performed using Gallego's trichrome (Figure 9a-c,f-l) and haematoxylin-eosin stains (Figure 9d,e). The broad lamina propria associated with the neuroreceptor

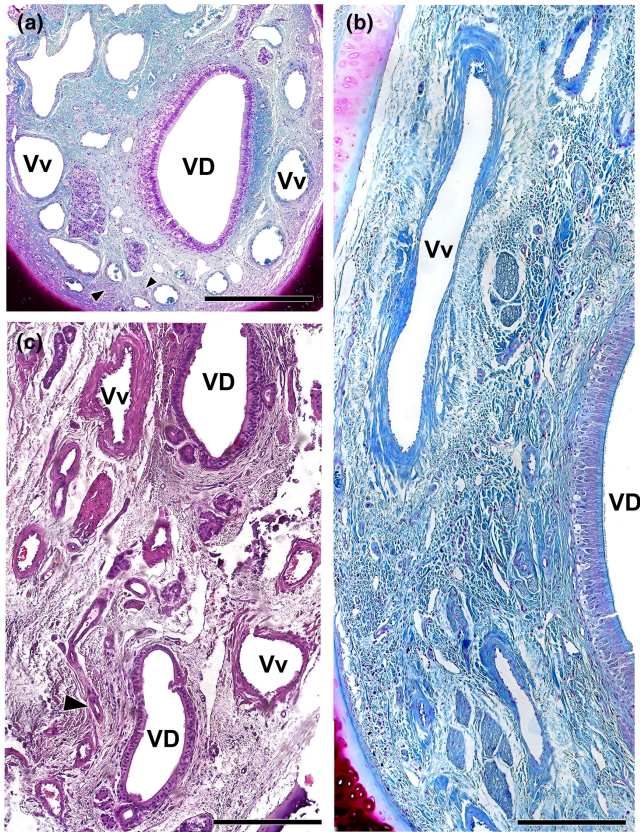


FIGURE 11 Vasculature of the wolf VNO. (a) Image of the anterior portion of the VNO is shown in [Figure 8a](#) exemplifies the presence of a profuse venous ring (Vv) surrounding the vomeronasal duct (VD). The arteries (arrowheads) are small and sparse. (b) Arteries indicated in A showed at higher magnification. (c) Caudal section of the VNO showing the glove-fingered termination of the vomeronasal duct (VD). Numerous veins (Vv) and small arterial trunks (arrowhead) predominate at this level. (d) In a central section of the VNO, large venous sinuses (Vv) run along the lateral portion of the parenchyma. NCd, caudal nasal nerve. Staining: (a, b, d) Gallego's trichrome; (c) haematoxylin-eosin. Scale bars: (a, d) = 250 µm; (c) = 100 µm; (b) = 50 µm.

epithelium contains abundant connective tissue, with blood vessels and branches of the vomeronasal nerves interwoven within its fibres ([Figure 9a](#)). The most striking feature is the presence—in a subepithelial position within the lamina propria—of conspicuous clusters of densely packed cells that traverse the basal cell layer, maintaining a direct relationship with the neuroreceptor cells ([Figure 9b](#)). While these cluster-forming cells lack visible processes, their nuclei resemble in shape, content and staining to those of the neuroreceptor cells. To the best of our knowledge, this species stands as the sole example presenting such cellular organisation in the vomeronasal epithelium. Positioned more superficially are the cellular components of the vomeronasal neuroepithelium ([Figure 9c,h](#)).

They are organised in a columnar, pseudostratified and non-ciliated epithelium. From basal to luminal, its components are basal cells, neuroreceptor cells, sustentacular cells, the cell processes layer and the superficial mucomicrovillar complex. The neuroreceptor

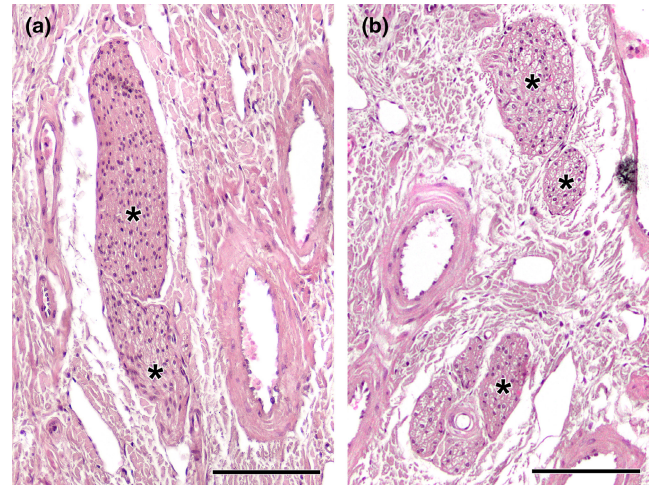


FIGURE 12 Histological study of the wolf vomeronasal organ innervation. (a) Unmyelinated branches of the vomeronasal nerves (*). They are characterised by their homogeneous appearance, with densely packed nerve bundles. (b) The lateral part of the parenchyma contains myelinated nerve branches originating from the caudal nasal nerve (*). Their structure is looser and the void spaces corresponding to the myelin sheaths are visible. Staining: Haematoxylin-eosin. Scale bar = 100 µm.

cells are ellipsoidal and not densely packed, allowing for the visualisation of their fine axonal and dendritic processes. Their nuclei are rounded and contain visible nucleoli. The sustentacular cells have densely packed nuclei in the apical position and are elongated. Haematoxylin-eosin staining confirmed these observations ([Figure 9d,e](#)). The respiratory epithelium ([Figure 9f,g,i](#)) is a pseudostratified columnar epithelium that presents cilia on its surface. It consists of sustentacular, chemosensory and goblet cells ([Figure 9f](#)).

The VNO parenchyma of the wolf contains numerous glands, with more pronounced development in its dorsal region ([Figure 10](#)). Both Gallego's trichrome ([Figure 10a](#)) and haematoxylin-eosin ([Figure 10b](#)) staining reveal the serous tubuloalveolar nature of the vomeronasal glands. Alcian blue staining demonstrates that the acini secrete an Alcian Blue-positive material ([Figure 10c](#)).

The information concerning blood vessels is summarised in [Figure 11](#). These vessels form a large vascular network, providing the organ with erectile tissue functionality. In the anterior portion of the VNO, veins form a complete vascular ring encircling the vomeronasal duct ([Figure 11a](#)). In the central area of the VNO, large venous sinuses run along the lateral portion of the parenchyma ([Figure 11d](#)). Conversely, in the caudal area of the VNO, where the glove-fingered termination of the vomeronasal duct appears, numerous medium-sized veins predominate ([Figure 11c](#)). In contrast, arteries within the VNO are small and sparse ([Figure 11b,c](#)).

The innervation of the VNO consists of two types of nerves classified according to their myelination ([Figure 12](#)). The sensory component comprises unmyelinated branches of the vomeronasal nerves ([Figures 7 and 8](#)). These nerves occupy the medial parenchyma of the VNO, characterised by their homogeneous appearance and densely packed nerve bundles ([Figure 12a](#)). Meanwhile,

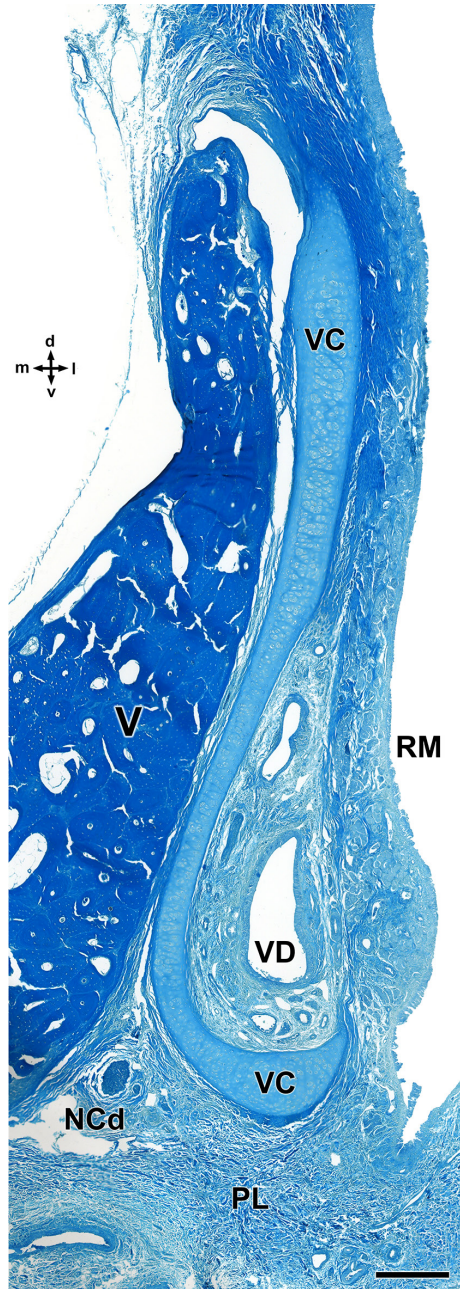


FIGURE 13 Decalcified cross section of the anterior portion of the wolf nasal septum, stained with Gallego's trichrome, showing the topographical relationship of the VNO with the vomer bone. The vomeronasal cartilage (VC) presents an elongated morphology, accompanying the shape of the vomer bone (V) and opens laterally. d, dorsal; l, lateral; LP, lamina propria; m, medial; NCd, caudal nasal nerve; PL, palate; RM, respiratory mucosa; v, ventral; VD, vomeronasal duct. Scale bar = 250 μm.

the lateral portion of the parenchyma contains myelinated nerve branches originating from the caudal nasal nerve (Figures 7, 8b and 11d). These branches exhibit a more loosely structured appearance, and the empty spaces corresponding to the myelin sheaths can be seen (Figure 12b).

Our microscopic investigation of the VNO was complemented by an examination of decalcified histological sections from the

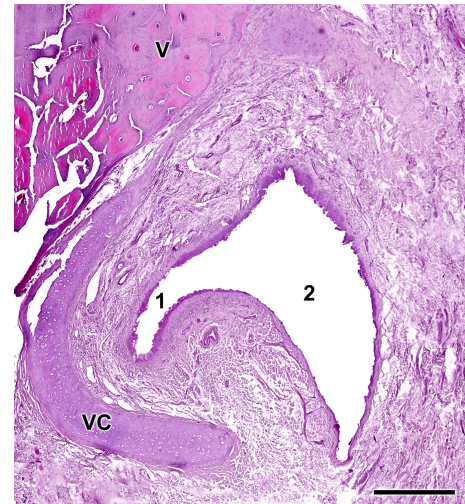


FIGURE 14 Opening of the vomeronasal duct into the incisive duct of the wolf. The vomeronasal duct (1) establishes a direct communication with the incisive duct (2). Anatomically, the latter runs laterally to the organ, allowing a double direct communication between the oral and nasal cavities. Staining: haematoxylin-eosin. VC, vomeronasal cartilage; and V, vomer bone. Scale bar = 500 μm.

rostral part of the nasal septum. These sections illustrate the topographical relationship of the rostral VNO with the vomer bone (Figure 13). At this level, the vomeronasal cartilage assumes an elongated morphology that aligns with the shape of the vomer bone, featuring a notable lateral gap. Further examination of more rostral decalcified samples confirmed, microscopically, the functional communication of the vomeronasal duct with the external environment via the ID. The latter runs laterally to the VNO, facilitating direct communication between the vomeronasal duct and both the oral and nasal cavities. It achieves this by opening ventrally into the aperture present in the elevated mucosa, forming the incisive papilla, and dorsally into the meatus located on the floor of the nasal cavity (Figure 14).

3.3 | Lectin histochemical study of the VNO (Figure 15)

Both the neuroreceptor cells of the sensory epithelium and the vomeronasal nerves of the VNO show positive histochemical labelling for both UEA and LEA lectins (Figure 15). However, when considering the neuroepithelial cell clusters located in the basal region of the neuroepithelium, both lectins exhibit contrasting labelling patterns.

While LEA produces positive labelling of neuronal clusters (Figure 15a), UEA lectin does not label these cells (Figure 15d,e). LEA labelling is slightly more pronounced in the apical processes of the epithelium (Figure 15a,b), while UEA produces more intense labelling in the basal regions of the epithelium (Figure 15d,e), excluding the unlabelled clusters. Regarding the respiratory epithelium, it exhibits diffuse labelling from both lectins, albeit with distinct patterns. LEA positivity is primarily concentrated in most of the apical processes of

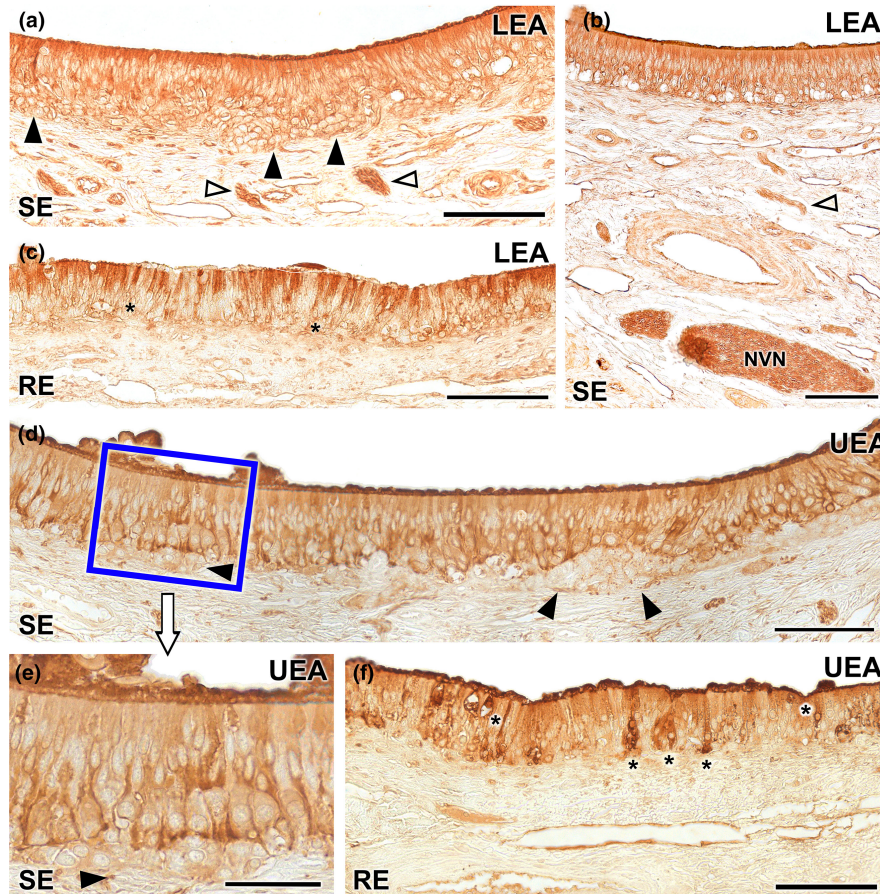


FIGURE 15 Lectin histochemical labelling of the vomeronasal epithelium. (a–c) LEA lectin labelling: The neuroreceptor epithelium (SE) shows intense labelling throughout all its components including neuroepithelial clusters (black arrowheads) and nerve bundles in the lamina propria (white arrowheads) (a). This labelling extends to the vomeronasal nerves (NVN) (b). (c) The respiratory epithelium shows a diffuse LEA positivity, concentrated mainly in the most apical part of the epithelium, while the basal cells remain unlabelled (asterisk). (d–f) UEA lectin: Positivity is demonstrated across the sensory epithelium of the VNO excluding the neuronal clusters (arrowheads) which are not labelled (d). At higher magnification, an intensity gradient increasing with depth can be discerned (e). The unlabelled neuronal clusters are shown (arrowhead). (f) The respiratory epithelium exhibits fainter labelling, with few positive cells scattered along the epithelium (*). UEA labelling is also markedly concentrated in the mucociliary layer. Scale bar: (a–d, f) = 100 μ m; (e) = 50 μ m.

the epithelium (Figure 15c), while UEA presents a few strongly labelled cells scattered along the epithelium. Within the mucociliary complex, labelling is stronger with UEA compared to LEA (Figure 15f).

3.4 | Immunohistochemical study of the VNO (Figures 16 and 17)

The anti-G α antibody, which specifically labels the α subunit of the G protein transduction cascade associated with the V2R receptor, labels a subpopulation of neurons predominantly located in the basal layers of the neuroepithelium. This arrangement is more evident in those areas of the epithelium with a greater number of layers of neuroreceptor cells. These neurons extend their axons towards the adjacent vomeronasal nerves (Figure 16a,b). The labelling encompasses the entire length of the immunopositive neuroreceptor cells, spanning from the apical dendrite to the soma. Furthermore, immunopositive neuroreceptor cells embrace the intra-epithelial capillaries of the

VNO (Figure 16c). The anti-G α i2 antibody, which labels the α i2 subunit of the G protein transduction cascade linked to the V1R receptors, labels neuroreceptor cells predominantly present in the central region of the epithelium and within the vomeronasal nerves (Figure 16d,e). In contrast to G α , no immunopositive neurons are identified in proximity to the intra-epithelial capillaries. Neither anti-G α nor anti-G α i2 immunolabel the entirety of the dendritic processes that constitute the apical surface of the epithelium, suggesting the complementarity of both immunolabelling. Additionally, the dendritic knobs, immunolabelled with anti-G α i2, while less numerous than those labelled by anti-G α , exhibit a more dilated morphology (Figure 16e). The deep neuronal clusters remain immunonegative.

To accurately verify the complementarity of both neuroreceptor cell subpopulations based on their immunostaining against G protein subunits, we performed a double immunohistochemical labelling against both G proteins. This technique revealed the presence of both cellular subpopulations, differentiated by the immunostaining at the level of both neuronal somas and dendritic buttons

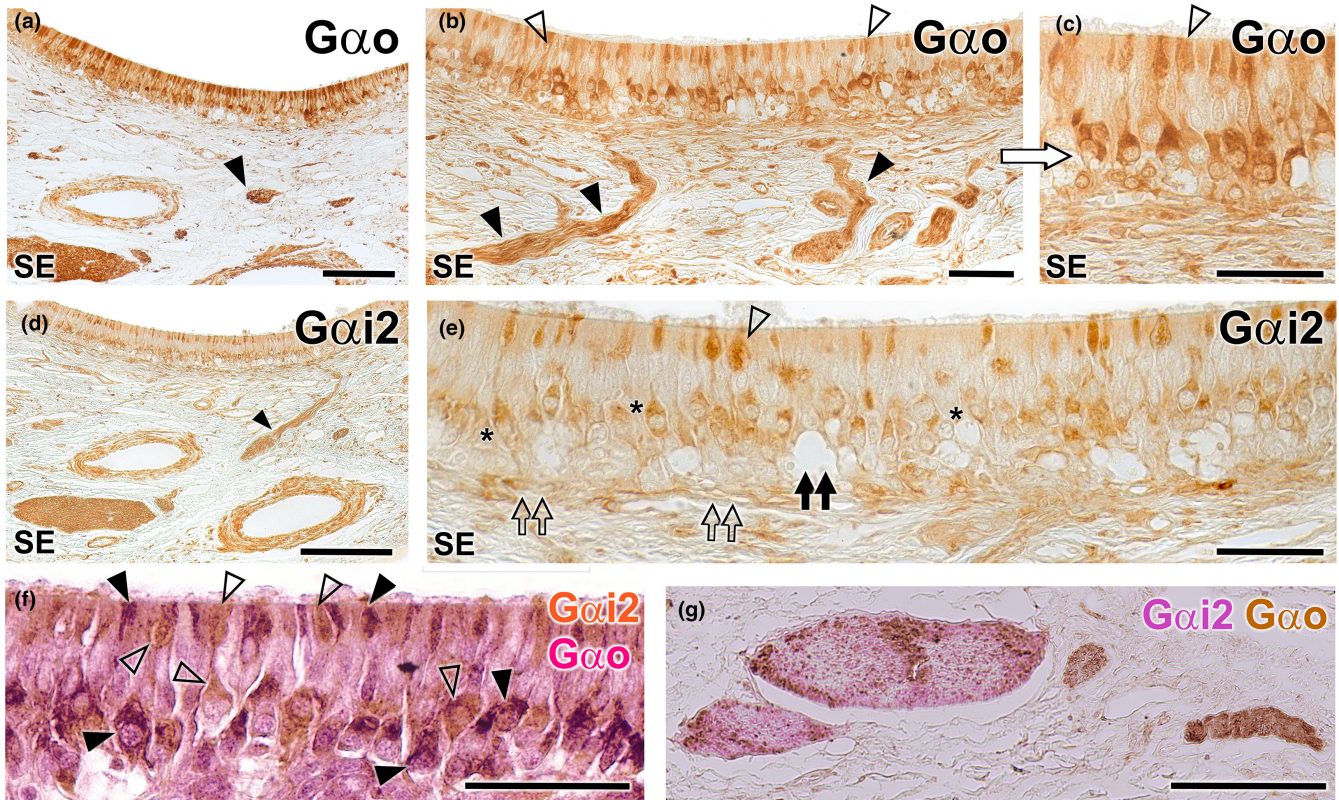


FIGURE 16 Immunohistochemical study of the wolf VNO. $G\alpha o$ (a–c): Immunolabelling with anti- $G\alpha o$ shows a pattern of neuronal labelling predominantly concentrated in the neuroreceptor cells present in the basal layers of the neuroepithelium (a and b) and extending to the adjacent vomeronasal nerves (arrowheads). At higher magnification (c: enlarged area of the blue box in image b), it is appreciated how the labelling extends along the entire length of the immunopositive neuroreceptor cells, from the apical dendrite (open arrowhead) to the soma. Immunopositive neuroreceptor cells embrace the intraepithelial capillaries of the VNO. $G\alpha i2$ (d, e): The labelling is predominantly concentrated in the neuroreceptor cells mainly located in the central zone of the epithelium (asterisk) and the vomeronasal nerves (arrowhead). Unlike $G\alpha o$, no immunopositive neurons are identified around the intraepithelial capillaries (black double arrow). The dendritic knobs are less numerous than in $G\alpha o$ but more dilated (open arrowhead). The deep neuronal clusters are immunonegative (open double arrows). (f–g): f Double immunostaining for $G\alpha i2$ and $G\alpha o$ confirms the presence of two subpopulations of vomeronasal neuroreceptor cells. Anti- $G\alpha i2$ (brown) immunostains a subpopulation of cells predominantly located in the central zones, which have thick dendritic knobs (open arrowheads). Anti- $G\alpha o$ (red) stains a cell subpopulation mainly located in a more basal zone (black arrowheads). (g) In some cases, as the one shown, the vomeronasal nerves in the parenchyma are predominantly composed either of $G\alpha i2$ type fibres (red) or $G\alpha o$ type fibres (brown). Scale bars: (a, d and g) = 100 μ m; (b, c, e and f) = 50 μ m.

(Figure 16f). The projection of both subpopulations to the vomeronasal nerve fibres in the parenchyma of the VNO in most cases was not differential, as the nerve branches showed a mixture of both immunolabelling, but in some cases, some nerves showed a differential staining being mostly either $G\alpha o$ or $G\alpha i2$ immunopositive (Figure 16g).

The anti-calbindin antibody generates a uniform immunolabeling pattern across the neuroreceptor cell layer, encompassing the vomeronasal nerves (Figure 17a). These immunopositive cells constitute a regularly aligned subpopulation situated in an intermediate area between the basal and apical layers. However, the terminal knobs are poorly labelled, and there is an absence of immunopositivity in the basal clusters (Figure 17b). In contrast, the anti-calretinin antibody demonstrates strong immunopositivity in the basal neuronal clusters (Figure 17c). In addition, a subpopulation of neuroreceptor cells whose dendrites show dilated terminal knobs can be identified. Vomeronasal nerves are also stained.

Anti-OMP, which binds to OMP (a protein serving as a marker of neuronal maturation), produces diffuse labelling throughout the epithelium, including the basal clusters (Figure 18d). Conversely, anti-GAP-43, which binds to GAP43, a protein associated with neuronal axonal growth, presents a similar pattern but lacks labelling of the neuronal clusters (Figure 18e).

3.5 | Histological study of the nasal septum mucosa (Figure 18)

To trace the pathway of the vomeronasal nerves through the nasal septum, we carried out immunohistochemical labelling after dissecting the nasal mucosa, employing antibodies against the G alpha subunit proteins (Figure 18).

While the $G\alpha i2$ subunit yielded distinct and specific labelling of the vomeronasal nerves (Figure 18a, a' and a''), the antibody targeting $G\alpha o$

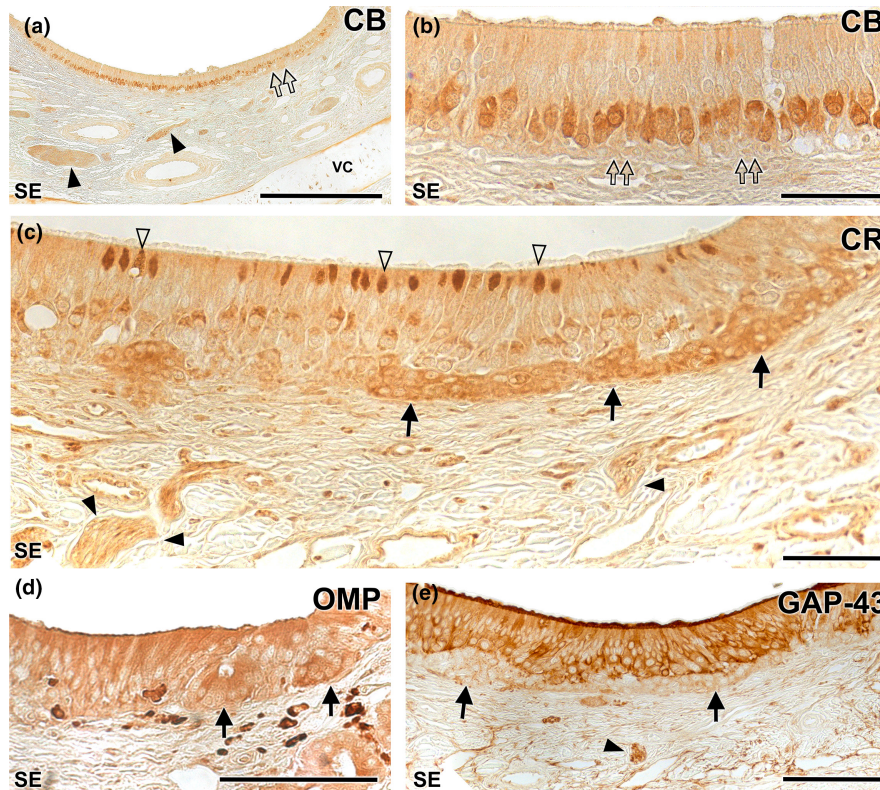


FIGURE 17 Immunohistochemical study of the wolf VNO. Calbindin (CB) (a–b): At low magnification (f) uniform labelling is observed throughout the neuroreceptor cell layer, extending into the vomeronasal nerves (black arrowheads). No immunopositivity is observed in the clusters (double arrows). At higher magnification (g: magnification of the blue box in f) how the immunopositive cells correspond to a regularly aligned subpopulation in an intermediate zone between the basal and apical layers is appreciated. The terminal knobs are poorly labelled. Calretinin (CR) (c): A strong immunopositivity to the neuronal clusters is observed (arrows). In addition, a subpopulation of neuroreceptor cells whose dendrites show dilated terminal knobs can be identified (white arrowheads). Vomeronasal nerves (black arrowhead). OMP (d): Anti-OMP produces a diffuse labelling throughout the epithelium, including the basal clusters (arrows). GAP-43 (e): Pattern similar to (i) but without labelling the neuronal clusters (arrows). Arrowhead: vomeronasal nerves. SE: Neurosensory epithelium. VC: Vomeronasal cartilage. Scale bars: (a) = 250 μm ; (d and e) = 100 μm ; (b and c) = 50 μm .

not only stained the vomeronasal nerves but also the olfactory nerves coursing through the mucosa of the nasal cavity and the olfactory neuroepithelium from which these axons originate (Figure 18b, b' and b'').

3.6 | Histological analysis of the AOB (Figure 19)

We examined the histological structure of the AOB using haematoxylin and eosin staining (Figure 19a–c,f) and Nissl staining (Figure 19d,e,g,h), both performed on serial sagittal sections. Both stains revealed a significant development of this structure, particularly in relation to its two superficial layers: the nerve layer and the glomerular layer (Figure 19a–e). The nerve layer represents the arrival point for the vomeronasal nerves (Figure 19f,g), while the glomerular layer consists of well-defined, broad and rounded glomeruli that are clearly visible with both stains (Figure 19f,g). The mitral cells are diffusely distributed in a wide zone located between the glomerular layer and the granular layer, thereby precluding the distinction between true plexiform and mitral layers. As a result, the term 'mitral-plexiform layer' (MPL) is employed to describe this region (Figure 19e,h). The granular layer contains

clusters of small, rounded cells interspersed within the white matter (Figure 19h).

3.7 | Immunohistochemical study of the AOB (Figure 20)

The immunohistochemical examination of the wolf AOB using antibodies targeting G protein subunits produced complementary labelling patterns for both $G\alpha i2$ and $G\alpha o$ subunits. Anti- $G\alpha i2$ presented uniform and intense immunostaining in the superficial nervous and glomerular layers of the AOB layers (Figure 20a). In contrast, anti- $G\alpha o$ produced a reverse pattern, with strong immunopositivity observed in the neuropil surrounding the AOB's superficial layers. Both the mitral-plexiform and granular layers of the AOB were immunostained with anti- $G\alpha o$. However, the superficial layers were immunonegative, although some immunopositive punctae areas were observed (Figure 20b). These immunolabeling patterns correspond to the dendritic projections of mitral cells within the glomerular layer. Furthermore, calcium-binding proteins such as calbindin (Figure 20c) and calretinin (Figure 20d), as well as OMP (Figure 20e),

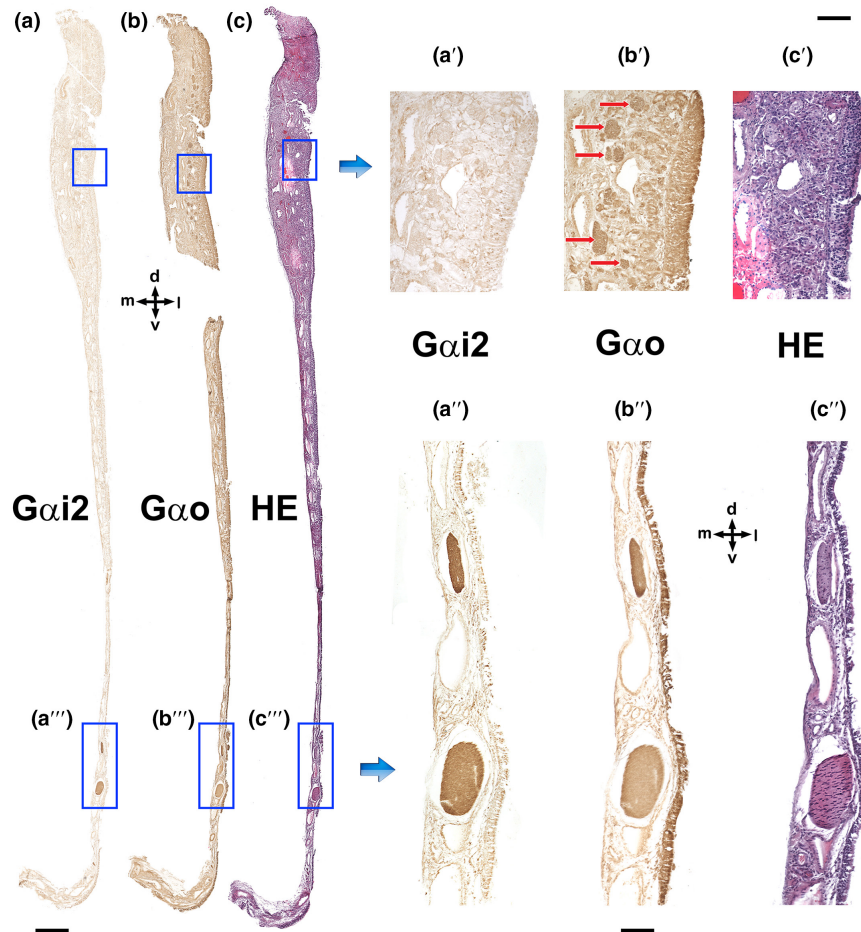


FIGURE 18 Immunolabelling of the VNO nasal septum mucosa with anti-G proteins subunits. (a) Anti-G α i2 exclusively stains the vomeronasal nerves as they run through the mucosa of the nasal septum (a"). Therefore, anti-G α i2 does not produce positive immunolabelling of the olfactory nerves, which run in the upper part of the olfactory mucosa (a'). (b) Anti-G α o (b) stains both the vomeronasal nerves (b'') and the olfactory nerves in the mucosa (b', red arrows). (c) Haematoxylin–eosin adjacent section. d, Dorsal; l, lateral; m, medial; and v, ventral. Scale bars: (a–c)=500 μ m; (a'–c' and a''–c'')=100 μ m.

showed an identical labelling pattern to that obtained with anti-G α i2, with the immunolabelling concentrated in both the superficial layers, contrasting with an immunonegative neuropil.

The use of anti-GFAP, a specific marker for glial cells, resulted in a trabecular labelling pattern in the nerve and glomerular layers, which corresponded to the ensheathing glia accompanying the vomeronasal nerve endings (Figure 20f). Occasionally, cell bodies belonging to these glial cells were visible (Figure 20i). Meanwhile, anti-MAP2, a reliable marker for the somata and dendritic projections of the principal cells in the olfactory bulb, exhibited strong labelling within an irregular band corresponding to the MPL layer (Figure 20g). MAP-2 immunopositive prolongations originating from the MPL could be observed running between the glomeruli of the AOB (Figure 20h).

3.8 | Lectin histochemical study of the AOB (Figure 21)

Both lectins employed labelled the AOB. On the one hand, UEA lectin specifically labelled the superficial layers of the AOB (Figure 21a),

while the entire surrounding neuropil remained negative. On the other hand, LEA lectin produced a labelling pattern similar to UEA, with strong labelling in the AOB's superficial layers, making it challenging to differentiate between the nervous and glomerular layers (Figure 21b). The surrounding neuropil showed a diffuse labelling pattern.

4 | DISCUSSION

Chemical communication, facilitated by pheromones, has long been recognised as an essential component of social and sexual interactions among canids. These complex chemical signals are detected and processed by the VNS, serving a range of functions from mate selection and social hierarchy establishment to territory marking. They are also integral to the reproductive physiology of these animals (Gorman & Trowbridge, 1989).

In this study, we aimed to contribute to the ongoing research on the neuroanatomical and neurochemical aspects of the VNS in canids. Specifically, we focus on the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*), an emblematic species of great ecological importance and cultural

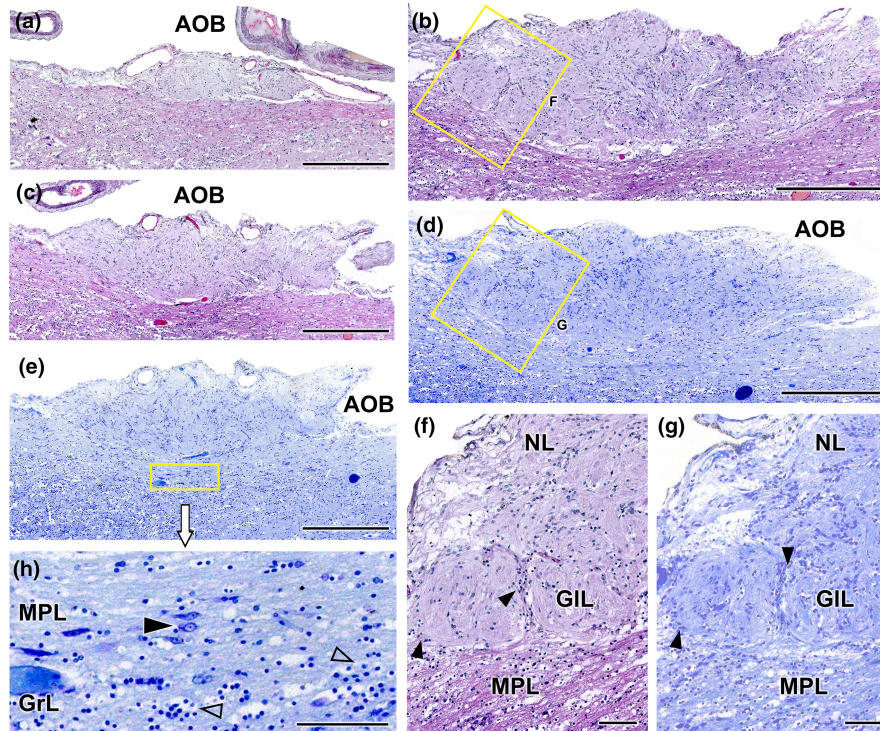


FIGURE 19 Histological study of the wolf accessory olfactory bulb stained with haematoxylin–eosin and Nissl staining. (a–c) A general view of the AOB can be seen at three selected sagittal levels stained with HE. They show the elongated shape of this structure and the predominance of the nervous (NL) and glomerular layers (GIL). (d, e) Sagittal Nissl-stained sections at low magnification allows to appreciate the development of the AOB. (f) At higher magnification (corresponding to box in b), two glomerular formations clearly defined by periglomerular cells (arrowheads) are appreciated. (g) The magnification of the superficial area of the AOB (box in d) allows to discriminate the presence of a mitral-plexiform layer (MPL). (h) Enlargement of the deep area of the AOB (corresponding to box in e) shows mitral cells (black arrowhead) in the MPL as well as granular cells (open arrowhead) in the deeper granular layer (GrL). Scale bars: (a–e) = 500 μm ; (f–h) = 100 μm .

significance, with a crucial role in ecosystem dynamics. Surprisingly, up to this point, there has been limited exploration of the neuroanatomical features of its VNS. Notably, research on VNS in domestic dogs has witnessed substantial growth in the past decade, highlighting its crucial role in shaping the socio-sexual behaviours of domestic canines (Muñiz-de Miguel et al., 2023), as well as its potential involvement in pathological conditions leading to significant behavioural changes (Asproni et al., 2016). Consequently, clinical interest in this sensory system has considerably increased (Dzięciol et al., 2020; Pageat & Gaultier, 2003).

Conversely, a primary limitation in the existing literature is the paucity of research pertaining to wild or feral canids. There are only a few notable exceptions, such as the study by Chengetanai et al. (2020), who investigated the neuroanatomy of the African wild dog's AOB as part of their broader investigation of the olfactory system in this species. Recent studies on foxes have unveiled considerable anatomical and functional differences when comparing these wild foxes to their domestic counterparts. Remarkably, these fox studies have identified specific features in the structure and neurochemistry of the VNO (Ortiz-Leal et al., 2020), AOB (Ortiz-Leal, Torres, Villamayor, et al., 2022) and the transitional zone commonly referred to as the olfactory limbus (Ortiz-Leal et al., 2023).

In the subsequent sections, we focus on the key findings of our research, with a specific focus on the unique neuroanatomical features of the VNS in wolves and its evolutionary implications. To achieve this, we not only compare our data with the extensively researched VNS of the domestic dog but also incorporate available data on other wild canid species. Additionally, our goal is to contextualise our results within the larger framework of carnivorous taxa, with a particular emphasis on felids, mustelids and ursids. This approach will help elucidate the adaptive, evolutionary or potentially convergent characteristics of these chemosensory systems. In essence, this study seeks to provide a neuroanatomical basis for guiding future investigations into the chemical ecology of not only wild canids but also other carnivorous taxa.

4.1 | VNO macroscopic study

We employed both cross sectional macroscopic anatomy and CT scans to meticulously delineate the topographic relationships and macroscopic features of the wolf's VNO. The use of CT scans to characterise VNO anatomy has been relatively limited, with only a small number of studies dedicated to this specific area. Previous research has been largely restricted to goats (Moawad et al., 2017),

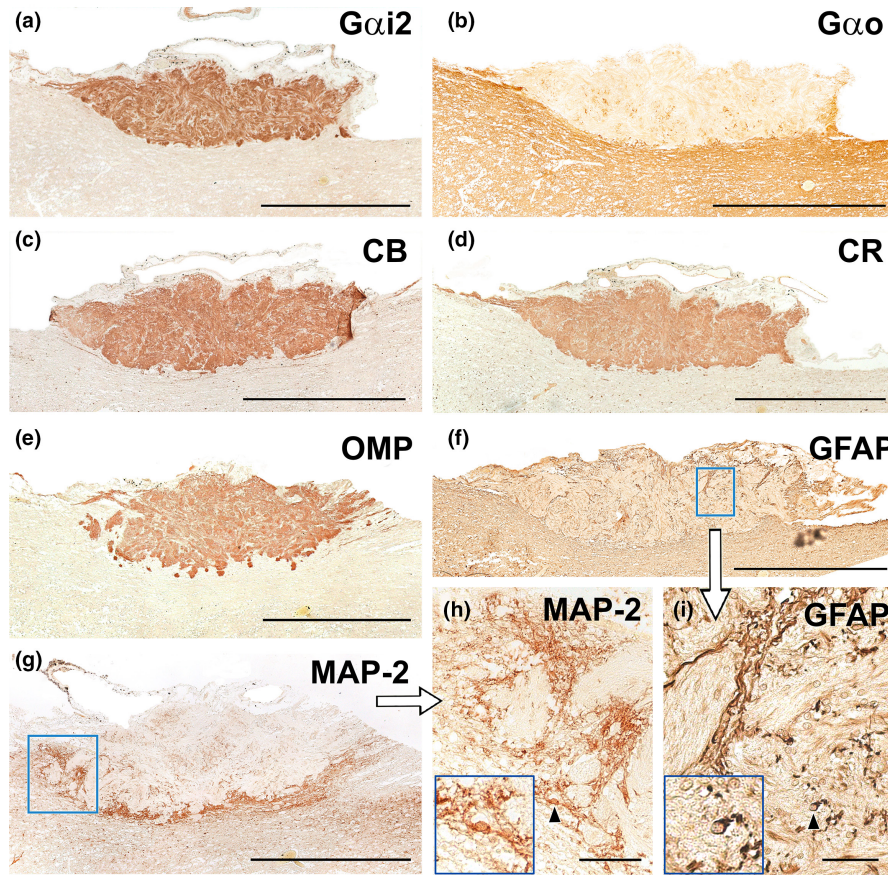


FIGURE 20 Immunohistochemical study of wolf AOB. (a) Anti-G α i2 uniformly and intensely label the superficial layers of the AOB (nervous and glomerular layers). The entire surrounding neuropil is negative. (b) Anti-G α o produces a reverse pattern to the one shown in A, where the neuropil surrounding the superficial layers is strongly immunopositive, including the mitral-plexiform and granular layers of the AOB. However, the superficial layer is clearly negative, although immunopositive punctae areas are observed. (c–e) The calcium binding proteins, calbindin (c) and calretinin (d), as well as OMP (e) show an identical labelling pattern to that obtained with anti-G α i2, concentrated in both the nerve and glomerular layers and immunonegative for the neuropil. (f) Anti-GFAP (f and enlarged area in i) produces a trabecular labelling pattern in the nerve and glomerular layers, which corresponds to the ensheathing glia accompanying the vomeronasal nerve endings. Occasionally, cell bodies belonging to these glial cells are visible (arrowhead). The cell body is magnified in the bottom left-hand box. (g) Anti-MAP-2 immunolabelling does not produce immunopositive labelling in the superficial layers (nervous and glomerular), but it strongly labels an irregular band corresponding to the MPL layer. (h) MAP-2-immunopositive prolongations originating from the MPL can be observed running between the glomeruli of the AOB. (h: enlargement of the box in g). The cell body of an immunopositive interneuron (arrowhead) is shown in an enlarged view in the box at the bottom left. Scale bars: (a–g) = 500 μ m; (h–i) = 50 μ m.

camels (Alsafty et al., 2014), bats (Yohe et al., 2018) and mice (Levy et al., 2020; Mucignat, 2004). In the case of mice, researchers have employed high-resolution magnetic resonance and micro-CT techniques in their studies. Our results corroborate the bilateral positioning of the wolf's VNO in the most rostral and ventral regions of the nasal cavity. It is situated laterally to the vomer bone and ventrally to the cartilage of the nasal septum, predominantly occupying the internal side of the palatine fissure. Our serial anatomical sections illustrate how the VNO is highly adapted to the contours of the nasal cavity, reinforcing the notion that its strategic placement may optimise its functional efficacy. This positioning facilitates communication through the ID, connecting the organ to the external environment through both the nasal and oral cavities. This suggests a complex interplay between these two cavities, potentially enabling a multi-modal sensory input for the wolf.

Given its intricate location and the complete covering of the cartilaginous capsule of the VNO by the nasal cavity's respiratory mucosa, visualising the organ proves challenging both in vivo and post-mortem. The presence of the caudal nasal myelinated nerve at the most caudal extremity of the VNO serves as a reliable indicator of its location. Additionally, the vomeronasal nerve fibres were observed to run in a caudodorsal direction, indicating an integrated neuroanatomical pathway with the MOS. The cartilaginous capsule almost entirely envelops the parenchyma of the VNO, except for its dorsolateral part. This pattern is similar to those described in other carnivores such as dogs (Salazar et al., 2013), foxes (Ortiz-Leal et al., 2020), ferrets (Kelliher et al., 2001), minks (Salazar, Cifuentes, Quintero, & Caballero, 1994) and bears (Tomiya et al., 2017). However, it is somewhat less extensive compared to the complete encapsulation observed in felines (Salazar et al., 1995). While our

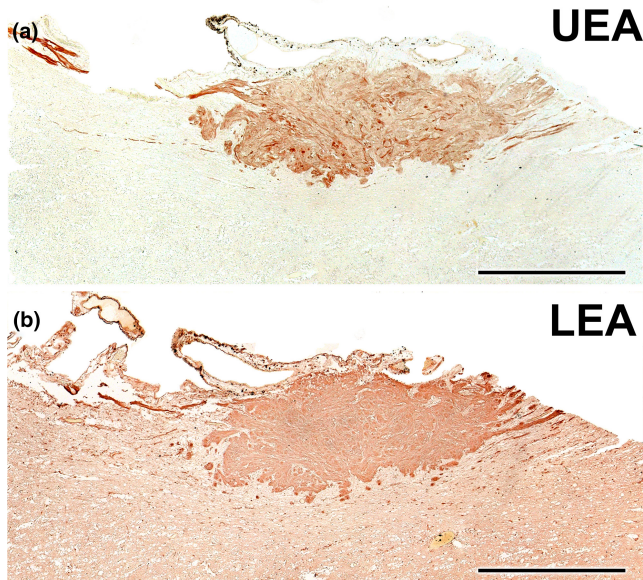


FIGURE 21 Lectin histochemical study of the wolf AOB. (a) UEA lectin labels uniformly and strongly the superficial layers of the AOB (nervous and glomerular layers). The entire surrounding neuropil is negative. (b) LEA-lectin produces a similar labelling to UEA but with higher intensity in the AOB superficial layers and a diffuse pattern in the surrounding neuropil. Scale bar = 500 μ m.

macroscopic study primarily had an anatomical focus, our observations have functional implications. For instance, the VNO's location adjacent to the root of the upper canine tooth suggests a potentially critical role in sensing pheromones during aggressive or mating behaviours.

4.2 | VNO's histological features

Our histological analysis of the VNO reveals a complex micro-anatomy essential for understanding its potential physiological and behavioural functions. The U-shaped cartilaginous structure that encapsulates the soft tissue serves a crucial role: It prevents the soft tissue from collapsing under the negative pressure generated by the vomeronasal pumping mechanism designed to intake pheromones (Meredith, 1994; Meredith et al., 1980; Meredith & O'Connell, 1979). The presence of a complex venous network within the wolf VNO is a noteworthy finding. Notably, our examination reveals a complex venous network within the wolf's VNO. Although this feature is also characteristic of the VNO in dogs and cats, as reported by Salazar et al. (1997, 2013), all the wolf specimens we studied presented a more advanced development of the vascular component. This is particularly evident in the predominance of large, muscular veins located in the dorsal and lateral regions of the organ. This venous preponderance plays a crucial role in the functioning of the vascular pump. When these vascular structures within the soft tissue contract, the lumen of the vomeronasal duct expands, creating a vacuum effect that draws in chemical molecules. Conversely, vascular dilation causes the duct

to constrict, leading to the expulsion of its contents, as described by Eccles (1982).

The limited presence and reduced size of arteries in the VNO may suggest that the organ does not require a high supply of oxygenated blood for its primary function of chemoreception. This could imply an energy-efficient mechanism, where the organ operates optimally without needing substantial blood flow, possibly reflecting evolutionary adaptations that prioritise efficiency in sensory organs (Niven & Laughlin, 2008).

Further, our observations of blood capillaries in the neuroepithelium of the organ suggest the presence of mechanisms that enhance the efficiency of nutrient and gas supply to the VNO. Interestingly, these capillaries are in direct contact with the neuroreceptor layer, raising speculation about the possibility of haematogenic olfaction (Bednar & Langfelder, 1930). Although this olfactory paradigm is not definitively proven, recent findings indicating that the VNO serves as a critical sensor for haemoglobin in rodents (Osakada et al., 2022) support this hypothesis. Intra-epithelial capillaries have previously been characterised in rats (Breipohl et al., 1981), a species with a notably thick epithelium requiring substantial blood supply. In contrast, intra-epithelial blood vessels have not been reported in species with neuroepithelium composed of only a few cell rows, such as lemurs (Smith et al., 2007, 2015), tree shrews, slow lorises (Loo & Kanagasunteram, 1972), certain primates (Smith, Garrett, et al., 2011) and bats (Bhatnagar & Meisami, 1998; Bhatnagar & Smith, 2007). The presence of these intra-epithelial capillaries in wolves, a species with significantly fewer neuroreceptor cells compared to rodents, is quite striking. To our current understanding, no descriptions of the dog VNO refer to the presence of such intra-epithelial capillaries (Dennis et al., 2003; Salazar et al., 2013). This could represent a significant morphological distinction that may have implications for the functional capabilities of the VNO in these closely related species.

The interaction of the vomeronasal duct with the external environment demonstrates notable similarities between our findings on decalcified histological series in wolves and what has been described in dogs (Adams & Wiekamp, 1984; Salazar et al., 2013). This indirect interaction involving the ID is also evident in other carnivores such as foxes (Ortiz-Leal et al., 2020), minks (Salazar, Cifuentes, Quinteiro, & Caballero, 1994) and bears (Tomiyasu et al., 2017), as well as in mammals from other orders including cows (Jacobs et al., 1981), moose (Vedin et al., 2010) and hedgehogs (Kondoh et al., 2021). One end of the ID communicates with the vomeronasal duct through the ventral recess of the nasal cavity, while its other end connects to the oral cavity via the incisive papilla. This distinct anatomical configuration distinguishes these species from rodents and lagomorphs. In the latter group, the vomeronasal duct directly opens into the nasal cavity, and the ID serves as an independent link between both cavities (Vaccarezza et al., 1981; Villamayor et al., 2018).

The relatively sparse glandular tissue, concentrated near the ventral and particularly the dorsal commissures, appears to play a specialised role in either secretion or absorption, thereby maintaining a continuous mucous environment within the vomeronasal duct

(Halpern & Martínez-Marcos, 2003). In wolves, as in dogs (Kondoh et al., 2020) and foxes (Ortiz-Leal et al., 2020), a few glands are observed in the central and medial portions of the organ, with their numbers increasing progressively towards the caudal portions. Using Alcian Blue stain, we were able to characterise the nature of the glandular secretions in the wolf's VNO as AB-positive. The presence of AB-positive vomeronasal glands has also been observed in foxes (Ortiz-Leal et al., 2020). In contrast, Kondoh et al. (2020) reported that vomeronasal glands in dogs were solely PAS-positive. In the case of other carnivore species, Tomiyasu et al. (2018) identified both PAS- and AB-positive glands in bears. Meanwhile Salazar et al. (1996) and Kondoh et al. (2020) identified only PAS-positive glands in cats and dogs respectively. These variations may be attributed to the specific region of the VNO under examination, as most studies have primarily focused on its central region, where we have observed a lower glandular tissue density. Future investigations that examine the nature of vomeronasal gland secretion along the entire axis of the dog's VNO are expected to provide further insights into this matter.

The organisation of the vomeronasal, sensory and respiratory epithelia essentially follows the pattern described in other canids such as dogs (Salazar, Cifuentes, Sánchez Quinteiro, & García Caballero, 1994) and foxes (Ortiz-Leal et al., 2020), except for the notable presence of conspicuous cellular clusters in a basal position (Figure 9b). These cellular accumulations, due to their density and the size of the cells composing them, are clearly distinct from the layer of basal cells and the neuroreceptor cells. Moreover, as will be discussed later in the text, the immunohistochemical study shows that they present a unique pattern of immunostaining. Other histological features of the wolf's VNO closely resemble the information available on dogs. Specifically, the abundant connective tissue found throughout the wolf's VNO likely plays a vital role in maintaining structural integrity. This tissue acts as a scaffold, preserving the intricate microanatomy essential for the specialised functions of the VNO (Takami, 2002). Additionally, the identification of two distinct types of nerve fibres in the VNO—myelinated and unmyelinated—is a shared feature between both species. These fibre types are, respectively, related to sensory perception and the autonomic control of blood vessels and glands (Iwanaga & Nio-Kobayashi, 2020).

4.3 | VNO's immunohistochemical features

The immunohistochemical characterisation of the wolf VNO reveals distinctive expression patterns for various G protein subunits and neural markers, including calbindin, calretinin, OMP and GAP-43. These markers serve as indicators for various functional roles and developmental stages within the VNO's neuroreceptor cells.

Of particular importance is the immunohistochemical analysis employing specific antibodies targeting the alpha subunits of G α 2 and G α o proteins. This significance is reinforced by both neurochemical (Shinohara et al., 1992) and genomic studies (Dulac &

Axel, 1995; Herrada & Dulac, 1997; Matsunami & Buck, 1997; Ryba & Tirindelli, 1997) in rodents, which consistently associate the G α 2 protein with the expression of the V1Rs receptor family in the VNS, whereas the G α o protein is linked to the V2Rs family. Subsequent research has revealed the absence of the G α o pathway in various mammals, including both Laurasiatheria and Primates (Suárez, Fernández-Aburto, et al., 2011; Takigami et al., 2000). Nevertheless, studies focusing on G protein expression in the VNS of Carnivora have been a point of debate.

Initially, Dennis et al. (2003) reported immunopositive labelling in the dog VNO neurosensory epithelium using both anti-G α 2 and anti-G α o antibodies, suggesting an unintended consequence of the antigen retrieval process. This theory gained further credence in a later study by Salazar et al. (2013), who reported immunonegative labelling using the anti-G α o antibody when antigen retrieval was not applied. However, more recent discoveries confirmed the presence of G α o protein immunoreactivity in the fox's VNO neuroepithelium (Ortiz-Leal et al., 2020) and the vomeronasal nerves in the nasal mucosa and cribriform plate (Ortiz-Leal, Torres, Villamayor, et al., 2022). This unexpected expression pattern in the fox has now also been confirmed in another wild canid, the wolf. Specifically, the anti-G α o antibody predominantly labelled neurons located in the basal layers of the vomeronasal neuroepithelium. These marked cells were in proximity to intra-epithelial capillaries, suggesting their potential involvement in vascular interactions or haematogenic olfaction. In contrast, the cells labelled by the anti-G α 2 antibody were situated in the central zone of the epithelium and exhibited no discernible association with intra-epithelial capillaries. The performance of double immunohistochemical labelling against both G proteins subunits allowed for an accurate verification of the presence of both neuroreceptor cells subpopulations, as both markers enabled a clear differentiation of two cell subpopulations, both at the level of neuronal somas and dendritic buttons. This differentiation in some cases extended to the branches of vomeronasal bundles in the parenchyma of the VNO.

While the immunohistochemical identification of G α o is often regarded as a reliable marker for V2R expression in the VNO, this notion is not fully corroborated by existing genomic studies. These studies suggest that functional V2R genes have become vestigial in numerous mammalian groups, including carnivores, through accelerated pseudogenisation (Young & Trask, 2007). However, translating genomic findings into neuroanatomical facts presents challenges because of the mismatch between genetic and morphological aspects in chemosensory systems. To bridge this gap, further morphological investigation is essential, particularly focusing on the associated brain regions, glands and ducts (Yohe & Krell, 2023). The prevalence of pseudogenes among vomeronasal receptors prompts inquiries and may explain the discrepancy between sequencing data and anatomical observations. This complexity is exemplified by an olfactory receptor gene that, despite having a premature stop codon, encodes a functional protein through efficient translational read-through (Prieto-Godino et al., 2016; Stensmyr, 2016). Additionally,

transcriptomic studies have identified the expression of vomeronasal pseudogenes within the mouse's VNO (Dietschi et al., 2022; Oboti et al., 2015).

The notion that the $G\alpha_o$ protein may play a role in cell-to-cell signalling within the wolf neuroepithelium remains a possibility. However, such a role in the mammalian vomeronasal neuroepithelium has not been confirmed. Moreover, this hypothesis does not align with the $G\alpha_o$ immunolabeling pattern in the wolf's VNO, which extend through dendritic processes, cell bodies and axons forming the vomeronasal nerves—a pattern that is consistent with both G proteins being involved in transduction mechanisms (Mohrhardt et al., 2018).

The presence of both $G\alpha_i2$ and $G\alpha_o$ proteins in the sensory epithelia of the wolf's and fox's VNO diverges from the isolated expression of $G\alpha_i2$ protein in other carnivores like dogs and cats (Salazar et al., 2013; Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2011). This raises intriguing questions about the impact of domestication. The absence of $G\alpha_o$ protein expression in the VNS of domestic animals, such as goats (Takigami et al., 2000), sheep (Salazar et al., 2007), dogs (Salazar et al., 2013) and cats (Salazar & Sánchez-Quinteiro, 2011) has led to the hypothesis that domestication may have contributed to the degeneration of the VNS (Jeziński et al., 2016).

A range of supplementary antibodies, including anti-CB, anti-CR, anti-GAP-43 and anti-OMP, were employed for the immunohistochemical examination of the VNO. The anti-CB and anti-CR antibodies are frequently used to characterise neuronal subpopulations, revealing unique expression profiles in the VNS across diverse species (Bastianelli & Pochet, 1995; Briñón et al., 2001; Malz et al., 2000). In the case of wolves, the anti-CB antibody demonstrated a distinct immunolabeling pattern within the sensory epithelium, highlighting a subset of neuroreceptor cells predominantly located in the deeper layers of the epithelium. The labelling was the most concentrated in the cell bodies and less so in the dendritic extensions. Conversely, the anti-CR antibody produced labelling that complemented that of the anti-CB antibody, targeting somata located more superficially within the epithelial layer. Notably, the dendritic buttons on these neurons appeared bulb-shaped and were strongly stained.

The anti-GAP43 antibody, employed to identify neurons undergoing axonal development and synaptogenesis (Gispén et al., 1991; Ramakers et al., 1992; Verhaagen et al., 1989), showed an intense and widespread labelling pattern. This pattern remained consistent with findings observed in both foxes (Ortiz-Leal et al., 2020) and dogs (Dennis et al., 2003), suggesting an active process of neuronal regeneration within the canine vomeronasal sensory epithelium. This ongoing plasticity could be in response to the VNO's frequent exposure to various environmental substances with the potential to cause cellular damage (Ogura et al., 2010). These observations underscore the significance of the vomeronasal sensory system in canids.

Finally, the anti-OMP antibody targeted the olfactory marker protein, which is expressed in mature neurons within both the MOS and the VNS (Farbman & Margolis, 1980). It has shown immunopositive

labelling in a range of species, including rats (Rodewald et al., 2016), mice (Mechin et al., 2021), mole rats (Dennis et al., 2020) and primates (Smith, Dennis, et al., 2011). The ubiquitous presence of OMP within the wolf's VNO suggests a uniform stage of neuronal maturation throughout the epithelium.

Beyond the intricate neurochemical pattern observed in the sensory neuroepithelium of the wolf's VNO—an indication of the complex interplay of molecular and cellular communication and signal transduction mechanisms involved in pheromonal information processing—our immunohistochemical study has identified a striking, distinctive feature of the wolf's VNO. This feature consists of abundant clusters of neuronal cells situated in the most basal part of the sensory neuroepithelium (Figure 9b). These clusters extend for several hundred micrometres immediately beneath the basal layer of neuroreceptor cells (Figures 15a,d,e and 17c–e). They comprise oval-shaped cells with large spherical nuclei, densely packed and seemingly devoid of processes. While their morphology may superficially resemble that of the neuroreceptor cells in the neuroepithelium, these cells display a specific neurochemical pattern. On the one hand, these cells are OMP-positive, reinforcing their role in olfactory signal transduction. On the other hand, they are immunonegative for GAP-43, suggesting a state of higher differentiation compared to the highly GAP-43-positive neuroreceptor cells. These observations do not align with the notion that these are undifferentiated cells serving to renew the epithelium, akin to typical basal cells. Regarding calcium-binding proteins, these clusters are calretinin-positive and calbindin-negative, which could initially establish a link between them and the calretinin-positive cell subpopulation.

The presence of these clusters is seemingly specific to the wolf's VNO. Our comprehensive study of the fox VNO (Ortiz-Leal et al., 2020), using similar markers and protocols, did not reveal a similar neuroepithelial organisation. Furthermore, studies on other carnivores such as dogs, minks, ferrets and bears have not yielded comparable findings. Despite decades of research on the VNO in a diverse array of mammals, this unique neuroepithelial organisation has neither been encountered by us in our studies (Torres, Ortiz-Leal, & Sanchez-Quinteiro, 2023) nor, to the best of our knowledge, has it been reported by other researchers. This suggests that such an organisation may represent a specialised evolutionary adaptation unique to this species, the wolf.

Hypothetically, clusters of neurons beneath the vomeronasal epithelium in the lamina propria, distinct from the vomeronasal neuroreceptor cells, could serve various functions. Its position in the lamina propria would enable the rapid detection of molecules in the surrounding blood vessels, facilitating the response of the epithelium to these changes. The clusters might as well modulate pheromonal signals, regulating signal intensity or quality before reaching central processing areas. Alternatively, they might respond to specific non-pheromonal stimuli, playing a role in alert or defensive functions. Additionally, these clusters might be linked to tissue homeostasis, detecting and responding to environmental changes in the local surroundings. Lastly, they could act as relay stations, transmitting signals to specific brain areas beyond the vomeronasal

epithelium. These hypotheses are speculative and would require further research for validation.

Therefore, further specialised research into these cell clusters, employing additional markers, or even genomic approaches such as RNAscope or single-cell technology, is imperative to more comprehensively characterise this distinctive cell population. This approach will enhance our understanding of its functional role and significance within the VNO.

4.4 | VNO lectin histochemical labelling

Our lectin histochemical investigation reveals subtle differences in the labelling patterns of UEA and LEA lectins within the VNO sensory epithelium and vomeronasal nerves. Both lectins produce positive labelling in neuroreceptor cells and the vomeronasal nerves; yet, they diverge significantly when it comes to the basal neuroepithelial cell clusters. LEA labels these neuronal clusters, whereas UEA does not, suggesting distinct molecular interactions between these lectins and the cellular components of the clusters. Furthermore, LEA shows stronger labelling in the apical processes, while UEA is more concentrated in basal areas of the epithelium, although it never labels the basal clusters.

In the respiratory epithelium, both lectins manifest diffuse but specific labelling patterns. LEA primarily targets the apical processes, whereas UEA labelling is sparser, with a few strongly labelled cells dispersed throughout the epithelium. Within the mucociliary complex, UEA shows stronger labelling compared to LEA. These distinct labelling patterns suggest that the glycoconjugates recognised by these lectins possess specialised molecular functions within the VNO.

4.5 | AOB macroscopic and microscopic anatomy

To the best of our knowledge, this study represents a pioneering morphological investigation of the wolf's AOB. Similar to other studied canids, such as the dog (Nakajima et al., 1998; Salazar & Sánchez-Quintero, 2011), the African wild dog (Chengetanai et al., 2020) and the fox (Ortiz-Leal, Torres, Villamayor, et al., 2022), the wolf's AOB is considerably smaller in size compared to the MOB, rendering its macroscopic identification challenging. Accurate localisation of this structure necessitates the use of serial histological sections. The study of the cytoarchitecture of the wolf's AOB is particularly pertinent, given the historical debate surrounding the moderate development, and even the very existence, of the AOB in dogs. This controversy was only resolved in the 1990s with the advent of lectin histochemical staining techniques (Salazar et al., 1992; Salazar, Cifuentes, Sánchez Quintero, & García Caballero, 1994).

Our research confirms the existence of an AOB in the wolf, with dimensions comparable to those found in domestic dogs. However, the wolf's AOB exhibits a more pronounced laminar organisation. Notably, there is substantial development in the superficial nervous and glomerular layers of the AOB, along with a higher number of

mitral cells, a principal cell type rarely observed in histological sections of the dog's AOB. As a result, the wolf's AOB can be described as possessing a well-defined mitral-plexiform layer. Our findings are in keeping with those of a comprehensive study of the African wild dog's olfactory system, which included an examination of the AOB (Chengetanai et al., 2020). While the size and development of the AOB in wild canids may appear limited, it remains more differentiated than in other groups of carnivores. Specifically, Mustelidae such as the mink (Salazar et al., 1998) and ferret (Kelliher et al., 2001), as well as Herpestidae like the meerkat (Torres et al., 2021), possess poorly differentiated AOBs. Altogether, this morphological research corroborates the presence of distinct lamination patterns in the AOB across wild canid populations and supports the theory that the selection pressure linked to domestication may have regressed the degree of differentiation in the dog's vomeronasal system, a sensory pathway crucial for survival in the wild.

4.6 | AOB immunohistochemistry and lectin histochemistry

The neurochemical profile of the wolf's AOB in its superficial, nervous and glomerular layers mirrors what is observed in the VNO. Proteins, such as Gαi2, CB, CR and OMP, expressed in the vomeronasal neuroepithelium and vomeronasal nerves both in the VNO and the nasal mucosa, are also detected in the superficial layers of the AOB, where they produce immunopositive labelling. However, the superficial layers are Gαo negative. This implies that Gαo-positive vomeronasal neuroreceptors project their information to different areas of the olfactory bulb, a pattern identical to that observed in the VNS of the fox (Ortiz-Leal, Torres, Villamayor, et al., 2022). A recent study on the fox suggested that Gαo vomeronasal afferents project to the olfactory limbus, a transition zone (Ortiz-Leal et al., 2023). The existence of a similar olfactory limbus in the wolf is a subject warranting investigation, as it lies beyond the scope of this study. Of all the markers described in our study, Chengetanai et al.'s (2020) study of the African wild dog's AOB only employed anti-CR, obtaining a pattern similar to the one described by us in the wolf. Similar to the African wild dog, in the wolf, there is no discrimination of calretinin-positive neuronal cells, which contrasts with what is observed in species such as the fox, the mouse or the rabbit, where neuronal staining occurs in the glomerular, mitral-plexiform and granular layers (Jia & Halpern, 2004; Ortiz-Leal et al., 2023; Villamayor et al., 2020). Furthermore, our study of the wolf's AOB used antibodies against MAP-2 and GFAP proteins, enabling us to characterise the remarkable development of the dendritic tree in the mitral-plexiform layer and the glial component, both at the level of the enveloping glia and astrocytes.

Both UEA lectin and LEA produce immunopositivity in the superficial areas of the AOB, but while the former is specific to the AOB, the latter stains both the AOB and the MOB. This pattern is consistent with observations in the dog (Salazar et al., 1992, 2013) and the fox (Ortiz-Leal, Torres, Villamayor, et al., 2022), confirming

the usefulness of UEA as a marker for the VNS of canids and LEA as a general marker for the VNS and MOS in the same family. It is noteworthy, however, that the BSI-B₄ lectin, specific to the VNS of the rat (Ichikawa et al., 1992), remains negative in the case of the wolf, demonstrating the remarkably high specificity of glycoconjugate expression across different mammalian groups.

In conclusion, this comprehensive study of the wolf's VNS, encompassing the VNO, vomeronasal nerves and AOB, has provided the first detailed characterisation of its macroscopic anatomy, histology and neurochemical and histochemical profiles. Our findings highlight significant differences between the wolf (*Canis lupus signatus*) and its domestic counterpart, *Canis lupus familiaris*, in terms of both structural and neurochemical aspects. These findings support the hypothesis that the domestication of the dog's ancestor has led to the regression of specific molecular and neurochemical features within the VNS. Beyond its evolutionary implications, it is noteworthy that the wolf's VNS exhibits unique characteristics. It aligns with other animal models presenting the dual expression of G protein subunits in their VNO, a finding of great interest. Particularly remarkable is the presence of extensive neural clusters in the VNO neuroepithelium, previously undocumented in other canid species or any other mammals. This adds new depth to our comparative understanding of the mammalian VNS. Future molecular and genomic investigations are expected to shed light on the significance of these structural and neurochemical features.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

I.O.L., M.V.T., T.S. and P.S.Q. designed the research and wrote the article. P.S.Q., I.O.L., J.D.B.V., M.V.T., L.F. and A.L.B. performed the work. I.O.L., M.V.T., T.S. and P.S.Q. analysed and discussed the results.


ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the 'Consello Social' of the University of Santiago de Compostela, for the funding provided in completing this study. They also express their gratitude to veterinary student Manuel Isidro Perdígón, who, as part of his final degree project, contributed to the elaboration of the figures presented herein. These figures belong to the Animal Morphology Research Group of the University of Santiago de Compostela GI-1725.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available under request.

ORCID

Pablo Sanchez-Quintero  <https://orcid.org/0000-0002-9891-4817>

REFERENCES

- Abellán-Álvaro, M., Martínez-García, F., Lanuza, E. & Agustín-Pavón, C. (2022) Inhibition of the medial amygdala disrupts escalated aggression in lactating female mice after repeated exposure to male intruders. *Communications Biology*, 5(1), 980. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03928-2>
- Adams, D.R. & Wiekamp, M.D. (1984) The canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy*, 138(Pt 4), 771–787.
- Alonso, J.R., Briñón, J.G., Crespo, C., Bravo, I.G., Arévalo, R. & Aijón, J. (2001) Chemical organization of the macaque monkey olfactory bulb: II. Calretinin, calbindin D-28k, parvalbumin, and neurocalcin immunoreactivity: calcium-binding proteins in the monkey OB. *Journal of Comparative Neurology*, 432(3), 389–407. Available from: <https://doi.org/10.1002/cne.1110>
- Alsafy, M.A.M., El-gendy, S.A.A. & Abumandour, M.M.A. (2014) Computed tomography and gross anatomical studies on the head of one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *The Anatomical Record*, 297(4), 630–642. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.22865>
- Asa, C.S., Mech, L.D., Seal, U.S. & Plotka, E.D. (1990) The influence of social and endocrine factors on urine-marking by captive wolves (*Canis lupus*). *Hormones and Behavior*, 24(4), 497–509. Available from: [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(90\)90038-Y](https://doi.org/10.1016/0018-506X(90)90038-Y)
- Asproni, P., Cozzi, A., Verin, R., Lafont-Lecuelle, C., Bienboire-Frosini, C., Poli, A. et al. (2016) Pathology and behaviour in feline medicine: investigating the link between vomeronasalitis and aggression. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(12), 997–1002. Available from: <https://doi.org/10.1177/1098612X15606493>
- Barja, I., de Miguel, F.J. & Bárcena, F. (2004) The importance of crossroads in faecal marking behaviour of the wolves (*Canis lupus*). *Naturwissenschaften*, 91(10), 489–492. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0557-1>
- Barja, I., Silván, G. & Illera, J.C. (2008) Relationships between sex and stress hormone levels in feces and marking behavior in a wild population of Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *Journal of Chemical Ecology*, 34(6), 697–701. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9460-0>
- Barrios, A.W., Sanchez Quinteiro, P. & Salazar, I. (2014) The nasal cavity of the sheep and its olfactory sensory epithelium. *Microscopy Research and Technique*, 77(12), 1052–1059. Available from: <https://doi.org/10.1002/jemt.22436>
- Barrios, A.W., Sanchez-Quinteiro, P. & Salazar, I. (2014) Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 106. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00106>
- Bastianelli, E. & Pochet, R. (1995) Calmodulin, calbindin-D28k, calretinin and neurocalcin in rat olfactory bulb during postnatal development. *Developmental Brain Research*, 87(2), 224–227. Available from: [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(95\)00073-M](https://doi.org/10.1016/0165-3806(95)00073-M)
- Baum, M.J. & Cherry, J.A. (2015) Processing by the main olfactory system of chemosignals that facilitate mammalian reproduction. *Hormones and Behavior*, 68, 53–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.003>
- Bednar, M. & Langfelder, O. (1930) Über das intravenöse (hämatogene) riechen. *Monatsschrift für Ohrenheilkunde*, 64, 1133–1139.
- Bergström, A., Stanton, D.W.G., Taron, U.H., Frantz, L., Sinding, M.H.S., Ersmark, E. et al. (2022) Grey wolf genomic history reveals a dual ancestry of dogs. *Nature*, 607(7918), 313–320. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04824-9>
- Bhatnagar, K.P. & Meisami, E. (1998) Vomeronasal organ in bats and primates: extremes of structural variability and its phylogenetic implications. *Microscopy Research and Technique*, 43(6), 465–475. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981215\)43:6<465::AID-JEMT1>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<465::AID-JEMT1>3.0.CO;2-1)
- Bhatnagar, K.P. & Smith, T.D. (2007) Light microscopic and ultrastructural observations on the vomeronasal organ of Anoura (Chiroptera: Phyllostomidae). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(11), 1341–1354. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.20601>
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D. & Uyeda, C.T. (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence.

- Brain Research*, 43(2), 429–435. Available from: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90398-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90398-8)
- Boillat, M., Challet, L., Rossier, D., Kan, C., Carleton, A. & Rodriguez, I. (2015) The vomeronasal system mediates sick conspecific avoidance. *Current Biology*, 25(2), 251–255. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.061>
- Breipohl, W., Bhatnagar, K.P., Blank, M. & Mendoza, A.S. (1981) Intraepithelial blood vessels in the vomeronasal neuroepithelium of the rat: a light and electron microscopic study. *Cell and Tissue Research*, 215(3), 465–473. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00233523>
- Bressel, O.C., Khan, M. & Mombaerts, P. (2016) Linear correlation between the number of olfactory sensory neurons expressing a given mouse odorant receptor gene and the total volume of the corresponding glomeruli in the olfactory bulb: mouse olfactory sensory neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 524(1), 199–209. Available from: <https://doi.org/10.1002/cne.23835>
- Briñón, J.G., Weruaga, E., Crespo, C., Porteros, A., Arévalo, R., Aijón, J. et al. (2001) Calretinin-, neurocalcin-, and parvalbumin-immunoreactive elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Eriaceus europaeus*). *The Journal of Comparative Neurology*, 429(4), 554–570.
- Bufe, B., Teuchert, Y., Schmid, A., Pyrski, M., Pérez-Gómez, A., Eisenbeis, J. et al. (2019) Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor Fpr3 in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour. *Nature Communications*, 10(1), 4889. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12842-x>
- Chengetanai, S., Bhagwandin, A., Bertelsen, M.F., Hård, T., Hof, P.R., Spocter, M.A. et al. (2020) The brain of the African wild dog. II. The olfactory system. *Journal of Comparative Neurology*, 528(18), 3285–3304. Available from: <https://doi.org/10.1002/cne.25007>
- Crespo, C., Alonso, J.R., Briñón, J.G., Weruaga, E., Porteros, A., Arévalo, R. et al. (1997) Calcium-binding proteins in the periglomerular region of typical and atypical olfactory glomeruli. *Brain Research*, 745(1–2), 293–302. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01185-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01185-7)
- de la Rosa-Prieto, C., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Bañón, I., Argandoña-Palacios, L., García-Muñozguren, S. & Martínez-Marcos, A. (2010) Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice. *Developmental Neurobiology*, 70(14), 961–970. Available from: <https://doi.org/10.1002/dneu.20838>
- Dennis, J.C., Allgier, J.G., Desouza, L.S., Eward, W.C. & Morrison, E.E. (2003) Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy*, 203(3), 329–338. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00190.x>
- Dennis, J.C., Stilwell, N.K., Smith, T.D., Park, T.J., Bhatnagar, K.P. & Morrison, E.E. (2020) Is the mole rat vomeronasal organ functional? *The Anatomical Record*, 303(2), 318–329. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.24060>
- Dietschi, Q., Tuberosa, J., Fodoulian, L., Boillat, M., Kan, C., Codourey, J. et al. (2022) Clustering of vomeronasal receptor genes is required for transcriptional stability but not for choice. *Science Advances*, 8(46), eabn7450. Available from: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn7450>
- Doucette, J.R., Kiernan, J.A. & Flumerfelt, B.A. (1983) The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system. *Journal of Anatomy*, 137(Pt 1), 1–19.
- Dulac, C. & Axel, R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 83(2), 195–206. Available from: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90161-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90161-2)
- Dzięcioł, M., Podgórski, P., Stańczyk, E., Szumny, A., Woszczyło, M., Pieczewska, B. et al. (2020) MRI features of the vomeronasal organ in dogs (*Canis Familiaris*). *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 159. Available from: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00159>
- Eccles, R. (1982) Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. *Physiology & Behavior*, 28(6), 1011–1015. Available from: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90168-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90168-8)
- Farbman, A.I. & Margolis, F.L. (1980) Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Developmental Biology*, 74(1), 205–215. Available from: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90062-7)
- Fortes-Marco, L., Lanuza, E. & Martínez-García, F. (2013) Of pheromones and kairomones: what receptors mediate innate emotional responses? Pheromones and kairomones. *The Anatomical Record*, 296(9), 1346–1363. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.22745>
- Fortes-Marco, L., Lanuza, E., Martínez-García, F. & Agustín-Pavón, C. (2015) Avoidance and contextual learning induced by a kairomone, a pheromone and a common odorant in female CD1 mice. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 336. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00336>
- Frahm, H.D. & Bhatnagar, K.P. (1980) Comparative morphology of the accessory olfactory bulb in bats. *Journal of Anatomy*, 130(Pt 2), 349–365.
- Fritts, S.H., Paul, L.D., Mech, L.D. and Scott, D.P. 1992. *Trends and management of wolf-livestock conflicts in Minnesota*. Washington, DC: U.S. Fish and Wildlife Service
- Gispén, W.H., Nielander, H.B., De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., Schrama, L.H. & Schotman, P. (1991) Role of the growth-associated protein B-50/GAP-43 in neuronal plasticity. *Molecular Neurobiology*, 5(2–4), 61–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02935540>
- Gorman, M.L. & Trowbridge, B.J. (1989) The role of odor in the social lives of carnivores. In: Gittleman, J.L. (Ed.) *Carnivore behavior, ecology, and evolution*. Springer US: Boston, MA, pp. 57–88. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4716-4_3 [Accessed: 2 September 2023].
- Graphodatsky, A.S., Perelman, P.L., Sokolovskaya, N.V., Beklemisheva, V.R., Serdukova, N.A., Dobigny, G. et al. (2008) Phylogenomics of the dog and fox family (Canidae, carnivora) revealed by chromosome painting. *Chromosome Research*, 16(1), 129–143. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1203-5>
- Gustavson, C.R. & Nicolaus, L.K. (1987) Taste aversion conditioning in wolves, coyotes and other canids: retrospect and prospect. In: Frank, H. (Ed.) *Man and wolf: Advances, issues, and problems in captive wolf research*. Dordrecht, Netherlands: Dr. W. Junk Publishers, pp. 169–200.
- Halpern, M. & Martínez-Marcos, A. (2003) Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*, 70(3), 245–318. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00103-5)
- Halpern, M., Shapiro, L.S. & Jia, C. (1995) Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Research*, 677(1), 157–161. Available from: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00159-N](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00159-N)
- Hasui, K., Takatsuka, T., Sakamoto, R., Matsushita, S., Tsuyama, S., Izumo, S. et al. (2003) Double autoimmunostaining with glycine treatment. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 51(9), 1169–1176. Available from: <https://doi.org/10.1177/002215540305100907>
- Herrada, G. & Dulac, C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*, 90(4), 763–773. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80536-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80536-X)
- Ichikawa, M., Osada, T. & Ikai, A. (1992) *Bandeiraea simplicifolia* lectin I and *Vicia villosa* agglutinin bind specifically to the vomeronasal axons in the accessory olfactory bulb of the rat. *Neuroscience Research*, 13(1), 73–79. Available from: [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(92\)90035-B](https://doi.org/10.1016/0168-0102(92)90035-B)

- Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V.N. et al. (2011) Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature*, 478(7368), 241–245. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature10437>
- Iwanaga, T. & Nio-Kobayashi, J. (2020) Unique blood vasculature and innervation in the cavernous tissue of murine vomeronasal organs. *Biomedical Research*, 41(5), 243–251. Available from: <https://doi.org/10.2220/biomedres.41.243>
- Jacobs, V.L., Sis, R.F., Chenoweth, P.J., Klemm, W.R. & Sherry, C.J. (1981) Structures of the bovine vomeronasal complex and its relationships to the palate: tongue manipulation. *Cells, Tissues, Organs*, 110(1), 48–58. Available from: <https://doi.org/10.1159/000145412>
- Jawłowski, H. (1956) On the bulbus olfactorius and bulbus olfactorius accessorius of some mammals. *Lublin Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej Roczniki. Annls Dzialc Nauki Biologiczne*, 10, 67–86.
- Jezierski, T., Ensminger, J. & Papet, L.E. (2016) *Canine olfaction science and law: advances in forensic science, medicine*. S.L.: CRC Press.
- Jia, C. & Halpern, M. (2004) Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Morphology*, 259(3), 271–280. Available from: <https://doi.org/10.1002/jmor.10166>
- Kelliher, K.R., Baum, M.J. & Meredith, M. (2001) The Ferret's vomeronasal organ and accessory olfactory bulb: effect of hormone manipulation in adult males and females. *The Anatomical Record*, 263(3), 280–288. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.1097>
- Kohl, J., Autry, A.E. & Dulac, C. (2017) The neurobiology of parenting: a neural circuit perspective. *BioEssays*, 39(1), e201600159. Available from: <https://doi.org/10.1002/bies.201600159>
- Kondoh, D., Tanaka, Y., Kawai, Y.K., Mineshige, T., Watanabe, K. & Kobayashi, Y. (2021) Morphological and histological features of the vomeronasal organ in African pygmy hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Animals*, 11(5), 1462. Available from: <https://doi.org/10.3390/ani11051462>
- Kondoh, D., Tomiyasu, J., Itakura, R., Sugahara, M., Yanagawa, M., Watanabe, K. et al. (2020) Comparative histological studies on properties of polysaccharides secreted by vomeronasal glands of eight Laurasiatheria species. *Acta Histochemica*, 122(3), 151515. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151515>
- Kratzing, J. (1971) The structure of the vomeronasal organ in the sheep. *Journal of Anatomy*, 108(Pt 2), 247–260.
- Kunkhyen, T., McCarthy, E.A., Korzan, W.J., Doctor, D., Han, X., Baum, M.J. et al. (2017) Optogenetic activation of accessory olfactory bulb input to the forebrain differentially modulates investigation of opposite versus same-sex urinary Chemosignals and stimulates mating in male mice. *Eneuro*, 4(2), ENEURO.0010-17.2017. Available from: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0010-17.2017>
- Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Chamerio, P., Hendrix, P., Oboti, L., Schmid, A. et al. (2014) A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 34(15), 5121–5133. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0186-14.2014>
- Leinders-Zufall, T., Lane, A.P., Puche, A.C., Ma, W., Novotny, M.V., Shipley, M.T. et al. (2000) Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*, 405(6788), 792–796. Available from: <https://doi.org/10.1038/35015572>
- Levy, D.R., Sofer, Y., Brumfeld, V., Zilkha, N. & Kimchi, T. (2020) The nasopalatine ducts are required for proper pheromone signaling in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 585323. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.585323>
- Loo, S.K. & Kanagasunteram, R. (1972) The vomeronasal organ in tree shrew and slow loris. *Journal of Anatomy*, 112(Pt 2), 165–172.
- Macdonald, D.W., Campbell, L.A.D., Kamler, J.F., Marino, J., Werhahn, G. & Sillero-Zubiri, C. (2019) Monogamy: cause, consequence, or corollary of success in wild canids? *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 341. Available from: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00341>
- Mahdy, E., behery, E. & Mohamed, S. (2019) Comparative morpho-histological analysis on the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in Balady dogs (*Canis familiaris*) and New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(4), 506–515. Available from: <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f375>
- Malz, C.R., Knabe, W. & Kuhn, H.-J. (2000) Pattern of calretinin immunoreactivity in the main olfactory system and the vomeronasal system of the tree shrew, *Tupaia belangeri*. *The Journal of Comparative Neurology*, 420(4), 428–436. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000515\)420:4<428::AID-CNE2>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000515)420:4<428::AID-CNE2>3.0.CO;2-2)
- Matsunami, H. & Buck, L.B. (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 90(4), 775–784. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80537-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80537-1)
- McCotter, R.E. (1912) The connection of the vomeronasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other mammals. *The Anatomical Record*, 6(8), 299–318. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.1090060802>
- Mech, L.D. (1995) The challenge and opportunity of recovering wolf populations. *Conservation Biology*, 9(2), 270–278. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.9020270.x>
- Mechin, V., Pageat, P., Teruel, E. & Asproni, P. (2021) Histological and immunohistochemical characterization of vomeronasal organ aging in mice. *Animals*, 11(5), 1211. Available from: <https://doi.org/10.3390/ani11051211>
- Meisami, E. & Bhatnagar, K.P. (1998) Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique*, 43(6), 476–499. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981215\)43:6<476::AID-JEMT2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<476::AID-JEMT2>3.0.CO;2-V)
- Meredith, M. (1994) Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiology & Behavior*, 56(2), 345–354. Available from: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90205-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90205-4)
- Meredith, M., Marques, D.M., O'Connell, R.J. & Stern, F.L. (1980) Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science*, 207(4436), 1224–1226. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.7355286>
- Meredith, M. & O'Connell, R.J. (1979) Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *The Journal of Physiology*, 286(1), 301–316. Available from: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012620>
- Miodonski, R. (1968) Bulbus olfactorius of the dog (*Canis familiaris*). *Acta Biologica Cracoviensia*, 11, 65–76.
- Moawad, U.K., Awaad, A.S. & Abedellaah, B.A. (2017) Morphological, histochemical and computed tomography on the vomeronasal organ (Jacobson's organ) of Egyptian native breeds of goats (*Capra hircus*). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(2), 174–183. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.03.003>
- Mohrhardt, J., Nagel, M., Fleck, D., Ben-Shaul, Y. & Spehr, M. (2018) Signal detection and coding in the accessory olfactory system. *Chemical Senses*, 43(9), 667–695. Available from: <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy061>
- Mucignat, C. (2004) High-resolution magnetic resonance spectroscopy of the mouse vomeronasal organ. *Chemical Senses*, 29(8), 693–696. Available from: <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh073>
- Muñiz-de Miguel, S., Barreiro-Vázquez, J.D., Sánchez-Quinteiro, P., Ortiz-Leal, I. & González-Martínez, Á. (2023) Behavioural disorder in a dog with congenital agenesis of the vomeronasal organ and the septum pellucidum. *Veterinary Record Case Reports*, 11(2), e571. Available from: <https://doi.org/10.1002/vrc2.571>
- Nakajima, T., Sakaue, M., Kato, M., Saito, S., Ogawa, K. & Taniguchi, K. (1998) Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on

- the accessory olfactory bulb of the dog. *The Anatomical Record*, 252(3), 393–402. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199811\)252:3<393::AID-AR7>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199811)252:3<393::AID-AR7>3.0.CO;2-T)
- Navarro-Moreno, C., Sanchez-Catalan, M.J., Barneo-Muñoz, M., Gotteris-Cerisuelo, R., Belles, M., Lanuza, E. et al. (2020) Pregnancy changes the response of the vomeronasal and olfactory systems to pups in mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 593309. Available from: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.593309>
- Niven, J.E. & Laughlin, S.B. (2008) Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *Journal of Experimental Biology*, 211(11), 1792–1804. Available from: <https://doi.org/10.1242/jeb.017574>
- Oboti, L., Ibarra-Soria, X., Pérez-Gómez, A., Schmid, A., Pyrski, M., Paschek, N. et al. (2015) Pregnancy and estrogen enhance neural progenitor-cell proliferation in the vomeronasal sensory epithelium. *BMC Biology*, 13(1), 104. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0211-8>
- Ogura, T., Krosnowski, K., Zhang, L., Bekkerman, M. & Lin, W. (2010) Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. Koch, K.-W. ed. *PLoS One*, 5(7), e11924. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011924>
- Ortiz-Hidalgo, C. (2011) Abelardo Gallego (1879–1930) and his contributions to histotechnology: the Gallego stains. *Acta Histochemica*, 113(2), 189–193. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.09.010>
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., López-Callejo, L.N., Fidalgo, L.E., López-Beceiro, A. & Sanchez-Quinteiro, P. (2022) Comparative neuro-anatomical study of the main olfactory bulb in domestic and wild canids: dog, wolf and red fox. *Animals*, 12(9), 1079. Available from: <https://doi.org/10.3390/ani12091079>
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Vargas-Barroso, V., Fidalgo, L.E., López-Beceiro, A.M., Larriva-Sahd, J.A. et al. (2023) The olfactory limb of the red fox (*Vulpes vulpes*). New insights regarding a noncanonical olfactory bulb pathway. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16, 1097467.
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Villamayor, P.R., Fidalgo, L.E., López-Beceiro, A. & Sanchez-Quinteiro, P. (2022) Can domestication shape Canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, 240, 151881. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151881>
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Villamayor, P.R., López-Beceiro, A. & Sanchez-Quinteiro, P. (2020) The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *Journal of Anatomy*, 237(5), 890–906. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.13254>
- Osakada, T., Abe, T., Itakura, T., Mori, H., Ishii, K.K., Eguchi, R. et al. (2022) Hemoglobin in the blood acts as a chemosensory signal via the mouse vomeronasal system. *Nature Communications*, 13(1), 556. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28118-w>
- Pageat, P. & Gaultier, E. (2003) Current research in canine and feline pheromones. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(2), 187–211. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(02)00128-6)
- Peters, R.P. & Mech, L.D. (1975) Scent-marking in wolves. *American Scientist*, 63(6), 628–637.
- Petrucci, A. (2013) Chemosignals, hormones and mammalian reproduction. *Hormones and Behavior*, 63(5), 723–741. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.03.011>
- Powers, J.B. & Winans, S.S. (1975) Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science*, 187(4180), 961–963. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1145182>
- Prieto-Godino, L.L., Rytz, R., Bargeton, B., Abuin, L., Arguello, J.R., Peraro, M.D. et al. (2016) Olfactory receptor pseudo-pseudogenes. *Nature*, 539(7627), 93–97. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature19824>
- Prince, J.E.A., Cho, J.H., Dumontier, E., Andrews, W., Cutforth, T., Tessier-Lavigne, M. et al. (2009) Robo-2 controls the segregation of a portion of basal vomeronasal sensory neuron axons to the posterior region of the accessory olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 29(45), 14211–14222. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3948-09.2009>
- Ramakers, G.J.A., Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Margolis, F.L., Van Bergen En Henegouwen, P.M.P. & Gispen, W.H. (1992) Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in the mouse olfactory bulb: predominant presence in preterminal axons. *Journal of Neurocytology*, 21(12), 853–869. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01191683>
- Raymer, J., Wiesler, D., Novotny, M., Asa, C., Seal, U.S. & Mech, L.D. (1985) Chemical investigations of wolf (*Canis lupus*) anal-sac secretion in relation to breeding season. *Journal of Chemical Ecology*, 11(5), 593–608. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00988570>
- Raymer, J., Wiesler, D., Novotny, M., Asa, C., Seal, U.S. & Mech, L.D. (1986) Chemical scent constituents in urine of wolf (*Canis lupus*) and their dependence on reproductive hormones. *Journal of Chemical Ecology*, 12(1), 297–314. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01045612>
- Riddell, P., Paris, M.C.J., Joonè, C.J., Pageat, P. & Paris, D.B.B.P. (2021) Appeasing pheromones for the management of stress and aggression during conservation of wild canids: could the solution be right under our nose? *Animals*, 11(6), 1574. Available from: <https://doi.org/10.3390/ani11061574>
- Rodewald, A., Gisder, D., Gebhart, V.M., Oehring, H. & Jirikowski, G.F. (2016) Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 77, 19–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.04.002>
- Rothman, R.J. & Mech, L.D. (1979) Scent-marking in lone wolves and newly formed pairs. *Animal Behaviour*, 27, 750–760. Available from: [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(79\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(79)90010-1)
- Równiak, M. & Bogus-Nowakowska, K. (2020) The amygdala of the common shrew, Guinea pig, rabbit, fox and pig: five flavours of the mammalian amygdala as a consequence of clade-specific mosaic-like evolution. *Journal of Anatomy*, 236(5), 891–905. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.13148>
- Równiak, M., Bogus-Nowakowska, K., Kalinowski, D. & Kozłowska, A. (2022) The evolutionary trajectories of the individual amygdala nuclei in the common shrew, Guinea pig, rabbit, fox and pig: a consequence of embryological fate and mosaic-like evolution. *Journal of Anatomy*, 240(3), 489–502. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.13571>
- Ryba, N.J.P. & Tirindelli, R. (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron*, 19(2), 371–379. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80946-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80946-0)
- Salazar, I., Barber, P.C. & Cifuentes, J.M. (1992) Anatomical and immunohistological demonstration of the primary neural connections of the vomeronasal organ in the dog. *The Anatomical Record*, 233(2), 309–313. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.1092330214>
- Salazar, I., Cifuentes, J.M., Quinteiro, P.S. & Caballero, G. (1994) The vomeronasal system of the mink, *Mustela vison*. I. The vomeronasal organ. *Functional and Developmental Morphology*, 4(2), 113–117.
- Salazar, I., Cifuentes, J.M., Sánchez Quinteiro, P. & García Caballero, T. (1994) Structural, morphometric, and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. *The Anatomical Record*, 240(2), 277–285. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.1092400216>
- Salazar, I., Cifuentes, J.M. & Sánchez-Quinteiro, P. (2013) Morphological and immunohistochemical features of the vomeronasal system in dogs. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 296(1), 146–155. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.22617>
- Salazar, I., Lombardero, M., Cifuentes, J.M., Quinteiro, P.S. & Aleman, N. (2003) Morphogenesis and growth of the soft tissue and cartilage of

- the vomeronasal organ in pigs. *Journal of Anatomy*, 202(6), 503–514. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00183.x>
- Salazar, I., Quinteiro, P.S., Alemañ, N., Cifuentes, J.M. & Troconiz, P.F. (2007) Diversity of the vomeronasal system in mammals: the singularities of the sheep model. *Microscopy Research and Technique*, 70(8), 752–762. Available from: <https://doi.org/10.1002/jemt.20461>
- Salazar, I., Quinteiro, P.S. & Cifuentes, J.M. (1995) Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 177(5), 475–481. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(11\)80156-1](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(11)80156-1)
- Salazar, I., Quinteiro, P.S., Cifuentes, J.M. & Lombardero, M. (1998) The accessory olfactory bulb of the mink, *Mustela vison*: a morphological and lectin histochemical study. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 27(5), 297–300. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1998.tb00197.x>
- Salazar, I., Sánchez Quinteiro, P., Cifuentes, J.M., Fernández, P. & Lombardero, M. (1997) Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. *The Anatomical Record*, 247(1), 129–136. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199701\)247:1<129::AID-AR15>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199701)247:1<129::AID-AR15>3.0.CO;2-R)
- Salazar, I., Sanchez Quinteiro, P., Cifuentes, J.M. & Garcia Caballero, T. (1996) The vomeronasal organ of the cat. *Journal of Anatomy*, 188(Pt 2), 445–454.
- Salazar, I. & Sánchez-Quinteiro, P. (2009) The risk of extrapolation in neuroanatomy: the case of the mammalian accessory olfactory bulb. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3, 22. Available from: <https://doi.org/10.3389/neuro.05.022.2009>
- Salazar, I. & Sánchez-Quinteiro, P. (2011) A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microscopy Research and Technique*, 74(12), 1109–1120. Available from: <https://doi.org/10.1002/jemt.21002>
- Shinohara, H., Asano, T. & Kato, K. (1992) Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. *The Journal of Neuroscience*, 12(4), 1275–1279. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-04-01275.1992>
- Slotnick, B. (2001) Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(5), 216–222. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(00\)01625-9](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(00)01625-9)
- Smith, T.D., Alport, L.J., Burrows, A.M., Bhatnagar, K.P., Dennis, J.C., Tuladhar, P. et al. (2007) Perinatal size and maturation of the olfactory and vomeronasal neuroepithelia in lorisooids and lemurooids. *American Journal of Primatology*, 69(1), 74–85. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajp.20328>
- Smith, T.D., Dennis, J.C., Bhatnagar, K.P., Garrett, E.C., Bonar, C.J. & Morrison, E.E. (2011) Olfactory marker protein expression in the vomeronasal neuroepithelium of tamarins (*Saguinus* spp). *Brain Research*, 1375, 7–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.069>
- Smith, T.D., Garrett, E.C., Bhatnagar, K.P., Bonar, C.J., Bruening, A.E., Dennis, J.C. et al. (2011) The vomeronasal organ of New World monkeys (Platyrrhini). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 294(12), 2158–2178. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.21509>
- Smith, T.D., Muchlinski, M.N., Bhatnagar, K.P., Durham, E.L., Bonar, C.J. & Burrows, A.M. (2015) The vomeronasal organ of *Lemur catta*: *Lemur catta* VNO. *American Journal of Primatology*, 77(2), 229–238. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajp.22326>
- Stensmyr, M.C. (2016) Evolutionary genetics: smells like a pseudopseudogene. *Current Biology*, 26(24), R1294–R1296. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.006>
- Stohr, C. & Coimbra, E. (2013) The governance of the wolf-human relationship in Europe. *Review of European Studies*, 5(4), p1. Available from: <https://doi.org/10.5539/res.v5n4p1>
- Su, C.-Y., Menuz, K. & Carlson, J.R. (2009) Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell*, 139(1), 45–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.015>
- Suárez, R., Fernández-Aburto, P., Manger, P.R. & Mpodozis, J. (2011) Deterioration of the *Gao* vomeronasal pathway in sexually dimorphic mammals. Callaerts, P. ed. *PLoS One*, 6(10), e26436. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026436>
- Suárez, R. & Mpodozis, J. (2009) Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb (AOB) of *Octodon degus* (Rodentia: Hystricognathi). *Behavioural Brain Research*, 198(2), 306–312. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.009>
- Suárez, R., Santibáñez, R., Parra, D., Coppi, A.A., Abrahão, L.M.B., Sasahara, T.H.C. et al. (2011) Shared and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semiaquatic capybara: the AOB of capybaras and other caviomorphs. *Journal of Anatomy*, 218(5), 558–565. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01357.x>
- Suárez, R., Villalón, A., Künzle, H. & Mpodozis, J. (2009) Transposition and intermingling of *Gai2* and *Gao* afferences into single vomeronasal glomeruli in the Madagascan lesser tenrec *Echinops telfairi*. Iwaniuk, A. ed. *PLoS One*, 4(11), e8005. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008005>
- Takami, S. (2002) Recent progress in the neurobiology of the vomeronasal organ. *Microscopy Research and Technique*, 58(3), 228–250. Available from: <https://doi.org/10.1002/jemt.10094>
- Takigami, S. (2004) Morphological evidence for two types of mammalian vomeronasal system. *Chemical Senses*, 29(4), 301–310. Available from: <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh032>
- Takigami, S., Mori, Y. & Ichikawa, M. (2000) Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chemical Senses*, 25(4), 387–393. Available from: <https://doi.org/10.1093/chemse/25.4.387>
- Tomiyasu, J., Kondoh, D., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Haneda, S. & Matsui, M. (2018) Lectin histochemical studies on the olfactory gland and two types of gland in vomeronasal organ of the brown bear. *Acta Histochemica*, 120(6), 566–571. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.07.003>
- Tomiyasu, J., Kondoh, D., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Sasaki, M., Kitamura, N. et al. (2017) Morphological and histological features of the vomeronasal organ in the brown bear. *Journal of Anatomy*, 231(5), 749–757. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.12673>
- Tomiyasu, J., Korzekwa, A., Kawai, Y.K., Robstad, C.A., Rosell, F. & Kondoh, D. (2022) The vomeronasal system in semiaquatic beavers. *Journal of Anatomy*, 241(3), 809–819. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.13671>
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Ferreira, A., Rois, J.L. & Sanchez-Quinteiro, P. (2021) Neuroanatomical and Immunohistological study of the Main and accessory olfactory bulbs of the meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals*, 12(1), 91. Available from: <https://doi.org/10.3390/ani12010091>
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Ferreira, A., Rois, J.L. & Sanchez-Quinteiro, P. (2023) Immunohistological study of the unexplored vomeronasal organ of an endangered mammal, the dama gazelle (*Nanger dama*). *Microscopy Research and Technique*, 86(9), 1206–1233. Available from: <https://doi.org/10.1002/jemt.24392>
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I. & Sanchez-Quinteiro, P. (2023) Pheromone sensing in mammals: a review of the vomeronasal system. *Anatomia*, 2(4), 346–413. Available from: <https://doi.org/10.3390/anatomia2040031>
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P.R., Ferreira, A., Rois, J.L. & Sanchez-Quinteiro, P. (2020) The vomeronasal system of the newborn capybara: a morphological and immunohistochemical study. *Scientific Reports*, 10(1), 13304. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69994-w>

- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P.R., Ferreira, A., Rois, J.L. & Sanchez-Quintero, P. (2022) Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Structure and Function*, 227(3), 881–899. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02425-2>
- Tran, H., Chen, H., Walz, A., Posthumus, J.C. & Gong, Q. (2008) Influence of olfactory epithelium on mitral/tufted cell dendritic outgrowth. Hendricks, M. ed. *PLoS One*, 3(11), e3816. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003816>
- Tsunoda, M., Miyamichi, K., Eguchi, R., Sakuma, Y., Yoshihara, Y., Kikusui, T. et al. (2018) Identification of an intra- and inter-specific tear protein signal in rodents. *Current Biology*, 28(8), 1213–1223.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.060>
- Ubeda-Bañon, I., Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Saiz-Sanchez, D., de la Rosa-Prieto, C., Gutierrez-Castellanos, N. et al. (2011) Cladistic analysis of olfactory and vomeronasal systems. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 3. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00003>
- Vaccarezza, O.L., Sepich, L.N. & Tramezzani, J.H. (1981) The vomeronasal organ of the rat. *Journal of Anatomy*, 132(Pt 2), 167–185.
- Van Den Berghe, F., Paris, M.C., Sarnyai, Z., Vlamings, B., Millar, R.P., Ganswindt, A. et al. (2019) Dog appeasing pheromone prevents the androgen surge and may reduce contact dominance and active submission after stressful interventions in African wild dogs (*Lycaon pictus*). Umapathy, G. ed. *PLoS One*, 14(3), e0212551. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212551>
- Vedin, V., Eriksson, B. & Berghard, A. (2010) Organization of the chemosensory neuroepithelium of the vomeronasal organ of the Scandinavian moose *Alces alces*. *Brain Research*, 1306, 53–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.012>
- Verhaagen, J., Oestreicher, A., Gispén, W. & Margolis, F. (1989) The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *The Journal of Neuroscience*, 9(2), 683–691. Available from: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-02-00683.1989>
- Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Grillo, M., Khew-Goodall, Y.-S., Gispén, W.H. & Margolis, F.L. (1990) Neuroplasticity in the olfactory system: Differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein. *Journal of Neuroscience Research*, 26(1), 31–44. Available from: <https://doi.org/10.1002/jnr.490260105>
- Villamayor, P.R., Arana, Á.J., Coppel, C., Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Sanchez-Quintero, P. et al. (2021) A comprehensive structural, lectin and immunohistochemical characterization of the zebrafish olfactory system. *Scientific Reports*, 11(1), 8865. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88317-1>
- Villamayor, P.R., Cifuentes, J.M., Fdz-de-Troconiz, P. & Sanchez-Quintero, P. (2018) Morphological and immunohistochemical study of the rabbit vomeronasal organ. *Journal of Anatomy*, 233(6), 814–827. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.12884>
- Villamayor, P.R., Cifuentes, J.M., Quintela, L., Barcia, R. & Sanchez-Quintero, P. (2020) Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Structure and Function*, 225(1), 203–226. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01997-4>
- Wielgus, R.B. & Peebles, K.A. (2014) Effects of wolf mortality on livestock depredations. Bump, J. K. ed. *PLoS One*, 9(12), e113505. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113505>
- Wirobski, G., Range, F., Schaebs, F.S., Palme, R., Deschner, T. & Marshall-Pescini, S. (2021) Endocrine changes related to dog domestication: Comparing urinary cortisol and oxytocin in hand-raised, pack-living dogs and wolves. *Hormones and Behavior*, 128, 104901. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104901>
- Yohe, L.R., Hoffmann, S. & Curtis, A. (2018) Vomeronasal and olfactory structures in bats revealed by DiceCT clarify genetic evidence of function. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 32. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00032>
- Yohe, L.R. & Krell, N.T. (2023) An updated synthesis of and outstanding questions in the olfactory and vomeronasal systems in bats: genetics asks questions only anatomy can answer. *The Anatomical Record*, 306, 2765–2780. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.25290>
- Young, J.M. & Trask, B.J. (2007) V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends in Genetics*, 23(5), 212–215. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.004>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Barreiro-Vázquez, J.-D., López-Beceiro, A., Fidalgo, L., Shin, T. et al. (2024) The vomeronasal system of the wolf (*Canis lupus signatus*): The singularities of a wild canid. *Journal of Anatomy*, 00, 1–28. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.14024>

5. DISCUSIÓN

5.1 ÓRGANO VOMERONASAL EN EL ZORRO

Existe un asombroso nivel de diversidad entre los aspectos estructurales, morfológicos, funcionales y conductuales del SVN en mamíferos (Meisami y Bhatnagar 1998; Salazar y Sánchez-Quinteiro 2009), lo cual contrasta con la notable conservación demostrada para el SOP. El OVN se desarrolló evolutivamente para incrementar su especificidad entre diferentes especies, lo que resultó en una reducción de su capacidad para detectar una variedad más amplia de ligandos (Luo y Katz 2004). Los receptores EOP, sin embargo, pueden detectar una gama más amplia de olores pero carecen de la especificidad del OVN. Esta variabilidad también se refleja a nivel genético; las secuencias de los genes de los receptores EOP muestran una alta conservación, mientras que el OVN presenta una diversidad genética más amplia (Swaney y Keverne 2009). Debido a esta amplia variabilidad morfológica, la extrapolación interespecífica de información relativa a la anatomía e histología del SVN puede ser difícil y arriesgada (Salazar et al. 2007b).

Dentro de la familia Canidae, solo se han realizado estudios del OVN en el perro (Dennis et al. 2003; Salazar et al. 2013), a excepción de un estudio elemental sobre el OVN del zorro (*Vulpes vulpes*), realizado por Karimi et al. (2016). La aparente ausencia de receptores V2R (Takigami 2004; Salazar et al. 2013; Policarpo et al. 2024) en el perro se ha propuesto atribuida al proceso de domesticación, durante el cual la selección artificial indujo una involución del SVN en los individuos domesticados de la familia Canidae (Jeziński et al. 2016). Por lo tanto, investigar especies salvajes pertenecientes a la familia Canidae probablemente revelaría información valiosa sobre los efectos del proceso de domesticación en el SVN y aclararía las particularidades de este sistema dentro de la familia Canidae.

Características macroscópicas

La topografía del OVN observada en el zorro y en el lobo es similar a la descrita para el perro y otros ungulados domésticos, como la vaca o el caballo (Adams y Wiekamp 1984; Salazar et al. 1995). Sin embargo, la disposición del OVN en el zorro y en el lobo difiere de la descrita para Rodentia y Lagomorpha, que presentan OVN situados en una posición más dorsal dentro de la cavidad nasal y están soportados y encapsulados por el hueso vómer (Vaccarezza et al. 1981) y la apófisis palatina del hueso incisivo (Villamayor et al. 2018), respectivamente.

Las similitudes entre el perro, el lobo y el zorro también se observan al estudiar la comunicación del conducto vomeronasal con el exterior. Tanto en el perro como en el zorro y el lobo, así como en otros mamíferos, como los ungulados domésticos (vaca y caballo), esta comunicación se establece de forma indirecta, a través del conducto incisivo, que se comunica con el conducto vomeronasal a través del receso ventral de la cavidad nasal, por un extremo, y

con la cavidad oral, a través de la papila incisiva, por el otro (Adams y Wiekamp 1984; Salazar et al. 1997a). Esta morfología difiere de la observada en roedores o lagomorfos, en los que el conducto vomeronasal se abre directamente a la cavidad nasal, y el conducto incisivo comunica independientemente ambas cavidades (Salazar y Sanchez-Quinteiro 1998; Villamayor et al. 2018).

Varios autores han utilizado la morfología y extensión del cartílago vomeronasal, que forma la cápsula del OVN, como elemento de clasificación filogenética del SVN (Wöhrmann-Repenning 1984b; Meisami y Bhatnagar 1998). En mamíferos, se han observado tres modelos diferentes de cápsula vomeronasal: esta cápsula puede ser totalmente ósea, como en la rata o el ratón (Salazar y Sanchez-Quinteiro 1998b, 2003); en otras especies, como la chinchilla (Oikawa et al. 1994) o el conejo (Villamayor et al. 2018), la cápsula está compuesta por una mezcla de hueso y cartílago; y en especies como el gato o el perro (Salazar y Sánchez-Quinteiro 2011; Salazar et al. 2013), la cápsula está compuesta en su totalidad por cartílago. En el zorro y en el lobo, la cápsula está formada en su totalidad por cartílago, de forma similar a las de gatos y perros. Sin embargo, el cartílago en estas especies tiene forma de "J", que difiere de la forma predominante de "U" observada en el perro (Salazar et al. 1984).

Estudio histológico

El neuroepitelio del conducto, punto donde se reconocen las feromonas y las kairomonas, está morfológicamente menos desarrollado en el zorro en comparación con los roedores o el conejo (Luckhaus 1969; Zuri et al. 1998). En el zorro, este neuroepitelio se compone de tres capas fácilmente distinguibles: una capa basal, con células definidas y redondas, una capa de células neurorreceptoras y una capa de células sustentaculares. La definición de estas capas, junto con el desarrollo del neuroepitelio, guarda similitud con las observaciones reportadas previamente en perros por Salazar et al. (1984, 2013) y Dennis et al. (2003). La capa de células sustentaculares en el zorro está bien desarrollada, con una configuración celular de alta densidad. En comparación con la capa sustentacular del perro, esta capa está situada más apicalmente en el zorro (Adams y Wiekamp 1984; Salazar et al. 1984, 2013).

La ubicación del epitelio vomeronasal difiere mucho de la del EOP, que se encuentra en la cavidad nasal, lo que permite que los receptores olfativos estén expuestos directamente al ambiente exterior (Moran et al. 1982). Para ser funcional, el SVN debe poseer un medio que permita que las feromonas y las moléculas ambientales accedan a los receptores situados en el complejo mucomicrovilar del epitelio neurosensorial. El OVN proporciona componentes glandulares y vasculares (Salazar y Sanchez-Quinteiro 1998b), que facilitan una neurorrecepción eficiente, a través de mecanismos separados (Takami et al. 1994, 1995).

El componente glandular del OVN proporciona mucosidad al conducto, a través de la cual pueden difundirse las moléculas (Halpern & Martínez-Marcos, 2003). En el zorro se observan pocas glándulas en la porción central y media del órgano. Estas glándulas se hacen progresivamente más numerosas en las porciones caudales, donde se concentran en el parénquima medio, lo que indica una producción desigual de secreción glandular entre las secciones rostral y caudal del órgano.

Las tinciones con PAS y Azul Alcían permitieron caracterizar la naturaleza de las secreciones glandulares en el OVN del zorro, que eran PAS-positivas. Del mismo modo, en el perro, Kondoh et al. (2020) observaron que el contenido glandular es PAS-positivo. Sin embargo, en el zorro, las glándulas también eran AA-positivas. Llama por tanto la atención la doble naturaleza PAS- y AA-positiva de las glándulas vomeronasales en el zorro. Kondoh et al. (2020) observaron que las glándulas vomeronasales de casi todas las especies estudiadas del clado Laurasiatheria tienen una naturaleza doblemente ácida y neutra, excepto en Carnívora. Sin embargo, estas observaciones son algo controvertidas. Además de nuestras propias observaciones en el zorro, Tomiyasu et al. (2017) también encontraron glándulas PAS- y AA-positivas en el oso, mientras que en el gato y en el perro, Salazar et al. (1996b) y Kondoh et al. (2020), respectivamente, solo identificaron glándulas PAS-positivas.

Estas diferencias podrían deberse a la región del OVN estudiada, ya que la mayoría de los estudios sólo han evaluado la región central del OVN, donde hemos observado que la densidad de tejido glandular es mucho menor que en otras regiones. Otros estudios específicos que examinen la naturaleza de la secreción de las glándulas vomeronasales en carnívoros deberían ayudar a dilucidar esta cuestión.

Alrededor del conducto vomeronasal del zorro, se encontraron gran cantidad de vasos sanguíneos, tanto en el parénquima medial como lateralmente. En el perro, esta disposición era similar (Adams y Wiekamp 1984; Salazar et al. 1984, 2013). La abundante vascularización del OVN revela la importancia de su función eréctil y la relevancia de la bomba vomeronasal para la fisiología del sistema. Esta bomba, tal como afirman Broman (1921) y Meredith et al. (Meredith y O'Connell 1979; Meredith et al. 1980), es necesaria para transportar fluidos al interior del conducto vomeronasal, renovando su contenido mucoso, que contiene moléculas recibidas por el órgano.

El OVN tiene una doble inervación, compuesta por fibras mielínicas y amielínicas, estas últimas emergen de la convergencia de axones de células neuroreceptoras que se proyectan desde el epitelio sensorial medial del órgano. Estos nervios amielínicos ocupan una disposición dorsomedial en el parénquima, similar a las ubicaciones observadas en Carnívoros (Salazar 1996b; Salazar et al. 2013), ungulados (Salazar, Quinteiro, et al. 1997) y el conejo (Villamayor et al. 2018). En el zorro, llama la atención el número y grosor de estos haces nerviosos, dado el pequeño tamaño del órgano y el reducido grosor del neuroepitelio en esta especie, lo que sugiere que, a pesar de su pequeño tamaño, el OVN tiene una gran funcionalidad.

Expresión inmunohistoquímica de las subunidades alfa de las proteínas G

Los anticuerpos específicos contra la subunidad α de las proteínas Gi y Go permitieron identificar dos zonas diferentes dentro del BOA de la rata (Shinohara et al. 1992). Posteriormente, en 1995, Dulac y Axel identificaron genéticamente una familia de posibles receptores de feromonas que se expresaban en el OVN de la rata (Dulac y Axel 1995). Al poco tiempo, se identificó un segundo tipo de gen receptor vomeronasal (V2R) (Herrada y Dulac 1997; Ryba y Tirindelli 1997). Los estudios de expresión mostraron que los V1R y V2R en el neuroepitelio estaban distribuidos apical y basalmente, respectivamente. Finalmente se llegó a la conclusión de que la proteína Gi2 se expresa en la cascada de transducción de los V1Rs,

mientras que la proteína Gao se co-expresa con los V2Rs (Dulac y Axel 1995; Herrada y Dulac 1997; Matsunami y Buck 1997; Ryba y Tirindelli 1997).

Posteriormente, un examen de la expresión y distribución de la proteína G en el SVN de la cabra (Takigami et al. 2000), mostró, por primera vez, que en algunas especies, la vía Gao había desaparecido, lo que se confirmó posteriormente en diferentes mamíferos, incluyendo Laurasiatheria y Primates (Suárez et al. 2011b). Los pocos estudios sobre la expresión de proteínas G en el SVN de Carnivora han sido controvertidos. Dennis et al. (2003) observaron marcaje inmunopositivo en el epitelio neurosensorial utilizando anticuerpos anti-Gai2 y anti-Gao. En comparación con el hallazgo reportado por Takigami et al. (2000) en la cabra, Dennis et al. atribuyeron esta positividad inesperada a un efecto indeseable del procedimiento de recuperación antigénica, hipótesis que fue apoyada por el estudio posterior reportado por Salazar et al. (2013), quienes observaron, sin aplicar recuperación de antígeno, marcaje inmunonegativo al utilizar el anticuerpo anti-Gao. Por lo tanto, la inmunopositividad frente a la proteína Gao observada en el OVN del zorro es llamativa y de suma importancia porque puede ser análoga a la inmunopositividad observada en el perro por Dennis et al. (2003). Conscientes de la importancia de este hallazgo, y para confirmar este resultado, realizamos el estudio inmunoquímico de la expresión de la proteína Gao en el OVN del zorro utilizando dos anticuerpos anti-Gao diferentes y dos técnicas de fijación distintas: formol y líquido de Bouin. A pesar de no realizar ningún procedimiento de recuperación de antígeno, la inmunopositividad contra la proteína Gao persistió en todos los casos.

Aunque la caracterización inmunohistoquímica de Gao ha sido ampliamente considerada como un excelente indicador fenotípico de la expresión de V2R en el OVN, somos conscientes de que esta conclusión no está bien respaldada por los estudios genómicos actualmente disponibles, que asumen que los genes V2R funcionales han involucionado en muchos grupos de mamíferos, incluidos los carnívoros, mostrando una alta tasa de pseudogenización (Young y Trask 2007; Policarpo et al. 2024). No existe información específica con respecto a los genes V2R del zorro, excepto por el reciente primer intento de secuenciar y ensamblar el genoma del zorro rojo, en el que no se anotaron genes V2R funcionales ni pseudogénicos (Kukekova et al. 2018). Sin embargo, la ausencia completa de genes V2R representaría un caso único entre todos los mamíferos cuyos genes vomeronasales han sido estudiados, ya que incluso los primates, incluidos los humanos, y todos los Laurasiatheria poseen pseudogenes V2R. Incluso el perro, estrechamente emparentado con el zorro, posee 9 pseudogenes V2R. Es probable que nuevos estudios de secuenciación realizados en el zorro, en particular aquellos más centrados en los genes olfativos y vomeronasales, den lugar a la identificación de genes adicionales, que pueden añadirse al repertorio inicialmente anotado de genes vomeronasales y olfativos los cuales se detectaron utilizando un protocolo de genoma completo.

En cualquier caso, hay que ser cauto a la hora de trasladar los resultados de los estudios de secuenciación a términos neuroanatómicos. Un estudio reciente sobre la regresión del gen TRPC2 afirma: "Los resultados de nuestro estudio invitan a una investigación neuroanatómica más profunda en mamíferos para los que la función de sus OVN sigue siendo equívoca" (Zhang y Nikaido 2020). El alto grado de pseudogenización observado entre los receptores vomeronasales representa una cuestión sin resolver, que podría explicar las discrepancias

observadas entre la secuenciación y los estudios neuroanatómicos. Por ejemplo, se descubrió que un gen del receptor olfativo que contenía un codón de parada prematuro codificaba una proteína funcional, debido a una lectura traslacional eficiente (Prieto-Godino et al. 2016). Asimismo, estudios transcriptómicos han identificado la expresión de pseudogenes vomeronasales en el OVN del ratón (Oboti et al. 2015). Además, es probable que el creciente interés en los efectos olfativos de los ARN no codificantes largos y sus transcritos conduzca a una mejor comprensión de los procesos moleculares subyacentes a la olfacción (Camargo et al. 2019).

Finalmente, no podemos excluir la posibilidad de que la proteína *Gao* esté realizando funciones de contacto célula a célula en el neuroepitelio del zorro, no relacionadas con la transducción. Sin embargo, tal hallazgo representaría el primer caso de esta función en el neuroepitelio vomeronasal de un mamífero y no encaja con el patrón de inmunomarcaje detectado en el OVN del zorro, que se extiende a lo largo de los procesos dendríticos, el soma y los axones que forman los nervios vomeronasales. En cambio, el patrón de inmunomarcaje se correlaciona con el patrón típico observado en aquellas especies en las que ambas proteínas *G* están implicadas en la cascada de transducción (Halpern y Martínez-Marcos 2003).

El estudio del OVN del zorro reporta un hallazgo muy específico; por lo tanto, se deben realizar más estudios que examinen la expresión de los receptores de la familia *V2R*, incluyendo estudios inmunohistoquímicos y estudios de hibridación *in situ*, para determinar los patrones de expresión de estos receptores. Además, el estudio inmunohistoquímico del bulbo olfatorio accesorio del zorro, que hasta ese momento no había aún sido descrito, debería contribuir a esclarecer estas cuestiones.

En la observación de la expresión de las proteínas *Gai2* y *Gao* en roedores, como la rata, se observaron dos zonas distintas: una capa apical de células neurosensoriales, que era inmunopositiva a los anticuerpos anti-*Gai2*, y una capa basal, que era inmunopositiva a los anticuerpos anti-*Gao* (Halpern et al. 1998). En el zorro, al igual que en el conejo (Villamayor et al. 2018) se observaron para la inmunopositividad de ambas proteínas *G α* , patrones intercalados, que por tanto pueden estar asociados a la presencia de dos subpoblaciones distintas de células neurorreceptoras en el epitelio sensorial del OVN.

Aunque la inmunorreactividad de *Gao* está ausente de las microvellosidades del epitelio neurosensorial del zorro; el patrón encontrado en este estudio, que comprende inmunopositividad en el soma celular, los procesos dendríticos y los axones vomeronasales, es coherente con el patrón encontrado en todas las especies en las que esta inmunorreactividad se ha asociado con la transducción de *Gao*. Entre las especies en las que se ha excluido la inmunopositividad de *Gao* en el OVN, el inmunomarcaje está ausente de las dendritas, los somas y los axones vomeronasales, tal como se ha observado en la cabra (Takigami et al. 2000) y el gato (Salazar y Sánchez-Quinteiro 2011).

La detección de inmunomarcaje en botones dendríticos y microvellosidades epiteliales difiere entre estudios, probablemente debido a la variación en la densidad de receptores o a la sensibilidad de las técnicas utilizadas. Los estudios realizados por Dennis et al. (2003) en el perro, por Jia y Halpern (1996) en el ratón, y por Villamayor et al. (2018) en el conejo han demostrado que incluso cuando el inmunomarcaje *Gao* era claramente visible en los axones,

somas y dendritas, el marcaje era reducido en los botones dendríticos; sin embargo, el marcaje global G α o se consideró positivo en todos los casos. Por lo tanto, la identificación inmunohistoquímica de los botones dendríticos y las microvellosidades no es coincidente entre las especies, a diferencia del marcaje de los procesos dendríticos, los somas y los axones. Finalmente, los estudios ultraestructurales han confirmado que G α o en las neuronas se distribuye principalmente en los cuerpos celulares y el citoplasma neuronal, como se demostró en el estudio de localización ultraestructural descrito por Gabrion et al. (1989). En estudios ultraestructurales de OVN realizados en ratas, especie con una gran familia de neuroreceptores V1R y V2R, Matsuoka et al. (2001) describieron inmunomarcaje en arborizaciones dendríticas y microvellosidades, pero también observaron que una fracción de células receptoras no eran inmunopositivas para ningún subtipo de proteína G.

Otros marcadores histoquímicos e inmunohistoquímicos y lectinas

Adicionalmente, el OVN del zorro se estudió inmunohistoquímicamente con otros anticuerpos complementarios, tal como anticuerpos anti-CB, anti-CR, anti-GAP-43, anti-OMP y anti- α -tubulina, y se examinó histoquímicamente con la aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA), la aglutinina de *Lycopersicum esculentum* (LEA) y la isolectina de *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B₄).

Se utilizaron anticuerpos anti-CB y anti-CR para caracterizar componentes neuronales específicos, ya que muestran patrones de expresión distintos en el SVN de cada especie (Kishimoto et al. 1993; Jia y Halpern 2003). En el zorro, el anticuerpo anti-CB mostró un patrón de marcaje característico en el epitelio neurosensorial, revelando una subpoblación de células neuroreceptoras, principalmente en la porción basal del epitelio, con marcaje concentrado en el soma. Este patrón de marcaje es similar al observado con el anticuerpo anti-G α o. Del mismo modo, el anticuerpo anti-CR mostró un patrón de marcaje complementario al observado con el anticuerpo anti-CB y similar al observado con el anticuerpo anti-G α i2. Del mismo modo, el anticuerpo anti- α -tubulina mostró un patrón de marcaje único, que evoca los patrones observados para los anticuerpos anti-CB y anti-G α o. Curiosamente, CB y CR parecen estar menos ubicuamente expresadas en los tejidos examinados que las proteínas G, que son mediadoras de un amplio espectro de efectos intracelulares, incluyendo enzimas y canales iónicos (Wettschureck y Offermanns 2005). Por lo tanto, el inmunomarcaje de CR y CB mostró patrones más selectivos.

Además, nuestro estudio incluyó un inmunomarcaje con el anticuerpo anti-GAP43. El marcaje inmunopositivo observado en el OVN del zorro con este marcador, coincide con el marcaje inmunopositivo observado previamente por Dennis et al. (2003) en el perro. Este marcador sugiere que el SVN experimenta una intensa regeneración neuronal, que puede deberse al alto nivel de exposición del OVN a una variedad de sustancias en el medio ambiente, muchas de las cuales tienen el potencial de dañar las estructuras celulares (Ogura et al. 2010), lo cual se ha sugerido que se relaciona con la importancia del SVN para los comportamientos reproductivos (Osakada et al. 2018) y, por lo tanto, para la supervivencia de la especie.

Con el fin de protegerse contra la exposición a sustancias dañinas, el SVN cuenta con un mecanismo regulador capaz de controlar el acceso a estas sustancias. Este mecanismo se fundamenta en la presencia de células quimiosensoriales solitarias (CQS) a lo largo del tracto

respiratorio. Estas células especializadas están situadas en un lugar adecuado para detectar las sustancias químicas del entorno que puedan acceder al OVN. Las CQS están generalmente innervadas por el nervio trigémino y responden a una variedad de irritantes y sustancias amargas. Estas CQS desempeñan funciones clave en la regulación del acceso al OVN, limitando la entrada de estas moléculas potencialmente nocivas (Ogura et al. 2010).

Braun et al. (2011) describieron que estas CQS expresan receptores acoplados a proteínas G y descubrieron que estas células están presentes en la nariz humana. En nuestro estudio en el zorro, la detección positiva de receptores de proteína G se confirmó utilizando el anticuerpo anti-Gao para inmunomarcaje de células en los epitelios respiratorios tanto del OVN como de la mucosa respiratoria. Además, se realizó la tinción tricrómica de Gallego en estos epitelios, lo que proporcionó información sobre la morfología de estas células anti-Gao-positivas. La morfología, inmunorreactividad y localización de las células observadas en los epitelios del zorro coinciden en general con las descritas por Ogura et al. (2010) y Braun et al. (2011).

Empleando el anticuerpo anti-OMP, marcamos específicamente las proteínas OMP, que se expresan en neuronas maduras tanto en el EOP como en el SVN (Farbman y Margolis 1980; Rodewald et al. 2016). La información proporcionada por este marcador complementa la obtenida utilizando el anticuerpo anti-GAP43. Al igual que otros marcadores, el Anti-OMP ha sido ampliamente utilizado en la literatura para estudiar el SVN (Halpern et al. 1998), mostrando marcaje inmunopositivo tanto para el EOP como para el SVN en diferentes especies, como la rata (Weiler y Benali 2005) o el ratón (Monti-Graziadei et al. 1977).

En cuanto al marcaje histoquímico con lectinas, el patrón UEA observado en el zorro fue similar al observado en el perro (Salazar et al. 2013). En el sistema nervioso del perro, el marcaje UEA es específico del SVN (Salazar et al. 1992). La presencia de una especificidad similar en el zorro fue confirmada por el marcaje tanto del neuroepitelio como de los nervios. UEA es un marcador de la vía α -fucosa (Kondoh et al. 2017a). Por el contrario, LEA muestra un patrón de marcaje inespecífico en el epitelio vomeronasal, asociándose a otros componentes de la vía olfativa, incluidos los nervios olfativos y la mucosa olfativa. Esta observación concuerda con el estudio realizado en el OVN del perro (Salazar et al. 2013).

Los hallazgos presentados en este estudio ponen de relieve la importancia de la comunicación química en el zorro y las sutiles, pero significativas, diferencias entre las estructuras del OVN del zorro y el perro. Estas dos especies estrechamente emparentadas sólo divergieron hace aproximadamente 10 millones de años, dentro de la familia Canidae. Sin embargo, ocupan dos nichos ecológicos sustancialmente diferentes. Kukekova et al. (2018) plantearon que el zorro rojo puede ser un modelo extraordinariamente prometedor para el estudio de los fundamentos genéticos implicados en los comportamientos sociales, la domesticación, la genética y los comportamientos humanos. En definitiva, las diferencias entre el SVN del zorro y del perro sugieren que la domesticación, más allá de provocar cambios de comportamiento, puede influir directamente en ciertos rasgos morfofuncionales analizados en este estudio, como la doble expresión de las proteínas Gai2 y Gao.



Tras la exhaustiva descripción anatómica y morfofuncional aquí presentada, podemos concluir que el zorro posee un SVN bien desarrollado, con todos los componentes necesarios

para llevar a cabo la recepción y el reconocimiento de feromonas y otras señales implicadas en la comunicación química. Sin embargo, son necesarios más estudios anatómicos para caracterizar con mayor profundidad el SVN en esta especie y abordar el resultado imprevisto de este estudio, en lo que se refiere a la expresión de la proteína G α . Por ese motivo en posteriores etapas de esta tesis doctoral abordamos la caracterización de los patrones de expresión de las proteínas G en el BOA.

5.2 BULBO OLFATIVO ACCESORIO DEL ZORRO

Las contribuciones de Salazar et al. (1984, 1992, 1994b) demostraron por primera vez en el perro la relación inequívoca entre el presunto BOA -por ellos identificado- y el OVN. Su enfoque, basado en el marcaje histoquímico con lectinas, permitió diferenciar dos capas dentro del BOA: la capa periférica, que comprende fibras axonales y glomérulos bien definidos; y una capa interna más delgada, con neuronas dispersas que presentan núcleos grandes, de tinción pálida y nucleolos de tinción intensa, que se definieron como células mitrales. Además, no pudieron identificar con certeza una capa granular. Posteriormente, Nakajima et al. (1998) dividieron el BOA canino en tres capas: Las capas nerviosa y glomerular, que ocupaban la mayor parte del BOA, y una fina capa de células neuronales que contenía varios tipos de neuronas. La mayoría de estas neuronas presentaban un soma redondo u oval y parecían corresponder a células mitrales. Sólo se observaron dendritas primarias cortas de las células mitrales. Adicionalmente, sólo encontraron un pequeño número de células granulares, principalmente en la porción interna de la capa de células neuronales, contigua al pedúnculo olfativo.

Marcaje histológico e inmunohistoquímico del BOA del zorro

Con el objetivo de comprender mejor el BOA del zorro, tras la identificación macroscópica de un presunto BOA en una zona similar a la descrita por Jawlowski (1956), realizamos un estudio histológico e inmunohistoquímico seriado que permitió caracterizar la naturaleza morfofuncional del BOA. Nuestras observaciones de la textura microscópica del BOA del zorro contrastan con las descripciones microscópicas disponibles del BOA del perro. La característica más llamativa del BOA del zorro es su clara laminación, con capas claramente diferenciadas, incluyendo una capa glomerular muy desarrollada, rica en células periglomerulares, y una gran capa de células internas, equivalente tanto a la capa de células internas descrita por Salazar et al. (1992, 1994b) como a la capa de células neuronales descrita por Nakajima et al. (1998) pero más fácilmente discernible. A diferencia del BOA del perro, esta capa no es una lámina fina en el zorro, sino que aparece como una gran área que se proyecta hacia el interior de las capas superficiales del BOA. Esta observación fue especialmente evidente tras la tinción inmunohistoquímica, que pudo diferenciar claramente las dos capas externas, las capas nerviosa y glomerular, de la zona celular interna. La capa interna resultó inmunonegativa cuando se utilizaron anticuerpos frente a G α i2, OMP y GAP-43, mientras que las dos capas externas fueron inmunopositivas. Por el contrario, se observó un marcaje inmunopositivo utilizando los anticuerpos anti-G α o y anti-MAP-2 en las capas internas, mientras que las capas externas eran inmunonegativas. El fuerte marcaje obtenido en las dos capas superficiales frente a OMP, marcador de células vomeronasales maduras (Bock et al. 2009), y frente a GAP-43, uno de los marcadores mejor caracterizados de procesos neuronales en crecimiento y regeneración (Ramakers et al. 1992), indica una importante actividad en el

SVN del zorro entre las neuronas vomeronasales, tanto maduras como en regeneración. Las tinciones anti-CB y anti-CR también produjeron un inmunomarcaje intenso en las capas nerviosa y glomerular, lo que concuerda con la expresión encontrada en el OVN del zorro, tanto en el neuroepitelio como en el NVN de la lámina propia. Aunque la expresión de estos marcadores se ha observado en subpoblaciones de células neurorreceptoras (Ortiz-Leal et al. 2020), a nivel del BOA, estas neuronas no muestran segregación topográfica, integrando sus axones a lo largo del eje anteroposterior del BOA. La alta densidad de cuerpos celulares y fibras teñidas con anti-GFAP en la capa nerviosa, abarcando los glomérulos y la capa mitral-plexiforme del BOA del zorro contrasta con el escaso número de astrocitos encontrados en el BOA del perro (Salazar et al. 1994b) y recuerda al profuso marcaje observado en el bulbo olfatorio de la rata (Bailey y Shipley 1993). Este alto nivel de expresión de GFAP en el BOA del zorro sugiere una interacción neurona-glía muy activa, la cual está implicada en diversos procesos en adultos, como es el caso de la comunicación sináptica, la plasticidad, la homeostasis y la monitorización y alteración dinámica de la estructura y función del sistema nervioso central (Allen y Lyons 2018).

La expresión de MAP-2 es particularmente relevante porque puede utilizarse para identificar los somas de las células principales y los árboles dendríticos del BOA (Dehmelt y Halpain 2005; Villamayor et al. 2020). En contraste con el escaso número de células mitrales descrito en estudios previos del BOA canino, en el BOA del zorro se observaron numerosas células mitrales, distribuidas en paralelo a lo largo de una banda ancha y mostrando formas mitrales o elipsoidales, la cual constituye la capa mitral-plexiforme. Los anticuerpos frente MAP-2 y α -tubulina permitieron discriminar estas células mitrales y sus dendritas. Dado que las células mitrales son las principales neuronas de proyección del BOA, su alta densidad se refleja también en el desarrollo de las fibras del tracto que forman y que pudieron observarse mediante las tinciones de Tolivia y Bielschowsky. Estas fibras representan la contribución del BOA a la porción dorsal del tracto olfativo lateral, el cual discurre por debajo de las células granulares internas en el zorro, coincidiendo con la observación reportada por Switzer et al. (1980) en su extenso estudio comparativo del tracto olfativo lateral de los mamíferos.

Las células mitrales del BOA del zorro no sólo eran muy abundantes, sino que además presentaban morfologías variadas. Asimismo, el amplio desarrollo de la capa plexiforme, en la cual se distribuyen los árboles dendríticos de las células mitrales, resultó especialmente llamativo en comparación con el bajo número de células mitrales y el escaso desarrollo de la capa plexiforme descritos en el BOA del perro por Salazar et al. (1994b) y Nakajima et al. (1998). Podemos decir que la organización celular de la capa mitral-plexiforme del BOA del zorro es similar a la capa mitral plexiforme observada en el BOA de especies con máximo desarrollo del SVN, como la rata (Larriva-Sahd 2008) o el conejo (Villamayor et al. 2020). En la capa granular, tanto la tinción de Tolivia como la de Bielschowsky permitieron discriminar una extensa presencia de células granulares, que formaban agrupaciones entre las fibras del tracto olfativo lateral. Tanto en la capa granular como en la capa mitral plexiforme las tinciones anti-CB y anti-CR permitieron discriminar subpoblaciones neuronales. Sin embargo, no podemos comparar el zorro con el perro porque los anticuerpos anti-CR y anti-CB no se han utilizado en perros, aunque el patrón observado en el zorro es comparable al observado en el ratón y el conejo (Jia y Halpern 2004; Villamayor et al. 2020).

Marcaje histoquímico con lectinas del BOA del zorro

Nuestro reciente estudio del OVN del zorro nos permitió determinar la validez de utilizar las lectinas UEA-I y LEA como marcadores de receptores OVN en el neuroepitelio (Ortiz-Leal et al. 2020). Al ampliar este estudio del SVN del zorro a los NVN y al BOA, hemos determinado que la lectina LEA tiñe los NVN y los elementos nerviosos y glomerulares superficiales tanto del BOA como del BOP, mientras que UEA-I tiñe específicamente solo el NVN y el BOA. Este hallazgo demuestra la utilidad de la UEA-I como marcador específico de la vía vomeronasal del zorro y es idéntico al obtenido en el perro, en el que se obtuvo un patrón específico de los NVN similar mediante tinción con UEA-I (Salazar et al. 1994b).

Este resultado es aún más significativo si tenemos en cuenta que el patrón de marcaje de UEA-I en el SVN varía enormemente entre los diferentes tipos de mamíferos. También se ha demostrado que la UEA-I sirve como marcador específico de la vía vomeronasal (OVN, NVN y BOA) en ratones adultos (Salazar et al. 2001; Kondoh et al. 2017a), pero no marca el BOA en el conejo (Villamayor et al. 2020), la oveja (Salazar et al. 2000), y el corzo (Park et al. 2014). En otras especies, incluidas las ratas (Salazar y Sanchez-Quinteiro 1998a), los capibaras (Torres et al. 2020) y los cerdos (Salazar et al. 2000), la UEA-I marca tanto el BOP como el SVN.

El patrón de marcaje observado para LEA en el zorro coincide con el descrito para el perro (Salazar et al. 2013), sirviendo como marcador general tanto para la BOP como para el BOA. Este patrón de marcaje de LEA es común en una amplia gama de especies estudiadas, tan diversas como ratones, ovejas, cerdos, ciervos, conejos y capibaras (Salazar et al. 2000, 2001; Park et al. 2014; Torres et al. 2020; Villamayor et al. 2020). En general, estos hallazgos demuestran que el patrón de expresión de glicoconjugados detectado por ambas lectinas (L-fucosa para UEA-I y N-acetil- β -D-glucosamina para LEA) está altamente conservado en el SVN de cánidos.

Inmunohistoquímica de las proteínas G en el BOA del zorro

En este estudio hemos demostrado la inmunopositividad frente a las subunidades de la proteína G, G α 2 y G α o tanto en el epitelio neuroreceptor como en los axones vomeronasales del parénquima del OVN del zorro (Ortiz-Leal et al. 2020), lo que representa una diferencia importante respecto a lo observado en el OVN del perro. En perros, no se ha detectado la expresión de la proteína G α o (Salazar et al. 2013), a excepción del estudio reportado por Dennis et al. (2003) en el que los autores expresaron dudas sobre la validez del marcaje debido al uso de la recuperación antigénica. La positividad frente a G α o implicaría la expresión efectiva de receptores V2R en el OVN del perro, contradiciendo la incapacidad de identificar genes funcionales de la familia V2R en el genoma del perro (Young y Trask 2007) o del zorro (Kukekova et al. 2018).

Para explorar el papel desempeñado por las células neuroreceptoras G α o en el SVN del zorro, en primer lugar investigamos la expresión de G α o en el BOA del zorro. El inmunomarcaje anti-G α o fue negativo en las capas superficiales del BOA, lo que sugiere que los axones vomeronasales que se proyectan al BOA son G α o-negativos. Aunque las capas

internas del BOA son G α o-positivas, este hallazgo es común a todas las especies de mamíferos, ya que todo el bulbo olfativo, incluyendo tanto el BOA como el BOP, es G α o-inmunopositivo, excepto las capas nerviosa y glomerular del BOA que corresponden a las proyecciones de las células neuroreceptoras V1R, que son G α i2-positivas. Estos hallazgos sugieren que los axones G α o que surgen del OVN no se proyectan al BOA. Lamentablemente, una vez que estos axones abandonan el OVN y se integran en la submucosa nasal, resulta imposible diferenciarlos de los nervios olfativos porque G α o se expresa de forma ubicua tanto en los axones olfativos como en los vomeronasales en toda la lámina propia de la mucosa nasal (Wekesa y Anholt 1999).

Para comprender mejor el destino de estos axones, realizamos un estudio inmunohistoquímico y de lectinas en secciones transversales descalcificadas de la fosa etmoidal a un nivel rostral al BOA, que incluía tanto los axones olfativos como los vomeronasales en la superficie del BOP y en los cornetes etmoidales. A este nivel, los axones vomeronasales ya se han fusionado en un tronco de NVN que puede visualizarse utilizando lectinas e inmunomarcaje de proteínas G. Dado el carácter vomeronasal específico del marcaje con G α i2, este anticuerpo pudo utilizarse para diferenciar claramente las trayectorias de los NVN. Secciones seriadas consecutivas demostraron que estos axones eran G α o-inmunonegativos y LEA-positivos, sirviendo LEA como marcador universal de ambos sistemas olfativos. Estos resultados, por lo tanto, indican que los axones vomeronasales del zorro G α o siguen un destino hacia el bulbo olfativo que ocurre independientemente de los NVN, posiblemente convergiendo con los axones de los nervios olfativos para proyectarse a los glomérulos del BOP.

Hasta que no se establezca la identidad de los receptores asociados a las neuronas del OVN del zorro G α o-inmunopositivas, no se podrá determinar el verdadero carácter de estos receptores, ya sean vomeronasales u olfativos. Sin embargo, estudios electrofisiológicos en ratones han demostrado que una subpoblación de neuronas vomeronasales tiene la capacidad de percibir odorantes (Sam et al. 2001; Trinh y Storm 2003), y estudios transcriptómicos más recientes, como el de Ibarra-Soria et al. (2014) en ratones, han demostrado la expresión de receptores olfativos (RO) en el OVN. Un total de 17 genes RO se expresaron en el OVN a niveles superiores a la media del nivel de expresión de los genes del receptor vomeronasal. Por lo tanto, nuestro hallazgo de que las células neuroreceptoras del OVN del zorro, G α o-positivas, no proyectan al BOA podría apoyar la presencia de una vía directa desde el OVN al BOP, lo que sugiere la participación de áreas corticales superiores en la percepción y discriminación de olores mediada por el OVN.

Parece lógico pensar, por otra parte, que el procesamiento específico de la información procedente de las neuronas G α o del OVN pueda ocurrir a nivel de estructuras específicas del bulbo olfatorio, comparable a los glomérulos atípicos previamente identificados en roedores (Zimmerman y Munger 2021) o a los núcleos accesorios sub-bulbares del conejo (Villamayor et al. 2020). De hecho, nuestros estudios posteriores, incluidos en esta tesis doctoral, han demostrado en el zorro la presencia de glomérulos atípicos, donde es probable que se produzca el procesamiento de la información procedente de las neuronas G α o positivas en el neuroepitelio sensorial del OVN (Ortiz-Leal et al. 2023).

¿Puede la domesticación moldear la morfología del bulbo olfatorio accesorio de los Canidae?

Un experimento a largo plazo diseñado para reproducir la domesticación temprana de mamíferos en el zorro plateado hace de esta especie un modelo particularmente útil para estudiar los efectos de la domesticación en Canidae (Belyaev et al. 1985; Wang et al. 2018). La selección del zorro para domesticarlo o hacerlo apto para la domesticación provocó cambios en el comportamiento, la fisiología y la diversidad genética, similares a los observados en perros domésticos (Trut et al. 2009; Kukekova et al. 2018). La domesticación también ha dado lugar a cambios anatómicos sorprendentes, cuya naturaleza y fuentes de variación son intrigantes. En el sistema nervioso, se sabe que la domesticación afecta a los sistemas neurotransmisores del desarrollo (Popova 2006), sin embargo, los cambios neuromorfológicos que se producen tras la selección para la domesticación en el experimento de la granja de zorros rusos solo se han explorado recientemente de forma exhaustiva. Como resultado, se observó un cambio en el volumen de materia gris en las cepas mansas en relación con los zorros de granja convencionales, lo que sugirió que la selección por comportamiento puede influir en la morfología cerebral (Hecht et al. 2021).

Estos hallazgos presentan la posibilidad de que las sorprendentes diferencias estructurales observadas entre el BOA del perro y del zorro puedan ser en parte el resultado del proceso de domesticación. Hasta donde sabemos, esto representaría la primera prueba de que la domesticación y la selección artificial concertada actúan para dar forma a la base neuroanatómica del sistema olfativo accesorio. Es poco probable que las variaciones observadas puedan atribuirse a diferencias interespecíficas, ya que no existen ejemplos entre mamíferos pertenecientes a la misma familia que muestren divergencias tan notables en las configuraciones del OVN y el BOA.

Las diferencias anatómicas encontradas apoyan la hipótesis actual de que la domesticación del perro ha dado lugar a una involución del desarrollo olfativo asociado a la detección de feromonas y otros semioquímicos por el sistema olfativo accesorio (Jeziarski et al. 2016). Pruebas recientes sugieren que la pérdida de capacidad olfativa en los perros es el resultado de cambios relacionados con la domesticación en el SOP, que sirve de comparación morfológica. En concreto, Deborah Bird y Blaire Van Valkenburg examinaron la morfología de la placa cribiforme (PC) en 46 razas de perros y 2 cánidos salvajes, el coyote y el lobo gris, utilizando tomografías computarizadas de alta resolución y cuantificación digital, lo que reveló que los perros, incluso entre aquellas razas con capacidades olfativas bien reconocidas, tienen un área superficial de la PC, corregida en función del peso, reducida en comparación con el lobo y el coyote (Bird et al. 2021). Anteriormente, estos autores estudiaron todos los superórdenes de mamíferos y demostraron que el tamaño relativo de la PC está estrechamente correlacionado con el número de genes RO en el genoma de una especie, estableciendo el tamaño de la PC como una métrica para las expansiones o pérdidas evolutivas en los sistemas olfativos de los mamíferos (Bird et al. 2018). Estas diferencias podrían examinarse más a fondo para determinar los cambios morfológicos comparativos en el BOP de cánidos salvajes y domésticos.

En resumen, en este estudio hemos caracterizado morfofuncionalmente el BOA del zorro, proporcionando información útil para comprender el SVN de los cánidos salvajes. Este

detallado estudio histológico, inmunohistoquímico e histoquímico de lectinas demostró que el BOA del zorro presenta características únicas y un mayor grado de desarrollo morfológico, en comparación con el BOA del perro. Estos hallazgos morfofuncionales sugieren que en algún momento de la historia evolutiva del perro se produjo una disminución de la complejidad anatómica del sistema olfativo accesorio y abren una nueva vía de investigación para estudiar los efectos de la domesticación en las estructuras cerebrales.

5.3 LIMBO OLFATIVO DEL ZORRO

Las investigaciones previas sobre el BO se han centrado principalmente en el SOP y el SVN. Aunque hemos hecho avances sustanciales en nuestra comprensión de otros subsistemas, en particular en lo que respecta a la región glomerular en rosario, que consiste en un anillo de glomérulos interconectados que rodean el extremo caudal del BOP y el BOA anterior, la mayoría de las investigaciones se han realizado en ratas y ratones. La presencia y organización de los subsistemas olfativos en otros grupos de mamíferos sigue siendo una cuestión muy poco estudiada. Sin embargo, estudios neuroanatómicos del BOP y BOA comparando roedores de laboratorio con otros mamíferos, como lagomorfos (Villamayor et al. 2020), murciélagos (Frahm y Bhatnagar 1980), cánidos (Choi et al. 2010; Ortiz-Leal et al. 2022a), artiodáctilos (Park et al. 2014; Kondoh et al. 2017c), y primates (Alonso et al. 1998) han identificado diferencias sustanciales en su organización entre órdenes. Por lo tanto, en otras especies pueden existir subsistemas olfativos integrados no descritos, caracterizados por patrones morfológicos no canónicos, que deberían ser investigados en profundidad para comprender las diferencias interespecíficas en la fisiología olfativa a partir de una base morfológica sólida y fiable.

Nuestro abordaje de esta cuestión en el zorro ha aportado evidencias neuroanatómicas, inmunohistoquímicas y lectina-histoquímicas que apoyan la existencia de una región del limbo olfativo (LO) caracterizada por una organización anatómica y morfofuncional compleja la cual aparece de forma consistente en todos los individuos estudiados. Este hallazgo apoya la necesidad de investigaciones adicionales que exploren la organización de subsistemas olfativos potenciales como el LO en otras especies de mamíferos, incluidos los humanos, ya que hasta ahora no han sido bien definidos en la mayoría de los mamíferos.

Histología del limbo olfativo del zorro

El estudio histológico seriado del LO del zorro reveló la presencia de una compleja organización glomerular que se extiende a lo largo de la zona comprendida entre el extremo caudal del BOP y la extremidad anterior del BOA que se detectó en todos los animales examinados. Hasta donde sabemos, los estudios realizados por Miodonski (1968) y Nakajima et al. (1998) caracterizando el BO canino representan las únicas descripciones de una organización atípica similar en cánidos. Ambos autores describen una organización inusual en la zona de transición entre el BOA y el BOP que no se extendía más allá de una población de glomérulos atípicos, que Miodonski atribuyó al BOA y que Nakajima atribuyó al procesamiento de información procedente de un subconjunto de receptores olfativos por el BOP. Sin embargo, en nuestro estudio histológico seriado del zorro, identificamos una organización compleja que va más allá de la mera presencia de glomérulos atípicos, formada por estructuras que difieren de los glomérulos típicos, tanto en tamaño como en propiedades neuroquímicas y lectina-histoquímicas. Destacaba la presencia de agregados neuronales formados por grandes somas y prolongaciones nacientes que eran claramente visibles con la tinción de Nissl. Estos somas se

organizaban o bien como agregados compactos con una alta densidad neuronal, o bien dispersos a lo largo del complejo macrogglomerular (CMG), una formación nerviosa superficial de varios milímetros que consistía en un amplio neurópilo formado por haces de fibras nerviosas. La localización superficial del CMG y la presencia de múltiples somas neuronales en su interior parecen excluir la existencia de una relación directa con el tracto olfatorio lateral. La presencia de agrupaciones neuronales superficiales en el BO es sorprendente y, hasta nuestro conocimiento, no ha sido descrita previamente. Las descripciones existentes de formaciones glomerulares atípicas (Giannetti y Le Jeune 1996; Gómez et al. 2005) en el complejo glomerular en rosario (Ring et al. 1997; Luo 2008) y LO en roedores (Vargas-Barroso et al. 2017) no incluyen la presencia de agrupaciones superficiales de somas neuronales similares a las detectadas aquí.

Las formaciones sub-bulbares descritas por Larriva-Sahd (2012) en la rata, asociadas a la porción anterior del núcleo olfatorio anterior, y por Villamayor et al. (2020) en el conejo, asociadas al BOA pueden ser similares a los clústeres superficiales identificados en el presente estudio. Sin embargo, estas formaciones consisten en clústeres de neuronas grandes y poligonales, diferenciadas por su localización en la parte más profunda del BO caudal, directamente asociadas al núcleo olfatorio anterior y al tracto olfatorio lateral, al que incorporan sus axones.

Neuroquímica del limbo olfativo del zorro

El análisis inmunohistoquímico y de lectinas realizado en el presente estudio proporcionó un detallado retrato neuroquímico de las neuronas del LO y su neurópilo asociado. Tanto las somas como el neurópilo de los glomérulos atípicos fueron inmunopositivos para la subunidad de proteína G α , que se expresa ampliamente en el BO pero está ausente de las somas de las células mitrales del BOP del zorro. Esta característica diferencia los dos sistemas y excluye la posibilidad de que estas células representen agrupaciones ectópicas del BOP. También es significativa la extensa inervación UEA-positiva observada en el CMG mediante doble inmunohistoquímica. UEA es un excelente marcador histoquímico de α -fucosa (Kondoh et al. 2017a), que sirve como marcador de la vía vomeronasal en varias especies de mamíferos (por ejemplo, perros y cerdos) (Salazar et al. 1994b, 2000) y media en procesos que incluyen el aprendizaje y la memoria, el crecimiento de neuritas y la plasticidad sináptica (Matthies et al. 1996; Kalovidouris et al. 2005; Murrey et al. 2009). En nuestro estudio del BOA del zorro verificamos que la α -fucosa puede utilizarse como marcador de la vía de los NVN (Ortiz-Leal et al. 2022), y adicionalmente, las terminaciones nerviosas UEA-positivas se proyectan a una subpoblación de glomérulos atípicos en el LO, y grupos neuronales G α -positivos del CMG.

MAP-2 es un marcador útil para caracterizar los árboles dendríticos de las células mitrales y principales (Dehmelt y Halpain 2005) y no se expresa en los axones (Bernhardt y Matus 1984). La tinción anti-MAP-2 en el LO es, por tanto, una buena herramienta para caracterizar la morfología glomerular. Encontramos que los glomérulos atípicos se tiñen en el LO más intensamente para anti-MAP-2 que los glomérulos en el BOP y muestran una mayor diversidad morfológica. Un patrón similar se describió en un estudio morfométrico del complejo glomerular en rosario del ratón (Walz et al. 2007). Otra diferencia entre el LO y el BOP es la tinción MAP-2 más intensa en las somas del CMG en comparación con las somas de células mitrales en el BOP.

Las proteínas de unión al calcio se utilizan ampliamente como marcadores en el estudio del BO (Crespo et al. 1997; Defteralı et al. 2021). Los patrones de tinción revelaron diferencias neuroquímicas entre el LO y el BOP. Los glomérulos atípicos y los agregados neuronales en el LO se tiñeron intensamente tanto con CR como con CB, localizándose el marcaje tanto en las neuronas como en el neurópilo. Sin embargo, se observó poco marcaje en el neurópilo de los glomérulos del BOP, aunque las células periglomerulares eran inmunopositivas. Las abundantes células periglomerulares CB y CR inmunopositivas proximales a los glomérulos atípicos son similares a las descritas en el BO de la rata (Crespo et al. 1997). Llamativamente, las neuronas principales del LO eran inmunopositivas tanto para CB como para CR, a diferencia de las células mitrales del BOP de zorro. La ausencia de inmunoreactividad a CR en las células mitrales del BOP parece ser específica de los cánidos, ya que se ha descrito en perros (Choi et al. 2010), lobos y zorro (Ortiz-Leal et al. 2022a), pero no en otras especies como ratas (Wouterlood y Härtig 1995) o suricatas (Torres et al. 2021). La secretagoguina (SG) es una proteína fijadora de calcio descubierta más recientemente (Wagner et al. 2000) que ha sido menos estudiada en el bulbo olfatorio que la CR y la CB; sin embargo, se ha demostrado que la SG se expresa ampliamente en todas las capas del BO (Kosaka y Kosaka 2013; Pérez-Revuelta et al. 2020). En el zorro, este amplio patrón de inmunomarcaje de SG se conservó en el LO y BOP pero no en el BOA.

Correspondencias funcionales para el limbo olfativo del zorro

La inervación de los grupos neuronales del LO por fibras UEA-positivas establece un claro vínculo morfofuncional entre el LO y el SVN, ya que la UEA es un marcador altamente específico del SVN del zorro, marcando histoquímicamente el neuroepitelio del SVN, los NVN y las capas nerviosas y glomerulares del BOA. Además, se identificaron diferentes patrones neuroquímicos entre las células primarias del LO y las células mitrales del BOP mediante inmunomarcaje para MAP-2, CB y CR.

Estas observaciones morfológicas y neuroquímicas sugieren un posible vínculo funcional entre el LO y la extensa inmunoreactividad G α observada en el neuroepitelio del OVN del zorro (Ortiz-Leal et al. 2020). La posterior caracterización neuroquímica del BOA del zorro (Ortiz-Leal et al. 2022b) no detectó inmunorreactividad G α en la capa nerviosa del BOA, lo que sugiere que la información sensorial detectada por los receptores vomeronasales asociados a las neuronas G α -positivas se proyecta a un territorio bulbar diferente. La vinculación funcional del LO a través de las fibras UEA-positivas que se proyectan desde el OVN, el alto nivel de inmunoreactividad G α asociada al LO y la detección topográfica de axones G α -positivos en el LO y los NVN nos llevan a plantear la hipótesis de que el LO participa, al menos parcialmente, en el procesamiento de la información sensorial procedente de las células neuroepiteliales G α -positivas del OVN.

El vínculo entre el LO del zorro con el SVN y la ubicación estratégica del LO entre el BOA y el BOP sugieren que el LO del zorro puede estar involucrado en el procesamiento de estímulos específicos que indican señales sociosexuales intraespecíficas relevantes, similar a la funcionalidad sugerida para esta región en roedores de laboratorio (Weruaga et al. 2001; Leinders-Zufall et al. 2007; Larriva-Sahd 2012; Vargas-Barroso et al. 2017).

Nuestras observaciones no nos permiten determinar si el LO del zorro contiene estructuras glomerulares funcionalmente similares a las encontradas en el LO de los roedores: el complejo glomerular en rosario y el subconjunto de glomérulos "atípicos" con reactividad a la acetilcolinesterasa (AChE). Esta es una pregunta que aún está lejos de ser respondida, ya que la presencia de los subsistemas olfativos identificados en roedores que proyectan a ambas estructuras, incluyendo el ganglio de Grüneberg, el órgano septal y las neuronas quimiosensoriales GC-D+, no ha sido corroborada en el zorro ni en ningún otro cánido. El estudio de la expresión en el LO del zorro del antígeno placentario humano X-P2 (PAX), marcador de los glomérulos del complejo glomerular en rosario de los roedores, y de la acetilcolinesterasa, característica de los glomérulos atípicos, podría arrojar luz sobre esta cuestión.

No obstante, el gran desarrollo del LO del zorro, tanto en términos de dimensiones como de complejidad estructural, y la notablemente alta concentración de somas neuronales, localizados en la capa más superficial del bulbo, proximal a la superficie pial, sugieren que el LO del zorro es una estructura de mayor complejidad e importancia funcional que el complejo del collar o el subconjunto de glomérulos atípicos descritos en roedores.

Domesticación de los cánidos y morfología del limbo olfativo

El alto grado de desarrollo y complejidad estructural y neuroquímica que se observa en el LO del zorro no se ha descrito en el perro, que es el cánido mejor estudiado. Únicamente los estudios de Miodonski (1968) y Nakajima (1998) indican la presencia de organizaciones glomerulares atípicas en el perro. Sin embargo, ninguno de estos estudios describió un nivel de complejidad estructural o neuroquímica en el perro comparable al observado en el zorro.

Tal como hemos comentado, el zorro representa un modelo excepcional para investigar los impactos de la domesticación en cánidos debido a los experimentos a largo plazo destinados a replicar la domesticación temprana de esta especie (Belyaev et al. 1985; Wang et al. 2018). La selección para la domesticación dio lugar a cambios similares en el comportamiento, la fisiología y la diversidad genética de los zorros a los observados en los perros domesticados (Trut et al. 2009; Kukekova et al. 2018).

Nuestros estudios previos del SVN del zorro indicaron la presencia de diferencias estructurales llamativas entre el BOA del perro y del zorro, que según nuestra hipótesis podrían ser en parte el resultado del proceso de domesticación (Ortiz-Leal et al. 2020; Ortiz-Leal et al. 2022b). La teoría actual es que la domesticación de los perros ha dado lugar a una involución del desarrollo olfativo asociado a la detección de feromonas y otros semioquímicos (Jeziarski et al. 2016), lo que se ve respaldado por las diferencias anatómicas en el LO del zorro y las descripciones actualmente disponibles del BO del perro.

5.4 ÓRGANO VOMERONASAL EN EL LOBO

Adicionalmente al estudio del sistema olfativo del zorro, en este trabajo se estudió otra especie de cánido salvaje, el lobo ibérico (*Canis lupus signatus*), una especie emblemática de gran importancia ecológica y significado cultural, con un papel crucial en la dinámica de los ecosistemas. Sorprendentemente, hasta el momento, la exploración de las características

neuroanatómicas de su SVN ha sido limitada. Únicamente la investigación sobre el SVN en perros domésticos ha experimentado un crecimiento sustancial en la última década, destacando su papel crucial en la conformación de los comportamientos socio-sexuales de los caninos domésticos (Muñiz-de Miguel et al. 2023), así como su posible implicación en condiciones patológicas que conducen a cambios de comportamiento significativos (Asproni et al. 2016). En consecuencia, el interés clínico por este sistema sensorial ha aumentado considerablemente (Pageat y Gaultier 2003; Dzięcioł et al. 2020).

Por el contrario, una de las principales limitaciones de la bibliografía existente es la escasez de investigaciones sobre cánidos salvajes o asilvestrados. Sólo hay unas pocas excepciones notables, como el estudio de Chengetanai et al. (2020), que investigaron la neuroanatomía del BOA del perro salvaje africano como parte de su investigación más amplia del sistema olfativo en esta especie. Nuestros estudios en el sistema olfativo del zorro han revelado considerables diferencias anatómicas y funcionales al comparar zorros salvajes con sus homólogos domésticos. Sorprendentemente, estos estudios en zorros han identificado características específicas en la estructura y neuroquímica del OVN (Ortiz-Leal et al. 2020), el BOA (Ortiz-Leal et al. 2022b) y la zona de transición comúnmente denominada limbo olfativo (Ortiz-Leal et al. 2023).

Estudio macroscópico del OVN del lobo

Empleamos tanto la anatomía macroscópica en secciones transversales como la tomografía computarizada para delinear meticulosamente las relaciones topográficas y las características macroscópicas del OVN del lobo. El uso de la TC para caracterizar la anatomía del OVN ha sido relativamente limitado, con sólo un pequeño número de estudios dedicados a esta área específica. La investigación previa se ha restringido en gran medida a cabras (Moawad et al. 2017), camellos (Alsafy et al. 2014), murciélagos (Yohe et al. 2018) y ratones (Mucignat 2004; Levy et al. 2020). En el caso de los ratones, los investigadores han empleado en sus estudios técnicas de resonancia magnética de alta resolución y micro-TC. Nuestros resultados corroboran el posicionamiento bilateral del OVN del lobo en las regiones más rostrales y ventrales de la cavidad nasal. Se sitúa lateralmente al hueso vómer y ventralmente al cartílago del tabique nasal, ocupando predominantemente la cara interna de la fisura palatina. Nuestras secciones anatómicas seriadas ilustran cómo el OVN está muy adaptado a los contornos de la cavidad nasal, lo que refuerza la idea de que su ubicación estratégica puede optimizar su eficacia funcional. Este posicionamiento facilita la comunicación a través del conducto incisivo, conectando el órgano con el entorno externo a través de las cavidades nasal y oral. Esto sugiere una compleja interacción entre estas dos cavidades, lo que podría permitir una entrada sensorial multimodal para el lobo.

Dada su intrincada ubicación y el recubrimiento completo de la cápsula cartilaginosa del OVN por la mucosa respiratoria de la cavidad nasal, la visualización del órgano resulta complicada tanto in vivo como post mortem. La presencia del nervio nasal caudal mielinizado en el extremo más caudal del OVN sirve como indicador fiable de su localización. Además, se observó que las fibras del nervio vomeronasal discurrían en dirección caudo-dorsal, lo que indica una vía neuroanatómica integrada con el SOP. La cápsula cartilaginosa envuelve casi por completo el parénquima del OVN, excepto su parte dorsolateral. Este patrón es similar al descrito en otros carnívoros como perros (Salazar et al. 2013), zorros (Ortiz-Leal et al. 2020),

hurones (Kelliher et al. 2001), visones (Salazar et al. 1994a) y osos (Tomiyasu et al. 2017). Sin embargo, es algo menos extensa en comparación con la encapsulación completa observada en felinos (Salazar et al. 1995).

Características histológicas del OVN del lobo

Nuestro análisis histológico del OVN revela una microanatomía compleja esencial para comprender sus posibles funciones fisiológicas y de comportamiento. La estructura cartilaginosa en forma de U que encapsula el tejido blando cumple una función crucial: impide que el tejido blando se colapse bajo la presión negativa generada por el mecanismo de bombeo vomeronasal diseñado para la ingesta de feromonas (Meredith y O'Connell 1979; Meredith et al. 1980; Meredith 1994). La presencia de una compleja red venosa dentro del OVN del lobo es un hallazgo digno de mención. Aunque este rasgo también es característico del OVN en perros y gatos (Salazar et al. 1997b, 2013), todos los especímenes de lobo que estudiamos presentaban un desarrollo más avanzado del componente vascular. Esto es particularmente evidente en el predominio de grandes venas musculares localizadas en las regiones dorsales y laterales del órgano. Esta preponderancia venosa desempeña un papel crucial en el funcionamiento de la bomba vascular. Cuando estas estructuras vasculares dentro del tejido blando se contraen, el lumen del conducto vomeronasal se expande, creando un efecto de vacío que aspira las moléculas químicas. A la inversa, la dilatación vascular hace que el conducto se contraiga, lo que provoca la expulsión de su contenido, tal y como describe Eccles (1982). Recientemente, se ha demostrado la implicación de las fibras musculares lisas del parénquima del órgano en la generación de movimientos de contracción y dilatación del parénquima, responsables del funcionamiento de la bomba (Hamacher et al. 2024). Se desconoce si ambos sistemas actúan de forma coordinada o independientemente.

La presencia limitada y el tamaño reducido de las arterias en el OVN pueden sugerir que el órgano no requiere un elevado suministro de sangre oxigenada para su función principal de quimiorrecepción. Esto podría implicar un mecanismo de eficiencia energética, en el que el órgano funciona de forma óptima sin necesidad de un flujo sanguíneo sustancial, lo que posiblemente refleje adaptaciones evolutivas que priorizan la eficiencia en los órganos sensoriales (Niven y Laughlin 2008).

Además, nuestras observaciones de capilares sanguíneos en el neuroepitelio del órgano sugieren la presencia de mecanismos que mejoran la eficacia del suministro de nutrientes y gases al OVN. Curiosamente, estos capilares están en contacto directo con la capa neurorreceptora, lo que suscita especulaciones sobre la posibilidad de un olfato hematógeno (Bednar y Langfelder 1930). Aunque este paradigma olfativo no está definitivamente probado, recientes hallazgos indican que el OVN sirve como sensor crítico para la hemoglobina en roedores (Osakada et al. 2022). Los capilares intraepiteliales han sido caracterizado previamente en ratas (Breipohl et al. 1981), una especie con un epitelio notablemente grueso que requiere un suministro sustancial de sangre. Por el contrario, no se han descrito vasos sanguíneos intraepiteliales en especies con un neuroepitelio compuesto por unos pocos estratos celulares, como es el caso de los lémures (Smith et al. 2007, 2015), las musarañas arborícolas, los loris perezosos (Loo y Kanagasunteram 1972), ciertos primates (Smith et al. 2011) y los murciélagos (Bhatnagar y Meisami 1998; Bhatnagar y Smith 2007). La presencia de estos capilares intraepiteliales en lobos, una especie con un número significativamente menor de

células neurorreceptoras en comparación con los roedores, es bastante sorprendente. Hasta donde sabemos, ninguna descripción del OVN del perro hace referencia a la presencia de dichos capilares intraepiteliales (Dennis et al. 2003; Salazar et al. 2013). Este hecho podría representar una distinción morfológica importante, que podría reflejarse en las capacidades funcionales del OVN de ambas especies.

La interacción del conducto vomeronasal con el medio externo demuestra notables similitudes entre nuestros hallazgos en series histológicas descalcificadas en lobos y lo descrito en perros (Adams y Wiekamp 1984; Salazar et al. 2013). Esta comunicación indirecta en la que interviene el conducto incisivo también es evidente en otros cánidos como los zorros (Ortiz-Leal et al. 2020), visones (Salazar et al. 1994a) y osos (Tomiyasu et al. 2017), así como en mamíferos de otros órdenes como vacas (Jacobs et al. 1981), alces (Vedin et al. 2010) y erizos (Kondoh et al. 2021). Un extremo del conducto incisivo se comunica con el conducto vomeronasal a través del receso ventral de la cavidad nasal, mientras que su otro extremo se conecta con la cavidad oral a través de la papila incisiva. Esta configuración anatómica distingue a estas especies de los roedores y los lagomorfos. En estos últimos grupos, el conducto vomeronasal se abre directamente en la cavidad nasal, y el conducto incisivo sirve de enlace independiente entre ambas cavidades (Vaccarezza et al. 1981; Villamayor et al. 2018).

El tejido glandular, relativamente escaso, se encuentra concentrado cerca de las comisuras ventrales y sobre todo dorsales, y parece desempeñar un papel especializado en la secreción o absorción, manteniendo así un entorno mucoso continuo dentro del conducto vomeronasal (Halpern y Martínez-Marcos 2003). En los lobos, al igual que en los perros (Kondoh et al. 2020) y zorros (Ortiz-Leal et al. 2020), se observan unas pocas glándulas en las porciones central y medial del órgano, y su número aumenta progresivamente hacia las porciones caudales. Utilizando las tinciones PAS y Azul Alcian, pudimos caracterizar la naturaleza de las secreciones glandulares en el OVN del lobo como PAS- y AA-positivas. Esta naturaleza dual de glándulas vomeronasales PAS- y AA-positivas también se ha observado en zorros (Ortiz-Leal et al. 2020). Por el contrario, Kondoh et al. (2020) concluyeron que las glándulas vomeronasales de los perros eran únicamente PAS-positivas. En el caso de otras especies de carnívoros, Tomiyasu et al. (2018) identificaron glándulas PAS y AA-positivas en osos. Mientras tanto, Salazar et al. (1996b) y Kondoh et al. (2020) identificaron únicamente glándulas PAS-positivas en gatos y perros, respectivamente. Estas variaciones pueden atribuirse a la región específica del OVN estudiada, ya que la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en su región central, donde hemos observado una menor densidad de tejido glandular. Se espera que futuras investigaciones que examinen la naturaleza de la secreción de las glándulas vomeronasales a lo largo de todo el eje del OVN del perro aporten más datos sobre esta cuestión.

Otras características histológicas del OVN del lobo se asemejan mucho a la información disponible en el perro. En concreto, el abundante tejido conjuntivo que se encuentra a lo largo de todo el OVN del lobo desempeña probablemente un papel vital en el mantenimiento de la integridad estructural. Este tejido actúa como un andamiaje, preservando la intrincada microanatomía esencial para las funciones especializadas del OVN (Takami 2002). Además, la identificación de dos tipos distintos de fibras nerviosas en el OVN -mielínicas y amielínicas- es una característica compartida entre ambas especies. Estos tipos de fibras están relacionados

respectivamente con la percepción sensorial y el control autónomo de los vasos sanguíneos y las glándulas (Iwanaga y Nio-Kobayashi 2020).

Características inmunohistoquímicas del OVN del lobo

La caracterización inmunohistoquímica del OVN del lobo revela patrones de expresión distintivos para varias subunidades de proteína G y marcadores neuronales, incluyendo calbindina, calretinina, OMP y GAP-43. Estos marcadores sirven como indicadores de diversos papeles funcionales y etapas de desarrollo dentro de las células neurorreceptoras del OVN.

De particular importancia es el análisis inmunohistoquímico que emplea anticuerpos específicos dirigidos a las subunidades alfa de las proteínas Gi2 y Go. Esta importancia se ve reforzada por estudios tanto neuroquímicos (Shinohara et al. 1992) como genómicos (Dulac y Axel 1995; Herrada y Dulac 1997; Matsunami y Buck 1997; Ryba y Tirindelli 1997) en roedores, que asocian sistemáticamente la proteína G α i2 con la expresión de la familia de receptores V1Rs en el SVN, mientras que la proteína G α o está vinculada a la familia V2Rs. Investigaciones posteriores han revelado la ausencia de la vía G α o en diversos mamíferos, incluyendo tanto Laurasiatheria como Primates (Takigami et al. 2000; Suárez, Fernández-Aburto, et al. 2011). Sin embargo, los estudios centrados en la expresión de proteínas G en el SVN de Carnivora han sido un punto de debate.

Tal como comentamos anteriormente, Dennis et al. (2003), mostraron un marcaje inmunopositivo en el epitelio neurosensorial del OVN del perro utilizando anticuerpos anti-G α i2 y anti-G α o, aunque para ellos podría haber sido una consecuencia no intencionada del proceso de recuperación antigénica. Esta teoría ganó más credibilidad en un estudio posterior de Salazar et al. (2013) quienes describieron un marcaje inmunonegativo utilizando el anticuerpo anti-G α o cuando no se aplicó la recuperación antigénica. Sin embargo, descubrimientos más recientes confirmaron la presencia de inmunorreactividad de la proteína G α o en el neuroepitelio OVN del zorro (Ortiz-Leal et al. 2020) y en los nervios vomeronasales de la mucosa nasal y la placa cribiforme (Ortiz-Leal et al. 2022b). Este inesperado patrón de expresión en el zorro se ha confirmado ahora también en otro cánido salvaje, el lobo. En concreto, el anticuerpo anti-G α o marcó principalmente neuronas localizadas en las capas basales del neuroepitelio vomeronasal. Estas células marcadas se encontraban en la proximidad de capilares intraepiteliales, lo que sugiere su posible implicación en interacciones vasculares o en la olfacción hematógena. Por el contrario, las células marcadas por el anticuerpo anti-G α i2 estaban situadas en la zona central del epitelio y no mostraban ninguna asociación discernible con los capilares intraepiteliales.

Aunque la identificación inmunohistoquímica de G α o se considera a menudo un marcador fiable de la expresión de V2R en el OVN, esta noción no está totalmente corroborada por los estudios genómicos existentes (Young y Trask 2007). Sin embargo, traducir los hallazgos genómicos en hechos neuroanatómicos presenta retos debido al desajuste entre los aspectos genéticos y morfológicos en los sistemas quimiosensoriales. Para salvar esta brecha, es esencial una mayor investigación morfológica, especialmente centrada en las regiones cerebrales, glándulas y conductos asociados (Yohe y Krell 2023). La prevalencia de pseudogenes entre los receptores vomeronasales suscita preguntas y puede explicar la discrepancia entre los datos de secuenciación y las observaciones anatómicas. Esta complejidad

queda ejemplificada por un gen receptor olfativo que, a pesar de tener un codón de parada prematuro, codifica una proteína funcional mediante una eficiente lectura traslacional (Prieto-Godino et al. 2016; Stensmyr 2016). Además, estudios transcriptómicos han identificado la expresión de pseudogenes vomeronasales en el OVN del ratón (Oboti et al. 2015; Dietschi et al. 2022).

La idea de que la proteína Gao pueda desempeñar un papel en la señalización intercelular dentro del neuroepitelio del lobo sigue siendo una posibilidad. Sin embargo, este papel no se ha confirmado en el neuroepitelio vomeronasal de los mamíferos. Además, esta hipótesis no se alinea con el patrón de inmunomarcaje de Gao en el OVN del lobo, que se extienden a través de procesos dendríticos, cuerpos celulares y axones que forman los nervios vomeronasales, un patrón que es consistente con que ambas proteínas G estén involucradas en mecanismos de transducción (Mohrhardt et al. 2018).

La presencia de ambas proteínas Gai2 y Gao en los epitelios sensoriales del OVN del lobo y el zorro diverge de la expresión aislada de la proteína Gai2 en otros carnívoros como perros y gatos (Salazar y Sánchez-Quinteiro 2011; Salazar et al. 2013). Esto plantea preguntas intrigantes sobre el impacto de la domesticación. La ausencia de expresión de la proteína Gao en el SVN de animales domésticos, como cabras (Takigami et al. 2000), ovejas (Salazar et al. 2007), perros (Salazar et al. 2013) y gatos (Salazar y Sánchez-Quinteiro 2011) ha llevado a la hipótesis de que la domesticación puede haber contribuido a la degeneración del SVN (Jeziarski et al. 2016).

Para el examen inmunohistoquímico del OVN se emplearon una serie de anticuerpos adicionales, como anti-CB, anti-CR, anti-GAP-43 y anti-OMP. Los anticuerpos anti-CB y anti-CR se utilizan frecuentemente para caracterizar subpoblaciones neuronales, revelando perfiles de expresión únicos en el SVN en diversas especies (Bastianelli y Pochet 1995; Malz et al. 2000; Briñón et al. 2001). En el caso de los lobos, el anticuerpo anti-CB demostró un patrón de inmunomarcaje distinto dentro del epitelio sensorial, destacando un subconjunto de células neurorreceptoras localizadas predominantemente en las capas más profundas del epitelio. El marcaje estaba más concentrado en los cuerpos celulares y menos en las prolongaciones dendríticas. Por el contrario, el anticuerpo anti-CR produjo un marcaje complementario al del anticuerpo anti-CB, dirigido a los somas situados más superficialmente dentro de la capa epitelial. En particular, los botones dendríticos de estas neuronas tenían forma de bulbo y estaban fuertemente teñidos.

El anticuerpo anti-GAP43, empleado para identificar neuronas en proceso de desarrollo axonal y sinaptogénesis (Verhaagen et al. 1989; Gispen et al. 1991; Ramakers et al. 1992), mostró un patrón de marcaje intenso y generalizado. Este patrón coincide con los hallazgos observados tanto en zorros (Ortiz-Leal et al. 2020) como en perros (Dennis et al. 2003) lo que sugiere un proceso activo de regeneración neuronal dentro del epitelio sensorial vomeronasal canino. Esta plasticidad en curso podría ser una respuesta a la frecuente exposición del OVN a diversas sustancias ambientales con el potencial de causar daño celular (Ogura et al. 2010). Estas observaciones subrayan la importancia del sistema sensorial vomeronasal en los cánidos.

Por último, el anticuerpo anti-OMP se dirigió a la proteína marcadora olfativa, que se expresa en las neuronas maduras tanto dentro del SOP como del SVN (Farbman y Margolis

1980). Este marcador genera marcaje inmunopositivo en una serie de especies, incluyendo ratas (Rodewald et al. 2016), ratones (Mechin et al. 2021), ratas topo (Dennis et al. 2020) y primates (Smith et al. 2011). La presencia ubicua de OMP dentro del OVN del lobo sugiere una etapa uniforme de maduración neuronal en todo el epitelio.

Más allá del intrincado patrón neuroquímico observado en el neuroepitelio sensorial del OVN del lobo -un indicio de la compleja interacción de la comunicación molecular y celular y de los mecanismos de transducción de señales implicados en el procesamiento de la información feromonal- nuestro estudio inmunohistoquímico ha identificado una característica llamativa y distintiva del OVN del lobo. Esta característica consiste en abundantes grupos de células neuronales situadas en la parte más basal del neuroepitelio sensorial (Ortiz-Leal et al. 2024). Estos grupos se extienden varios cientos de micrómetros inmediatamente por debajo de la capa basal de células neuroreceptoras. Comprenden células de forma ovalada con grandes núcleos esféricos, densamente empaquetadas y aparentemente desprovistas de procesos. Aunque su morfología puede parecerse superficialmente a la de las células neuroreceptoras del neuroepitelio, estas células muestran un patrón neuroquímico específico. Por un lado, estas células son OMP-positivas, lo que refuerza su papel en la transducción de señales olfativas. Por otro lado, son inmunonegativas para GAP-43, lo que sugiere un estado de mayor diferenciación en comparación con las células neuroreceptoras altamente GAP-43-positivas. Estas observaciones no concuerdan con la idea de que se trate de células indiferenciadas que sirven para renovar el epitelio, como las típicas células basales. En cuanto a las proteínas fijadoras de calcio, estas agrupaciones son calretinina-positivas y calbindina-negativas, lo que inicialmente podría establecer un vínculo entre ellas y la subpoblación de células calretinina-positivas.

La presencia de estas agrupaciones es aparentemente específica del OVN del lobo. Nuestro estudio exhaustivo del OVN del zorro (Ortiz-Leal et al. 2020) utilizando marcadores y protocolos similares, no reveló una organización neuroepitelial parecida. Además, los estudios sobre otros carnívoros como perros, visones, hurones y osos no han arrojado resultados comparables. A pesar de décadas de investigación sobre el OVN en una gran variedad de mamíferos, no se ha encontrado esta organización neuroepitelial única (Torres et al. 2023b). Por lo tanto, para caracterizar de forma más exhaustiva esta población celular distintiva es imperativo realizar más investigaciones especializadas en estos grupos celulares, empleando marcadores adicionales, o incluso enfoques genómicos como la tecnología unicelular. Este enfoque mejorará nuestra comprensión de su papel funcional y su importancia dentro del OVN.

Marcaje histoquímico con lectinas en el OVN del lobo

Nuestra investigación histoquímica de lectinas revela sutiles diferencias en los patrones de marcaje de las lectinas UEA y LEA en el epitelio sensorial del OVN y los nervios vomeronasales. Ambas lectinas producen un marcaje positivo en las células neuroreceptoras y en los nervios vomeronasales, pero divergen significativamente cuando se trata de los grupos de células neuroepiteliales basales. LEA marca estos grupos neuronales, mientras que UEA no lo hace, lo que sugiere interacciones moleculares distintas entre estas lectinas y los componentes celulares de los grupos. Además, LEA muestra un marcaje más fuerte en los procesos apicales, mientras que UEA se concentra más en las áreas basales del epitelio, aunque nunca marca los grupos basales.

En el epitelio respiratorio, ambas lectinas presentan patrones de marcaje difusos pero específicos. LEA se dirige principalmente a los procesos apicales, mientras que el marcaje de UEA es más disperso, con unas pocas células fuertemente marcadas dispersas por todo el epitelio. Dentro del complejo mucociliar, UEA muestra un marcaje más intenso que LEA. Estos distintos patrones de marcaje sugieren que los glucoconjugados reconocidos por estas lectinas poseen funciones moleculares especializadas dentro del OVN.

Anatomía macroscópica y microscópica BOA del lobo

Hasta donde sabemos, este estudio representa una investigación morfológica pionera del BOA del lobo. Al igual que otros cánidos estudiados, como el perro (Nakajima et al. 1998; Salazar et al. 2013), el perro salvaje africano (Chengetanai et al. 2020) y el zorro (Ortiz-Leal et al. 2022b) el BOA del lobo es considerablemente más pequeño en tamaño comparado con el BOP, lo que dificulta su identificación macroscópica. La localización precisa de esta estructura requiere el uso de cortes histológicos seriados. El estudio de la citoarquitectura del BOA del lobo es particularmente pertinente, dado el debate histórico que rodea al desarrollo moderado, e incluso la existencia misma, del BOA en los perros. Esta controversia no se resolvió hasta la década de 1990 con la llegada de las técnicas de tinción histoquímica con lectinas (Salazar et al. 1992, 1994b).

Nuestra investigación confirma la existencia de un BOA en el lobo, con dimensiones comparables a las encontradas en perros domésticos. Sin embargo, el BOA del lobo muestra una organización laminar más pronunciada. En particular, hay un desarrollo sustancial en las capas nerviosas y glomerulares superficiales, junto con un mayor número de células mitrales, un tipo celular principal raramente observado en secciones histológicas del BOA del perro. Como resultado, el BOA del lobo puede describirse como poseedor de una capa mitral-plexiforme bien definida. Nuestros hallazgos concuerdan con los de un estudio exhaustivo del sistema olfativo del perro salvaje africano, que incluía un examen del BOA (Chengetanai et al. 2020). Aunque el tamaño y desarrollo del BOA en los cánidos salvajes pudiera parecer limitado, es más diferenciado de lo observado en otros grupos de carnívoros. En concreto, Mustelidae, como el visón (Salazar et al. 1998) y el hurón (Kelliher et al. 2001), así como Herpestidae como el suricata (Torres, Ortiz-Leal, Ferreiro, et al. 2021) poseen BOAs poco diferenciados. En conjunto, esta investigación morfológica corrobora la presencia de distintos patrones de laminación en el BOA en todas las poblaciones de cánidos salvajes y apoya la teoría de que la presión de selección vinculada a la domesticación puede haber reducido el grado de diferenciación en el sistema vomeronasal del perro, una vía sensorial crucial para la supervivencia en la naturaleza.

Inmunohistoquímica e histoquímica de lectinas en el BOA del lobo

El perfil neuroquímico del BOA del lobo en sus capas superficial, nerviosa y glomerular refleja lo observado en el OVN. Proteínas como Gai2, CB, CR y OMP, expresadas en el neuroepitelio vomeronasal y los nervios vomeronasales tanto en el OVN como en la mucosa nasal, también se detectan en las capas superficiales del BOA, donde producen un marcaje inmunopositivo. Sin embargo, las capas superficiales son Gao negativas. Esto implica que los neurorreceptores vomeronasales Gao-positivos proyectan su información a diferentes áreas del bulbo olfativo, un patrón idéntico al observado en el SVN del zorro (Ortiz-Leal, et al. 2022b).

Esto también se ha demostrado en el zorro, donde los nervios aferentes vomeronasales Gao se proyectan al limbo olfativo, una zona de transición (Ortiz-Leal et al. 2023). La existencia de un limbo olfativo similar en el lobo es un tema que merece ser investigado, ya que queda fuera del alcance del presente estudio. De todos los marcadores descritos en nuestro estudio, el trabajo de Chengetanai et al. (2020) sobre el BOA del perro salvaje africano sólo empleó anti-CR, obteniendo un patrón similar al descrito por nosotros en el lobo. Además, nuestro estudio del BOA del lobo empleó anticuerpos contra las proteínas MAP-2 y GFAP, permitiendo caracterizar el notable desarrollo del árbol dendrítico en la capa mitral-plexiforme y el componente glial, tanto a nivel de la glía envolvente como de los astrocitos.

Tanto la lectina UEA como la LEA producen inmunopositividad en las áreas superficiales del BOA, pero mientras que la primera es específica del BOA, la segunda tiñe tanto el BOA como el BOP. Este patrón concuerda con lo observado en el perro (Salazar et al. 1992, 2013) y en el zorro (Ortiz-Leal et al. 2022b), confirmando la utilidad de UEA como marcador del SVN de los cánidos y de LEA como marcador general del SVN y del BOP en la misma familia. Cabe destacar, sin embargo, que la lectina BSI-B₄, específica del SVN de la rata (Ichikawa et al. 1992), sigue siendo negativa en el caso del lobo, lo que demuestra la notable especificidad de la expresión de glicoconjugados en diferentes grupos de mamíferos.

En conclusión, el estudio exhaustivo del SVN del lobo, que abarca el OVN, los nervios vomeronasales y el BOA, ha proporcionado la primera caracterización detallada de su anatomía macroscópica, histología y perfiles neuroquímicos e histoquímicos. Nuestros hallazgos ponen de manifiesto diferencias significativas entre el lobo (*Canis lupus signatus*) y su homólogo doméstico, *Canis lupus familiaris*, tanto en aspectos estructurales como neuroquímicos. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la domesticación del ancestro del perro ha conducido a la regresión de características moleculares y neuroquímicas específicas dentro del SVN. Más allá de sus implicaciones evolutivas, cabe destacar que el SVN del lobo presenta características únicas. Se alinea con otros modelos animales que presentan la expresión dual de subunidades de proteína G en su OVN, un hallazgo de gran interés. Asimismo, es especialmente reseñable la presencia de extensas agrupaciones neuronales en el neuroepitelio del OVN, no documentadas previamente en otras especies de cánidos ni en ningún otro mamífero. Esto añade una nueva profundidad a nuestra comprensión comparativa del SVN de los mamíferos. Se espera que futuras investigaciones moleculares y genómicas arrojen luz sobre la importancia de estas características estructurales y neuroquímicas.

5.5 BULBO OLFATORIO PRINCIPAL DEL PERRO, LOBO Y ZORRO

En la valoración macroscópica del encéfalo olfativo en las tres especies estudiadas, hemos observado en todos los ejemplares un desarrollo sensiblemente mayor de los bulbos olfatorios en el lobo y el zorro que en el perro. Se trata de una observación que necesita ser confirmada por estudios morfométricos y estereológicos, que se enfrentan a la dificultad, especialmente en el caso del lobo, de obtener muestras en buen estado de animales salvajes, de edad similar y de ambos sexos, que puedan ser comparadas con una muestra representativa de perros domésticos de raza, edad y conformación similares. Sin embargo, nuestra evaluación cualitativa es coherente con el conocido mayor desarrollo del cerebro del lobo en comparación con el cerebro del perro doméstico (Kruska 2005; Jardim-Messeder et al. 2017).

En el caso del zorro, el estudio de cría selectiva con fines de amansamiento o agresividad conocido como el “experimento ruso del zorro de granja”, desarrollado para comprender los cambios neurológicos de la domesticación, ha descubierto que una selección intensa sobre el comportamiento puede producir cambios extremadamente rápidos en la morfología cerebral (Hecht et al. 2021). Paralelamente, la comparación del volumen endocraneal entre zorros salvajes y domesticados pertenecientes al mismo experimento ha determinado una reducción del volumen endocraneal como consecuencia de la domesticación (Kistner et al. 2021). Estas observaciones macroscópicas sobre los efectos de la domesticación en el cerebro se han correlacionado a nivel funcional con estudios como el de Bird et al. (2021) que sugiere que existe una pérdida de capacidad olfativa en los perros en comparación con los cánidos salvajes. Además, este estudio no encontró pruebas de ninguna ventaja anatómica en la nariz de los perros olfateadores, ni siquiera en comparación con los perros de hocico corto, lo que apoya la hipótesis de que las razas olfativas son “olfativas” sólo de nombre. Sobre la base de estas observaciones, consideramos que la utilización en nuestro estudio de individuos caninos de razas mesocefálicas, similares en conformación al lobo, constituye un enfoque válido. Por último, también es significativo hacer referencia a un estudio específico realizado en la especie humana, donde se ha descrito recientemente una correlación directa entre la forma del bulbo olfatorio y la capacidad olfativa (Yan et al. 2022).

Desde el punto de vista histológico, las tres especies presentan una laminación amplia y bien definida, típica de una especie macrosmática, pero existen importantes diferencias, siendo las más destacables el desarrollo de la capa glomerular en el lobo y la mayor celularidad del bulbo olfativo en los dos cánidos salvajes estudiados. El desarrollo de la capa glomerular es particularmente llamativo en el lobo, siendo su distribución glomerular en cuanto al número de filas de glomérulos (2-4) similar a la encontrada en elefantes (Ngwenya et al. 2011). En este sentido, es especialmente significativo el único estudio morfológico y neuroquímico en un cánido salvaje del que tenemos constancia, el realizado en el perro salvaje africano (Chengetanai et al. 2020), en el que se observó que el diámetro glomerular en esta especie era superior al observado en el perro doméstico y estaba dentro del rango observado en el elefante africano (Ngwenya et al. 2011). En cuanto a la celularidad del BO, llama la atención el gran desarrollo de las células periglomerulares y el gran tamaño de las células mitrales, tanto en el lobo como en el zorro. Los procesos dendríticos de las células mitrales observados en la tinción de Nissl, especialmente en secciones sagitales de la capa mitral, muestran un desarrollo mucho mayor en lobos y zorros que en el perro. La ausencia de estudios morfológicos y estereológicos en el BO de los cánidos no permite contrastar estos resultados y abre la puerta a futuros estudios estereológicos que deberían profundizar en este aspecto.

En cuanto a la caracterización inmunohistoquímica del BO, tampoco existen estudios en cánidos salvajes que nos permitan comparar nuestras observaciones. Hasta donde sabemos, sólo podemos citar el estudio inmunohistoquímico de las proteínas fijadoras de calcio en perros (Choi et al. 2010). En este sentido, nuestros resultados son comparables a los patrones de marcaje obtenidos con anti-calbindina y anti-calretinina en el perro por los mismos autores. En los cánidos salvajes, se observa un patrón de marcaje más intenso para las células periglomerulares y granulares en el zorro en comparación con el lobo, y lo mismo en el lobo en comparación con el perro. Aunque se trata de una evaluación descriptiva más que cuantitativa, es interesante observar que el estudio mencionado de Choi et al. (2010) correlaciona

directamente mediante western-blot la intensidad del inmunomarcaje observado con los niveles de las proteínas fijadoras de calcio estudiadas. En cuanto a las observaciones de Chengetanai et al. (2020) en el perro salvaje africano, este estudio sólo coincide con nuestro trabajo, en cuanto a los inmunomarcadores utilizados, en el caso de las proteínas fijadoras de calcio, obteniendo resultados similares a los observados por nosotros en el lobo. Respecto a otros marcadores como OMP, GFAP, Gao, Gai2 y MAP2, hasta donde sabemos no existen antecedentes en perros y cánidos salvajes que permitan contrastar nuestros resultados. Entre estos marcadores, llama la atención el caso concreto de MAP-2 y GFAP, que producen una respuesta más intensa en ambos cánidos salvajes. La expresión de MAP-2 es especialmente relevante porque puede utilizarse para identificar árboles dendríticos de células mitrales (Dehmelt y Halpain 2005; Villamayor et al. 2020). Por lo tanto, el fuerte marcaje obtenido con este marcador tanto en las capas plexiformes como glomerulares del lobo y del zorro es consistente con las observaciones histológicas de estas células. Con respecto a los somas de las células mitrales, ninguno de los marcadores permitió su caracterización, como también fue observado por Chengetanai et al. (2020) con los marcadores utilizados por ellos en su estudio.


El estudio histoquímico con las lectinas LEA y UEA produjo resultados similares en las tres especies. Mientras que LEA produce un marcaje uniforme en las dos capas superficiales del bulbo, UEA produce un marcaje negativo. Tal como comentamos anteriormente, los estudios con LEA en un gran número de especies confirman a esta lectina como marcador universal del sistema olfativo de mamíferos (Shapiro et al. 1995; Salazar y Sánchez Quinteiro 1998a; Yang et al. 2021). El caso de UEA es más llamativo porque se sabía que esta lectina, afín a la L-fucosa, presentaba un patrón específico hacia el sistema vomeronasal en perros (Salazar et al. 2013) y zorros (Ortiz-Leal et al. 2021), mientras que no había información al respecto en lobos. El resultado obtenido para nosotros muestra que la especificidad del sistema vomeronasal hacia la UEA es un carácter altamente conservado en el sistema olfativo principal de los cánidos. Esto no ocurre en Felidae, ya que el sistema vomeronasal de los felinos no es específico para la UEA, tal y como ocurre en otros grupos de mamíferos tan diversos como roedores (Kondoh et al. 2017a), conejos (Villamayor et al. 2018), cerdos (Salazar et al. 2004), rumiantes (Park et al. 2014) o marsupiales (Torres et al. 2022).

6. CONCLUSIONES

1. **Los órganos vomeronasales del lobo y del zorro** muestran diferencias notables en comparación con el perro doméstico, especialmente en cuanto a la expresión específica de diversas proteínas, entre las cuales la Gao es particularmente reseñable. Este hallazgo sugiere una expresión efectiva de los receptores vomeronasales de la familia V2R en los cánidos salvajes.
2. **El órgano vomeronasal del lobo** se caracteriza por el gran desarrollo de la bomba vascular y la presencia de extensos clústeres de células en posición basal, en la proximidad de capilares intraepiteliales. Este hecho plantea la existencia de mecanismos complejos, todavía inéditos, para la integración de señales olfativas; por ejemplo, el hipotético acceso de estímulos por la vía hematogénica.
3. **El grado de diferenciación y desarrollo del bulbo olfativo accesorio del zorro es muy superior al observado en el lobo**, y más aún, si se compara con el del perro. Destaca especialmente la clara distinción entre las capas superficiales y profundas, junto con el notable desarrollo de las células mitrales.
4. **La presencia en el zorro de un limbo olfativo**, - zona de transición entre los sistemas olfativos principal y accesorio - es particularmente notable debido a su altamente sofisticado y específico patrón de expresión neuroquímica. Morfológicamente destaca por la compleja presencia de estructuras inéditas: clústeres neuronales superficiales y amplios complejos macrogglomerulares. Estas especializaciones sugieren que el zorro posee un sistema de procesamiento de señales olfativas altamente complejo.
5. **El patrón de expresión de glicoconjugados**, determinado en base al marcaje histoquímico con lectinas, está altamente conservado en las tres especies, con una pauta similar, tanto en lo que respecta a la UEA -marcador específico de la vía vomeronasal- como la LEA, marcador general de ambos sistemas olfativos.
6. La investigación sobre el **bulbo olfativo principal en cánidos salvajes** revela una marcada diferencia en términos de celularidad y estratificación en comparación con los perros domésticos. Este hallazgo sugiere variaciones significativas en el procesamiento de la información olfativa entre estas especies.
7. **En su conjunto**, las observaciones morfológicas, histológicas e inmunohistoquímicas conducen a hipotetizar la existencia de una **involución morfofuncional** en el desarrollo de los subsistemas olfativos principal y accesorio en el perro doméstico, en comparación con sus antecesores salvajes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abo-Ahmed, A.I., Eshrah, E.A., Latifi, F. 2021. Unique nasal septal island in dromedary camels may play a role in pain perception: microscopic studies. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 3806-3815.
- Ackels, T., von der Weid, B., Rodriguez, I., Spehr, M. 2014. Physiological characterization of formyl peptide receptor expressing cells in the mouse vomeronasal organ. *Frontiers in Neuroanatomy* 8: .
- Adams, D.R., McFarland, L.Z. 1971. Septal olfactory organ in *Peromyscus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 40: 971-974.
- Adams, D.R., Wiekamp, M.D. 1984. The canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy* 138 (Pt 4): 771-787.
- Agnvall, B., Bélteky, J., Katajamaa, R., Jensen, P. 2018. Is evolution of domestication driven by tameness? A selective review with focus on chickens. *Applied Animal Behaviour Science* 205: 227-233.
- Ajmat, M.T., Chamut, S., Black-Decima, P. 1999. «Osmetricchia» in the grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas De Microscopia Electronica ... Et. Al* 23: 171-176.
- Aland, R.C., Gosden, E., Bradley, A.J. 2016. Seasonal morphometry of the vomeronasal organ in the marsupial mouse, *Antechinus subtropicus*. *Journal of Morphology* 277: 1517-1530.
- Albeanu, D.F., Provost, A.C., Agarwal, P., Soucy, E.R., Zak, J.D., Murthy, V.N. 2018. Olfactory marker protein (OMP) regulates formation and refinement of the olfactory glomerular map. *Nature Communications* 9: 5073.
- Albert, F.W., Shchepina, O., Winter, C., Römpler, H., Teupser, D., Palme, R., Ceglarek, U. et al. 2008. Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans. *Hormones and behavior* 53: 413-421.
- Albone, E.S., Flood, P.F. 1976. The supracaudal scent gland of the red fox (*Vulpes vulpes*). *Journal of Chemical Ecology* 2: 167-175.

 Albone, E.S., Shirley, S.G. 1984. *Mammalian semiochemistry: the investigation of chemical signals between mammals*. Wiley, Chichester [West Sussex]; New York.

- Allen, M.L., Wittmer, H.U., Wilmers, C.C. 2014. Puma communication behaviours: understanding functional use and variation among sex and age classes. *Behaviour* 151: 819-840.
- Allen, N.J., Lyons, D.A. 2018. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362: 181-185.
- Alonso, J.R., Porteros, A., Crespo, C., Arévalo, R., Briñón, J.G., Weruaga, E., Aijón, J. 1998. Chemical anatomy of the macaque monkey olfactory bulb: NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase activity. *The Journal of Comparative Neurology* 402: 419-434.
- Alroy, J., Ucci, A.A., Goyal, V., Woods, W. 1986. Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 34: 501-505.
- Alsafy, M.A.M., El-gendy, S.A.A., Abumandour, M.M.A. 2014. Computed Tomography and Gross Anatomical Studies on the Head of One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*). *The Anatomical Record* 297: 630-642.
- Andersson, G., Brundin, A., Andersson, K. 1979. Volatile compounds from the interdigital gland of reindeer (*Rangifer t. tarandus* L.). *Journal of Chemical Ecology* 5: 321-333.
- Andressen, C., Blümcke, I., Celio, M.R. 1993. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell and Tissue Research* 271: 181-208.
- Apfelbach, R., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J., Hayes, R.A., McGregor, I.S. 2005. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29: 1123-1144.
- Araneda, R.C., Kini, A.D., Firestein, S. 2000. The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nature Neuroscience* 3: 1248-1255.
- Arnautovic, I., Abdalla, O., Fahmy, M.F. 1970. Anatomical study of the vomeronasal organ and the nasopalatine duct of the one-humped camel. *Acta Anatomica* 77: 144-154.
- Ashwell, K.W.S. 2006. Chemoarchitecture of the Monotreme Olfactory Bulb. *Brain, Behavior and Evolution* 67: 69-84.
- Ashwell, K.W.S. 2012. Development of the Olfactory Pathways in Platypus and Echidna. *Brain, Behavior and Evolution* 79: 45-56.
- Ashwell, K.W.S., Phillips, J.M. 2006. The Anterior Olfactory Nucleus and Piriform Cortex of the Echidna and Platypus. *Brain Behavior and Evolution* 67: 203-227.
- Asproni, P., Cozzi, A., Verin, R., Lafont-Lecuelle, C., Bienboire-Frosini, C., Poli, A., Pageat, P. 2016. Pathology and behaviour in feline medicine: investigating the link between vomeronasalitis and aggression. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18: 997-1002.

- Bailey, M.S., Shipley, M.T. 1993. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: Morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *The Journal of Comparative Neurology* 328: 501-526.
- Baker, H., Towle, A.C., Margolis, F.L. 1988. Differential afferent regulation of dopaminergic and GABAergic neurons in the mouse main olfactory bulb. *Brain Research* 450: 69-80.
- Bakthavatsalam, N. 2016. Semiochemicals. En *Ecofriendly Pest Management for Food Security*, pp. 563-611. Elsevier.
- Balcarcel, A.M., Geiger, M., Clauss, M., Sánchez-Villagra, M.R. 2022. The mammalian brain under domestication: Discovering patterns after a century of old and new analyses. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 338: 460-483.
- Barber, P.C., Raisman, G. 1978. Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. *Brain Research* 141: 57-66.
- Barman, P., Das, P.K., Das, A., Das, S. 2022. Effect of Estrus and Diestrus Urine on Libido of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bulls.
- Barrio, J. 2013. *Hippocamelus antisensis* (Artiodactyla: Cervidae). *Mammalian Species* 45: 49-59.
- Barrios, A.W., Núñez, G., Sanchez Quinteiro, P., Salazar, I. 2014. Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Frontiers in Neuroanatomy* 8: .
- Barrios Bermúdez, A., Fernandez, L.X., Bentos, C.M. 2015. Anatomía de la boca y faringe del venado de campo: (*Ozotoceros bezoarticus*).
- Bast, W.G., Albeanu, D.F. 2022. Mapping odorant receptors to their glomeruli. *Nature Neuroscience* 25: 405-407.
- Bastianelli, E., Pochet, R. 1995. Calmodulin, calbindin-D28k, calretinin and neurocalcin in rat olfactory bulb during postnatal development. *Developmental Brain Research* 87: 224-227.
- Bean, N.J., Wysocki, C.J. 1989. Vomeronasal organ removal and female mouse aggression: The role of experience. *Physiology & Behavior* 45: 875-882.
- Bednar, M., Langfelder, O. 1930. Über das intravenöse (hämatogene) Riechen. 64: 1133-1139.
- Bekoff, M. 1979. Ground Scratching by Male Domestic Dogs: A Composite Signal. *Journal of Mammalogy* 60: 847-848.
- Belluscio, L., Koentges, G., Axel, R., Dulac, C. 1999. A Map of Pheromone Receptor Activation in the Mammalian Brain. *Cell* 97: 209-220.

- Beltramino, C., Taleisnik, S. 2008. Release of LH in the Female Rat by Olfactory Stimuli: Effect of the Removal of the Vomeronasal Organs or Lesioning of the Accessory Olfactory Bulbs. *Neuroendocrinology* 36: 53-58.
- Belyaev, D.K. 1979. Destabilizing selection as a factor in domestication. *Journal of Heredity* 70: 301-308.
- Belyaev, D.K., Plyusnina, I.Z., Trut, L.N. 1985. Domestication in the silver fox (*Vulpes fulvus Desm*): Changes in physiological boundaries of the sensitive period of primary socialization. *Applied Animal Behaviour Science* 13: 359-370.
- Benowitz, L.I., Perrone-Bizzozero, N.I., Neve, R.L., Rodriguez, W. 1990. Chapter 26 GAP-43 as a marker for structural plasticity in the mature CNS. En *Progress in Brain Research*, pp. 309-320. Elsevier.
- Berghard, A., Buck, L. 1996. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G alpha o, G alpha i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *The Journal of Neuroscience* 16: 909-918.
- Berghard, A., Buck, L.B., Liman, E.R. 1996. Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 2365-2369.
- Bernhardt, R., Matus, A. 1984. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: A difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *The Journal of Comparative Neurology* 226: 203-221.
- Berta, A., Ekdale, E.G., Cranford, T.W. 2014. Review of the Cetacean Nose: Form, Function, and Evolution. *The Anatomical Record* 297: 2205-2215.
- Berta, A., Ekdale, E.G., Zellmer, N.T., Deméré, T.A., Kienle, S.S., Smallcomb, M. 2015. Eye, Nose, Hair, and Throat: External Anatomy of the Head of a Neonate Gray Whale (Cetacea, Mysticeti, Eschrichtiidae). *The Anatomical Record* 298: 648-659.
- Bertmar, G. 1981. Variations in size and structure of vomeronasal organs in reindeer Rangifer tarandus tarandus l. *Arch. Biol.* 92: 343-366.
- Besoluk, K., Eken, E., Boydak, M. 2001. The vomeronasal organ in Angora goats (Capra hircus). *Veterinarski arhiv* 71: 11-18.
- Beynon, R.J., Hurst, J.L. 2004. Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. *Peptides* 25: 1553-1563.
- Bhatnagar, K.P., Meisami, E. 1998. Vomeronasal organ in bats and primates: Extremes of structural variability and its phylogenetic implications. *Microscopy Research and Technique* 43: 465-475.
- Bhatnagar, K.P., Smith, T.D. 2007. Light Microscopic and Ultrastructural Observations on the Vomeronasal Organ of Anoura (Chiroptera: Phyllostomidae). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 290: 1341-1354.

- Bidder, O.R., di Virgilio, A., Hunter, J.S., McInturff, A., Gaynor, K.M., Smith, A.M., Dorcy, J., Rosell, F. 2020. Monitoring canid scent marking in space and time using a biologging and machine learning approach. *Scientific Reports* 10: 588.
- Bininda-Emonds, O.R.P., Decker-Flum, D.M., Gittleman, J.L. 2001. The utility of chemical signals as phylogenetic characters: an example from the Felidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 1-15.
- Bird, D.J., Jacquemetton, C., Buelow, S.A., Evans, A.W., Van Valkenburgh, B. 2021. Domesticating olfaction: Dog breeds, including scent hounds, have reduced cribriform plate morphology relative to wolves. *The Anatomical Record* 304: 139-153.
- Bird, D.J., Murphy, W.J., Fox-Rosales, L., Hamid, I., Eagle, R.A., Van Valkenburgh, B. 2018. Olfaction written in bone: cribriform plate size parallels olfactory receptor gene repertoires in Mammalia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285: 20180100.
- Bock, P., Rohn, K., Beineke, A., Baumgärtner, W., Wewetzer, K. 2009. Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *Journal of Anatomy* 215: 522-535.
- Boillat, M., Carleton, A., Rodriguez, I. 2021. From immune to olfactory expression: neofunctionalization of formyl peptide receptors. *Cell and Tissue Research* 383: 387-393.
- Bojsen-Møller, F. 1975. Demonstration of terminalis, olfactory, trigeminal and perivascular nerves in the rat nasal septum. *Journal of Comparative Neurology* 159: 245-256.
- Booth, K.K., Katz, L.S. 2000. Role of the Vomeronasal Organ in Neonatal Offspring Recognition in Sheep1. *Biology of Reproduction* 63: 953-958.
- Boschat, C., Pélofi, C., Randin, O., Roppolo, D., Lüscher, C., Broillet, M.-C., Rodriguez, I. 2002. Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nature Neuroscience* 5: 1261-1262.
- Bossert, W.H., Wilson, E.O. 1963. The analysis of olfactory communication among animals. *Journal of Theoretical Biology* 5: 443-469.
- Bouchard, S. 2001. Sex discrimination and roostmate recognition by olfactory cues in the African bats, *Mops condylurus* and *Chaerephon pumilus* (Chiroptera: Molossidae). *Journal of Zoology* 254: 109-117.
- Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C., Mombaerts, P. 2002. Odorant Receptor Expression Defines Functional Units in the Mouse Olfactory System. *The Journal of Neuroscience* 22: 3033-3043.
- Bradley, A.J., Stoddart, D.M. 1993. The dorsal paracloacal gland and its relationship with seasonal changes in cutaneous scent gland morphology and plasma androgen in the marsupial sugar glider (*Petaurus breviceps*; Marsupialia: Petauridae). *J. Zool.* 229: 331-346.

- Brann, J.H., Firestein, S.J. 2014. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Frontiers in Neuroscience* 8: .
- Braun, T., Mack, B., Kramer, M.F. 2011. Solitary chemosensory cells in the respiratory and vomeronasal epithelium of the human nose: a pilot study. *Rhinology* 49: 507-512.
- Brechbühl, J., Klaey, M., Broillet, M.-C. 2008. Grueneberg Ganglion Cells Mediate Alarm Pheromone Detection in Mice. *Science* 321: 1092-1095.
- Brechbühl, J., Moine, F., Klaey, M., Nenniger-Tosato, M., Hurni, N., Sporkert, F., Giroud, C., Broillet, M.-C. 2013. Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 4762-4767.
- Brechbühl, J., de Vallière, A., Wood, D., Nenniger Tosato, M., Broillet, M.-C. 2020. The Grueneberg ganglion controls odor-driven food choices in mice under threat. *Communications Biology* 3: 1-12.
- Breer, H., Fleischer, J., Strotmann, J. 2006. Signaling in the Chemosensory Systems: The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 1465-1475.
- Breipohl, W., Bhatnagar, KunwarP., Blank, M., Mendoza, A.S. 1981. Intraepithelial blood vessels in the vomeronasal neuroepithelium of the rat: A light and electron microscopic study. *Cell and Tissue Research* 215: .
- Breipohl, W., Bhatnagar, KunwarP., Mendoza, A. 1979. Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat. *Cell and Tissue Research* 200: .
- Brennan, P.A. 2004. The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Hormones and Behavior* 46: 231-240.
- Brennan, P.A. 2001. The vomeronasal system. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 546-555.
- Brennan, P.A., Keverne, E.B. 1997. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology* 51: 457-481.
- Brennan, P.A., Keverne, E.B. 2004. Something in the Air? New Insights into Mammalian Pheromones. *Current Biology* 14: R81-R89.
- Briñón, J.G., Weruaga, E., Crespo, C., Porteros, A., Arévalo, R., Aijón, J., Alonso, J.R. 2001. Calretinin-, neurocalcin-, and parvalbumin-immunoreactive elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *The Journal of Comparative Neurology* 429: 554-570.
- Brisbin, I.L., Austad, S.N. 1991. Testing the individual odour theory of canine olfaction. *Animal Behaviour* 42: 63-69.
- Broman, I. 1921. Über die Entwicklung der konstanten grösseren Nasenhöhlendrüsen der Nagetiere. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 60: 439-586.

- Bronner, M.E., LeDouarin, N.M. 2012. Development and evolution of the neural crest: an overview. *Developmental biology* 366: 2-9.
- Brouette-Lahlou, I., Godinot, F., Vernet-Maury, E. 1999. The Mother Rat's Vomeronasal Organ Is Involved in Detection of Dodecyl Propionate, the Pup's Preputial Gland Pheromone. *Physiology & Behavior* 66: 427-436.
- Brown, W.L., Eisner, T., Whittaker, R.H. 1970. Allomones and Kairomones: Transspecific Chemical Messengers. *BioScience* 20: 21-22.
- Brunet, L.J., Gold, G.H., Ngai, J. 1996. General Anosmia Caused by a Targeted Disruption of the Mouse Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Neuron* 17: 681-693.
- Brunjes, P.C., Feldman, S., Osterberg, S.K. 2016. The Pig Olfactory Brain: A Primer. *Chemical Senses* 41: 415-425.
- Brusini, I., Carneiro, M., Wang, C., Rubin, C.-J., Ring, H., Afonso, S., Blanco-Aguiar, J.A. et al. 2018. Changes in brain architecture are consistent with altered fear processing in domestic rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 7380-7385.
- Buck, L., Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
- Buesching, C.D., Macdonald, D.W. 2001. Scent-Marking Behaviour of the European Badger (Meles Meles): Resource Defence or Individual Advertisement? En Marchlewska-Koj, A., Lepri, J. J., Müller-Schwarze, D. (eds.), *Chemical Signals in Vertebrates 9*, pp. 321-327. Springer US, Boston, MA.
- Buesching, C.D., Tinnesand, H.V., Sin, Y., Rosell, F., Burke, T., Macdonald, D.W. 2016. Coding of group odor in the subcaudal gland secretion of the European badger Meles meles: chemical composition and pouch microbiota. En pp. 45-62. Springer.
- Buesching, C.D., Waterhouse, J.S., Macdonald, D.W. 2002. Gas-Chromatographic Analyses of the Subcaudal Gland Secretion of the European Badger (*Meles meles*) Part I: Chemical Differences Related to Individual Parameters. *Journal of Chemical Ecology* 28: 41-56.
- Bufe, B., Teuchert, Y., Schmid, A., Pyrski, M., Pérez-Gómez, A., Eisenbeis, J., Timm, T. et al. 2019. Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor Fpr3 in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour. *Nature Communications* 10: 4889.
- Burger, B.V. 2004. Mammalian Semiochemicals. En Schulz, S. (ed.), *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*, Topics in Current Chemistry, pp. 231-278. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Cadiz, B., Martinez-Garcia, F., Lanuza, E. 2013. Neural Substrate to Associate Odorants and Pheromones: Convergence of Projections from the Main and Accessory Olfactory Bulbs in Mice. En *Chemical Signals in Vertebrates 12*, pp. 3-16.

- Cádiz-Moretti, B., Otero-García, M., Martínez-García, F., Lanuza, E. 2016. Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Structure and Function* 221: 1033-1065.
- Camargo, A.P., Nakahara, T.S., Firmino, L.E.R., Netto, P.H.M., do Nascimento, J.B.P., Donnard, E.R., Galante, P.A.F. et al. 2019. Uncovering the mouse olfactory long non-coding transcriptome with a novel machine-learning model. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 26: 365-378.
- Carroll, J.F. 1998. Kairomonal Activity of White-Tailed Deer Metatarsal Gland Substances: A More Sensitive Behavioral Bioassay Using Ixodes Scapularis (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 35: 90-93.
- Chamero, P., Katsoulidou, V., Hendrix, P., Bufe, B., Roberts, R., Matsunami, H., Abramowitz, J. et al. 2011. G protein G α o is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 12898-12903.
- Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., Stowers, L. 2007. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450: 899-902.
- Charpentier, M.J.E., Boulet, M., Drea, C.M. 2008. Smelling right: the scent of male lemurs advertises genetic quality and relatedness. *Molecular Ecology* 17: 3225-3233.
- Charrier, I. 2021. Non-vocal Communication in Otariids and Odobenids: The Involvement of Visual and Olfactory Cues in Their Social Lives. En Campagna, C., Harcourt, R. (eds.), *Ethology and Behavioral Ecology of Otariids and the Odobenid*, Ethology and Behavioral Ecology of Marine Mammals, pp. 291-304. Springer International Publishing, Cham.
- Cheetham, S.A., Thom, M.D., Jury, F., Ollier, W.E.R., Beynon, R.J., Hurst, J.L. 2007. The Genetic Basis of Individual-Recognition Signals in the Mouse. *Current Biology* 17: 1771-1777.
- Chengetanai, S., Bhagwandin, A., Bertelsen, M.F., Hård, T., Hof, P.R., Spocter, M.A., Manger, P.R. 2020. The brain of the African wild dog. II . The olfactory system. *Journal of Comparative Neurology* 528: 3285-3304.
- Choi, J.H., Lee, C.H., Yoo, K.-Y., Hwang, I.K., Lee, I.S., Lee, Y.L., Shin, H.-C., Won, M.-H. 2010. Age-related Changes in Calbindin-D28k, Parvalbumin, and Calretinin Immunoreactivity in the Dog Main Olfactory Bulb. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30: 1-12.
- Chun, J., Kang, T., Seo, J.-P., Jeong, H., Kim, M., Kim, B.S., Ahn, M. et al. 2023. Glycoconjugate-Specific Developmental Changes in the Horse Vomeronasal Organ. *Cells Tissues Organs* 1-14.

- Clancy, A.N., Coquelin, A., Macrides, F., Gorski, R.A., Noble, E.P. 1984. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *Journal of Neuroscience* 4: 2222-2229.
- Clifford, A.B., Witmer, L.M. 2004. Case studies in novel nasal anatomy: 3. Structure and function of the nasal cavity of saiga (Artiodactyla: Bovidae: Saiga tatarica). *Journal of Zoology* 264: 217-230.
- Clutton-Brock, J. 1981. Domesticated animals from early times. *Domesticated animals from early times*.
- Clutton-Brock, J. 1994. The Unnatural World: Behavioural Aspects Of Humans And Animals In The Process Of Domestication. En *Animals and Human Society*, Routledge.
- Clutton-Brock, J. 2014. *The Walking Larder: Patterns of Domestication, Pastoralism, and Predation*. Routledge.
- Cockerham, R.E., Puche, A.C., Munger, S.D. 2009. Heterogeneous Sensory Innervation and Extensive Intrabulbar Connections of Olfactory Necklace Glomeruli. *PLOS ONE* 4: e4657.
- Conover, G.K., Gittleman, J.L. 1989. Scent-marking in captive Red pandas (*Ailurus fulgens*). *Zoo biology* 8: 193-205.
- Coppinger, R., Glendinning, J., Torop, E., Matthay, C., Sutherland, M., Smith, C. 1987. Degree of behavioral neoteny differentiates canid polymorphs. *Ethology* 75: 89-108.
- Coppola, J.J., Disney, A.A. 2018. Most calbindin-immunoreactive neurons, but few calretinin-immunoreactive neurons, express the m1 acetylcholine receptor in the middle temporal visual area of the macaque monkey. *Brain and Behavior* 8: e01071.
- Corona, R., Lévy, F. 2015. Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. *Hormones and Behavior* 68: 77-90.
- Cotterill, F. 2003. Insights into the taxonomy of tsessebe antelopes *Damaliscus lunatus* (Bovidae: Alcelaphini) with the description of a new evolutionary species in south-central Africa. *Durban Museum Novitates* 28: 11-30.
- Cozzi, A., Lecuelle, C.L., Monneret, P., Articloux, F., Bougrat, L., Mengoli, M., Pageat, P. 2013. Induction of scratching behaviour in cats: efficacy of synthetic feline interdigital semiochemical. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 872-878.
- Crespo, C., Alonso, J.R., Briñón, J.G., Weruaga, E., Porteros, A., Arévalo, R., Aijón, J. 1997. Calcium-binding proteins in the periglomerular region of typical and atypical olfactory glomeruli. *Brain Research* 745: 293-302.
- Crockford, S.J. 2006. *Rhythms of Life: Thyroid Hormone & the Origin of Species: [a 21st Century Way of Thinking about Domestication, Evolution & Human Health that Goes Beyond Genes]*. Trafford Publishing.

- Crosby, E., Humphrey, T. 1939. Studies of the vertebrate telencephalon. I. The nuclear configuration of the olfactory and accessory olfactory formations and of the nucleus olfactorius anterior of certain reptiles, birds, and mammals.
- Crump, D., Swigar, A.A., West, J.R., Silverstein, R.M., Müller-Schwarze, D., Altieri, R. 1984. Urine fractions that release flehmen in black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *Journal of Chemical Ecology* 10: 203-215.
- Dagg, A.I., Taub, A. 1970. Flehmen. *Mammalia* 34: 686-695.
- Darwin, C. 1868. *The variation of animals and plants under domestication*. J. murray.
- Davis, B.J., Macrides, F., Youngs, W.M., Schneider, S.P., Rosene, D.L. 1978. Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the hamster. *Brain Research Bulletin* 3: 59-72.
- De March, C.A., Titlow, W.B., Sengoku, T., Breheny, P., Matsunami, H., McClintock, T.S. 2020. Modulation of the combinatorial code of odorant receptor response patterns in odorant mixtures. *Molecular and Cellular Neuroscience* 104: 103469.
- Defterali, Ç., Moreno-Estellés, M., Crespo, C., Díaz-Guerra, E., Díaz-Moreno, M., Vergaño-Vera, E., Nieto-Estévez, V. et al. 2021. Neural Stem Cells in the Adult Olfactory Bulb Core Generate Mature Neurons in Vivo. *Stem Cells* 39: 1253-1269.
- Dehmelt, L., Halpain, S. 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* 6: 204.
- De la Rosa-Prieto, C., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Bañon, I., Argandoña-Palacios, L., García-Muñozguren, S., Martínez-Marcos, A. 2010. Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice. *Developmental Neurobiology* 70: 961-970.
- Del Cerro, M. 1998. Role of the vomeronasal input in maternal behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 23: 905-926.
- Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam, D., Wysocki, C.J., Ogawa, S., Zufall, F., Mombaerts, P. 2002. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419: 70-74.
- Dennis, J.C., Allgier, J.G., Desouza, L.S., Eward, W.C., Morrison, E.E. 2003. Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. *Journal of Anatomy* 202: 515-524.
- Dennis, J.C., Stilwell, N.K., Smith, T.D., Park, T.J., Bhatnagar, K.P., Morrison, E.E. 2020. Is the Mole Rat Vomeronasal Organ Functional? *The Anatomical Record* 303: 318-329.
- Devor, M. 1976. Fiber trajectories of olfactory bulb efferents in the hamster. *The Journal of Comparative Neurology* 166: 31-47.
- Dielenberg, R.A., McGregor, I.S. 2001. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25: 597-609.

- Dietschi, Q., Tuberosa, J., Fodouliau, L., Boillat, M., Kan, C., Codourey, J., Pauli, V. et al. 2022. Clustering of vomeronasal receptor genes is required for transcriptional stability but not for choice. *Science Advances* 8: eabn7450.
- Doty, R. 2012. *Mammalian Olfaction, Reproductive Processes, and Behavior*. Elsevier.
- Doty, R.L., Brugger, W.E., Jurs, P.C., Orndorff, M.A., Snyder, P.J., Lowry, L.D. 1978. Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: Psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiology & Behavior* 20: 175-185.
- Doucette, J.R. 1984. The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *The Anatomical Record* 210: 385-391.
- Doucette, R. 1993. Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microscopy Research and Technique* 24: 113-130.
- Døving, K.B., Trotier, D. 1998. Structure and function of the vomeronasal organ. *Journal of Experimental Biology* 201: 2913-2925.
- Druzhkova, A.S., Thalmann, O., Trifonov, V.A., Leonard, J.A., Vorobieva, N.V., Ovodov, N.D., Graphodatsky, A.S., Wayne, R.K. 2013. Ancient DNA Analysis Affirms the Canid from Altai as a Primitive Dog. *PLOS ONE* 8: e57754.
- Dryer, L., Graziadei, P.P.C. 1994. Mitral cell dendrites: a comparative approach. *Anatomy and Embryology* 189: 91-106.
- Dulac, C., Axel, R. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83: 195-206.
- Dulac, C., Torello, A.T. 2003. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 551-562.
- Dzięcioł, M., Podgórski, P., Stańczyk, E., Szumny, A., Woszczyło, M., Pieczewska, B., Nizański, W. et al. 2020. MRI Features of the Vomeronasal Organ in Dogs (*Canis Familiaris*). *Frontiers in Veterinary Science* 7: 159.
- Eccles, R. 1982. Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. *Physiology & Behavior* 28: 1011-1015.
- Elgayar, S.A.M., Eltony, S.A., Othman, M.A. 2014. Morphology of Non-Sensory Epithelium during Post-natal Development of the Rabbit Vomeronasal Organ. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 43: 282-293.
- Elwood, R.W., Stolzenberg, D.S. 2020. Flipping the parental switch: from killing to caring in male mammals. *Animal Behaviour* 165: 133-142.
- El-Zoghby, I.M. 2012. Histological studies on the vomeronasal organ of the Egyptian buffaloes (*Bos bubalis*). *Lucrări Științifice - Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară «Ion Ionescu de la Brad» Iași* 55: 30-37.

- Emam, M.A., El-Shafey, A.A., Kassab, A.A. 2016. Expression of Neuronal and Non-Neuronal Markers in the Vomeronasal Organs of One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*) and Egyptian Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *International Journal of Morphology* 34: 1211-1217.
- Endler, J.A. 1992. Signals, Signal Conditions, and the Direction of Evolution. *The American Naturalist* 139: S125-S153.
- Estes, R.D. 1972. The role of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Mammalia* 36: .
- Ezeh, P.I., Wellis, D.P., Scott, J.W. 1993. Organization of inhibition in the rat olfactory bulb external plexiform layer. *Journal of Neurophysiology* 70: 263-274.
- Faegri, K. 1981. Social functions of botanical gardens in the society of the future. *Botanische Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*.
- Fan, S., Luo, M. 2009. The organization of feedback projections in a pathway important for processing pheromonal signals. *Neuroscience* 161: 489-500.
- Farbman, A.I., Margolis, F.L. 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: Immunohistochemical localization. *Developmental Biology* 74: 205-215.
- Fendt, M. 2006. Exposure to Urine of Canids and Felids, but not of Herbivores, Induces Defensive Behavior in Laboratory Rats. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2617-2627.
- Ferrero, D.M., Moeller, L.M., Osakada, T., Horio, N., Li, Q., Roy, D.S., Cichy, A. et al. 2013. A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature* 502: 368-371.
- Finger, T.E., Böttger, B., Hansen, A., Anderson, K.T., Alimohammadi, H., Silver, W.L. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 8981-8986.
- Fleischer, J., Hass, N., Schwarzenbacher, K., Besser, S., Breer, H. 2006. A novel population of neuronal cells expressing the olfactory marker protein (OMP) in the anterior/dorsal region of the nasal cavity. *Histochemistry and Cell Biology* 125: 337-349.
- Fleischer, J., Schwarzenbacher, K., Breer, H. 2007. Expression of Trace Amine-Associated Receptors in the Grueneberg Ganglion. *Chemical Senses* 32: 623-631.
- Font, E., Barbosa, D., Sampedro, C., Carazo, P. 2012. Social behavior, chemical communication, and adult neurogenesis: Studies of scent mark function in *Podarcis* wall lizards. *General and Comparative Endocrinology* 177: 9-17.
- Fortes-Marco, L., Lanuza, E., Martinez-Garcia, F. 2013. Of Pheromones and Kairomones: What Receptors Mediate Innate Emotional Responses?: Pheromones and Kairomones. *The Anatomical Record* 296: 1346-1363.

- Fortes-Marco, L., Lanuza, E., Martínez-García, F., Agustín-Pavón, C. 2015. Avoidance and contextual learning induced by a kairomone, a pheromone and a common odorant in female CD1 mice. *Frontiers in Neuroscience* 9: .
- Frahm, H.D., Bhatnagar, K.P. 1980. Comparative morphology of the accessory olfactory bulb in bats. *Journal of Anatomy* 130: 349-365.
- Frasnelli, J., Schuster, B., Hummel, T. 2007. Interactions between Olfaction and the Trigeminal System: What Can Be Learned from Olfactory Loss. *Cerebral Cortex* 17: 2268-2275.
- Fülle, H.J., Vassar, R., Foster, D.C., Yang, R.B., Axel, R., Garbers, D.L. 1995. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 3571-3575.
- Fuss, S.H., Omura, M., Mombaerts, P. 2005. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* 22: 2649-2654.
- Gabrion, J., Brabet, P., Nguyen Than Dao, B., Homburger, V., Dumuis, A., Sebben, M., Rouot, B., Bockaert, J. 1989. Ultrastructural localization of the GTP-binding protein Go in neurons. *Cellular Signalling* 1: 107-123.
- Galibert, F., Quignon, P., Hitte, C., André, C. 2011. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *Comptes Rendus Biologies* 334: 190-196.
- Garcia-Verdugo, J.M., Llahi, S., Farinas, I., Martin, V. 1986. Laminar organization of the main olfactory bulb of *Podarcis hispanica*: an electron microscopic and Golgi study. *Journal fur Hirnforschung* 27: 87-100.
- Garrett, E.C., Dennis, J.C., Bhatnagar, K.P., Durham, E.L., Burrows, A.M., Bonar, C.J., Steckler, N.K. et al. 2013. The Vomeronasal Complex of Nocturnal Strepsirhines and Implications for the Ancestral Condition in Primates: Vomeronasal Complex of Nocturnal Strepsirhines. *The Anatomical Record* 296: 1881-1894.
- Garrosa, M., Iñiguez, C., Fernandez, J.M., Gayoso, M.J. 1992. Developmental stages of the vomeronasal organ in the rat: a light and electron microscopic study. *Journal fur Hirnforschung* 33: 123-132.
- Gassett, J.W., Wiesler, D.P., Baker, A.G., Osborn, D.A., Miller, K.V., Marchinton, R.L., Novotny, M. 1996. Volatile compounds from interdigital gland of male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Chemical Ecology* 22: 1689-1696.
- Giacobini, P., Benedetto, A., Tirindelli, R., Fasolo, A. 2000. Proliferation and migration of receptor neurons in the vomeronasal organ of the adult mouse. *Developmental Brain Research* 123: 33-40.
- Giannetti, N., Le Jeune, H. 1996. Atypical Olfactory Glomeruli Subset of the Rat: Quantitative Study and Organization of the Peripheral Afferents. *Chemical Senses* 21: 303-312.

- Giannetti, N., Pellier, V., Beate Oestreicher, A., Astic, L. 1995. Immunocytochemical study of the differentiation process of the septal organ of Masera in developing rats. *Developmental Brain Research* 84: 287-293.
- Gispen, W.H., Nielander, H.B., De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., Schrama, L.H., Schotman, P. 1991. Role of the growth-associated protein B-50/GAP-43 in neuronal plasticity. *Molecular Neurobiology* 5: 61-85.
- Gleeson, B.T., Wilson, L.A.B. 2023. Shared reproductive disruption, not neural crest or tameness, explains the domestication syndrome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 290: 20222464.
- Góis Morais, P.L.A., Paiva, K.M., Oliveira, R.F., Santana, M.A.D., Guzen, F.P., Engelberth, R.C.G.J., de Souza Cavalcante, J. et al. 2021. Distribution and morphology of calbindin neurons in the Amygdaloid Complex of the marmoset monkey (*callithrix jacchus*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 112: 101914.
- Gómez, C., Briñón, J.G., Barbado, M.V., Weruaga, E., Valero, J., Alonso, J.R. 2005. Heterogeneous targeting of centrifugal inputs to the glomerular layer of the main olfactory bulb. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 29: 238-254.
- Gomez, D.M., Newman, S.W. 1992. Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the syrian hamster. *The Journal of Comparative Neurology* 317: 195-218.
- Gosling, L.M., Roberts, S.C. 2001. Scent-marking by male mammals: Cheat-proof signals to competitors and mates. En *Advances in the Study of Behavior*, pp. 169-217. Elsevier.
- Groves, C.P. 1999. The advantages and disadvantages of being domesticated. *Perspectives in Human Biology* 4: 1-12.
- Grüneberg, H. 1973. A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 140: 39-52.
- Grus, W.E., Shi, P., Zhang, J. 2007. Largest Vertebrate Vomeronasal Type 1 Receptor Gene Repertoire in the Semiaquatic Platypus. *Molecular Biology and Evolution* 24: 2153-2157.
- Gudziol, H., Schubert, M., Hummel, T. 2001. Decreased Trigeminal Sensitivity in Anosmia. *ORL* 63: 72-75.
- Gutiérrez-Castellanos, N., Pardo-Bellver, C., Martínez-García, F., Lanuza, E. 2014. The vomeronasal cortex - afferent and efferent projections of the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in mice. *European Journal of Neuroscience* 39: 141-158.
- Halpern, M. 1987. The Organization and Function of the Vomeronasal System. *Annual Review of Neuroscience* 10: 325-362.

- Halpern, M., Daniels, Y., Zuri, I. 2005. The role of the vomeronasal system in food preferences of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Nutrition & Metabolism* 2: 6.
- Halpern, M., Martínez-Marcos, A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology* 70: 245-318.
- Halpern, M., Shapiro, L.S., Jia, C. 1995. Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Research* 677: 157-161.
- Halpern, M., Shapiro, L.S., Jia, C. 1998. Heterogeneity in the Accessory Olfactory System. *Chemical Senses* 23: 477-481.
- Hamacher, C., Degen, R., Franke, M., Switacz, V.K., Fleck, D., Katreddi, R.R., Hernandez-Clavijo, A. et al. 2024. A revised conceptual framework for mouse vomeronasal pumping and stimulus sampling. *Current Biology* S0960982224000344.
- Hammer, K. 1984. Das domestikationssyndrom. *Kulturpflanze* 32: 11-34.
- Hart, B.L. 1983. Flehmen Behavior and Vomeronasal Organ Function. En Müller-Schwarze, D., Silverstein, R. M. (eds.), *Chemical Signals in Vertebrates* 3, pp. 87-103. Springer US, Boston, MA.
- Hart, B.L., Hart, L.A., Maina, J.N. 1988. Alteration in vomeronasal system anatomy in alcelaphine antelopes: Correlation with alteration in chemosensory investigation. *Physiology & Behavior* 42: 155-162.
- Hart, L.A., Hart, B.L. 2023. Flehmen, Osteophagia, and Other Behaviors of Giraffes (*Giraffa giraffa angolensis*): Vomeronasal Organ Adaptation. *Animals* 13: 354.
- Hasui, K., Takatsuka, T., Sakamoto, R., Matsushita, S., Tsuyama, S., Izumo, S., Murata, F. 2003. Double Autoimmunostaining with Glycine Treatment. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51: 1169-1176.
- Hauber, M.E., Sherman, P.W. 2001. Self-referent phenotype matching: theoretical considerations and empirical evidence. *Trends in Neurosciences* 24: 609-616.
- He, J., Ma, L., Kim, S., Nakai, J., Yu, C.R. 2008. Encoding Gender and Individual Information in the Mouse Vomeronasal Organ. *Science* 320: 535-538.
- Hecht, E.E., Kukekova, A.V., Gutman, D.A., Acland, G.M., Preuss, T.M., Trut, L.N. 2021. Neuromorphological Changes following Selection for Tameness and Aggression in the Russian Farm-Fox experiment. *The Journal of Neuroscience* 41: 6144-6156.
- Hecker, N., Lächele, U., Stuckas, H., Giere, P., Hiller, M. 2019. Convergent vomeronasal system reduction in mammals coincides with convergent losses of calcium signalling and odorant-degrading genes. *Molecular Ecology* 28: 3656-3668.
- Hegab, I.M., Wei, W. 2014. Neuroendocrine changes upon exposure to predator odors. *Physiology & Behavior* 131: 149-155.

- Hemmer, H. 1990. *Domestication: the decline of environmental appreciation*. Cambridge University Press.
- Henderson, J., Altieri, R., Müller-Schwarze, D. 1980. The annual cycle of Flehmen in black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Journal of Chemical Ecology* 6: 537-547.
- Hepper, P., Wells, D. 2015. Olfaction in the Order Carnivora: Family Canidae. En Doty, R. L. (ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation*, pp. 591-604. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- Herbeck, Y.E., Gulevich, R., Shepeleva, D., Grinevich, V. 2017. Oxytocin: Coevolution of human and domesticated animals. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 7: 235-242.
- Herrada, G., Dulac, C. 1997. A Novel Family of Putative Pheromone Receptors in Mammals with a Topographically Organized and Sexually Dimorphic Distribution. *Cell* 90: 763-773.
- Hildebrand, M. 1952. The Integument in Canidae. *Journal of Mammalogy* 33: 419.
- Hölldobler, B., Carlin, N.F. 1987. Anonymity and specificity in the chemical communication signals of social insects. *Journal of Comparative Physiology A* 161: 567-581.
- Holy, T.E. 2018. The Accessory Olfactory System: Innately Specialized or Microcosm of Mammalian Circuitry? *Annual Review of Neuroscience* 41: 501-525.
- Hraste, A., Stojković, R. 1995. Histomorphologic and Histochemical Characteristics of Carpal Glands (Glandulae Carpeae) in Domestic Swine (*Sus scrofa domesticus*) and Wild Swine (*Sus scrofa ferus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 24: 209-211.
- Hu, J., Zhong, C., Ding, C., Chi, Q., Walz, A., Mombaerts, P., Matsunami, H., Luo, M. 2007. Detection of Near-Atmospheric Concentrations of CO₂ by an Olfactory Subsystem in the Mouse. *Science* 317: 953-957.
- Huang, Z., Thiebaud, N., Fadool, D.A. 2017. Differential serotonergic modulation across the main and accessory olfactory bulbs: Differential serotonin modulation in olfactory system. *The Journal of Physiology* 595: 3515-3533.
- Hummel, T. 2000. Assessment of intranasal trigeminal function. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology* 36: 147-155.
- Hummel, T., Livermore, A. 2002. Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 75: 305-313.
- Husner, A., Frasnelli, J., Welge-Lüssen, A., Reiss, G., Zahnert, T., Hummel, T. 2006. Loss of Trigeminal Sensitivity Reduces Olfactory Function. *The Laryngoscope* 116: 1520-1522.

- Ibarra-Soria, X., Levitin, M.O., Logan, D.W. 2014. The genomic basis of vomeronasal-mediated behaviour. *Mammalian Genome* 25: 75-86.
- Ibokwe, C., Okpe, G.C. 2009. Morphological Studies Of Vomeronasal Organ In The Wild Juvenile Red-Flanked Duiker *Cephalophus rufilatus* (GRAY 1864). *Animal Research International* 6: .
- Ibrahim, D. 2018. Immunolocalization of Receptor and Chemoreceptor Modules in the Sheep Vomeronasal Organ. *Cells Tissues Organs* 205: 85-92.
- Ibrahim, D., Abdel-Maksoud, F., Taniguchi, K., Yamamoto, Y., Taniguchi, K., Nakamuta, N. 2015. Immunohistochemical studies for the neuronal elements in the vomeronasal organ of the one-humped camel. *Journal of Veterinary Medical Science* 77: 241-245.
- Ibrahim, D., Nakamuta, N., Taniguchi, K., Taniguchi, K. 2013. Lectin Histochemical Studies on the Vomeronasal Organ of the Sheep. *Journal of Veterinary Medical Science* 75: 1131-1137.
- Ichikawa, M., Osada, T., Ikai, A. 1992. Bandeiraea simplicifolia lectin I and Vicia villosa agglutinin bind specifically to the vomeronasal axons in the accessory olfactory bulb of the rat. *Neuroscience Research* 13: 73-79.
- Ichikawa, Shin, Kang. 1999. Fine Structure of the Vomeronasal Sensory Epithelium of Korean Goats (*Capra hircus*). Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/45/1/45_1_81/_article/-char/ja/ [Accedido 20 de junio de 2023].
- Inbar, T., Davis, R., Bergan, J.F. 2022. A sex-specific feedback projection from aromatase-expressing neurons in the medial amygdala to the accessory olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 530: 648-655.
- Island, H.D., Wengeler, J., Claussenius-Kalman, H. 2017. The flehmen response and pseudosuckling in a captive, juvenile Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Zoo Biology* 36: 30-39.
- Itakura, T., Murata, K., Miyamichi, K., Ishii, K.K., Yoshihara, Y., Touhara, K. 2022. A single vomeronasal receptor promotes intermale aggression through dedicated hypothalamic neurons. *Neuron*.
- Iwanaga, T., Nio-Kobayashi, J. 2020. Unique blood vasculature and innervation in the cavernous tissue of murine vomeronasal organs. *Biomedical Research* 41: 243-251.
- Jacobs, V.L., Sis, R.F., Chenoweth, P.J., Klemm, W.R., Sherry, C.J. 1981. Structures of the Bovine Vomeronasal Complex and Its Relationships to the Palate: Tongue Manipulation. *Cells Tissues Organs* 110: 48-58.
- Jacobson, L. 1813. Anatomisk Beskrivelse over et myt Organ i Huusdyrenes Naese. 2: 209-246.

- Jagalska-Majewska, H., Dziewiątkowski, J., Wójcik, S., Łuczyńska, A., Kurlapska, R., Moryś, J. 2001. The amygdaloid complex of the rabbit — morphological and histochemical study. *Folia Morphol.* 60: 22.
- Jang, S., Kim, B., Kim, J.-S., Moon, C. 2021. Histology and lectin histochemistry in the vomeronasal organ of Korean native cattle, *Bos taurus coreanae*. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology* 36: 270-284.
- Jardim-Messeder, D., Lambert, K., Noctor, S., Pestana, F.M., de Castro Leal, M.E., Bertelsen, M.F., Alagaili, A.N. et al. 2017. Dogs Have the Most Neurons, Though Not the Largest Brain: Trade-Off between Body Mass and Number of Neurons in the Cerebral Cortex of Large Carnivoran Species. *Frontiers in Neuroanatomy* 11: 118.
- Jawłowski, H. 1956. On the bulbus olfactorius and bulbus olfactorius accessorius of some mammals. 10: 67-86.
- Jensen, P. 2006. Domestication—From behaviour to genes and back again. *Applied animal behaviour science* 97: 3-15.
- Jeziński, Ensminger, Papet. 2016. *CANINE OLFACTION SCIENCE AND LAW: advances in forensic science, medicine*. CRC PRESS, S.I.
- Jeziński, T., Dziecioł, M., Szumny, A., Niżański, W., Woszczyło, M., Pieczewska, B., Godzińska, E.J. 2019. Discrimination of estrus odor in urine by male dogs in different experimental settings. *Journal of Veterinary Behavior* 29: 25-30.
- Jeziński, T., Jaworski, Z., Sobczyńska, M., Ensminger, J., Górecka-Bruzda, A. 2018. Do olfactory behaviour and marking responses of Konik polski stallions to faeces from conspecifics of either sex differ? *Behavioural Processes* 155: 38-42.
- Jia, C., Halpern, M. 2003. Calbindin D28K immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. *Brain Research* 977: 261-269.
- Jia, C., Halpern, M. 2004. Calbindin D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the main and accessory olfactory bulbs of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Morphology* 259: 271-280.
- Jia, C., Halpern, M. 1996. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (G_{i2} and $G_{o\alpha}$) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Research* 719: 117-128.
- Johnson, E.W., Eller, P.M., Jafek, B.W. 1994. Protein gene product 9.5 in the developing and mature rat vomeronasal organ. *Developmental Brain Research* 78: 259-264.
- Johnsson, M., Henriksen, R., Wright, D. 2021. The neural crest cell hypothesis: no unified explanation for domestication. *Genetics* 219: iyab097.
- Jones, M.K. 2017. Identifying chemical signals and examining their role in reproduction in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*).

- Juilfs, D.M., Fülle, H.J., Zhao, A.Z., Houslay, M.D., Garbers, D.L., Beavo, J.A. 1997. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3388-3395.
- Kalovidouris, S.A., Gama, C.I., Lee, L.W., Hsieh-Wilson, L.C. 2005. A Role for Fucose $\alpha(1-2)$ Galactose Carbohydrates in Neuronal Growth. *Journal of the American Chemical Society* 127: 1340-1341.
- Karimi, H., Hassanzadeh, B., Razmaraii, N. 2016. Structure of Vomeronasal Organ (Jacobson) in the Male Red Fox (*Vulpes Vulpes*). 13: 8.
- Karimi, H., Mansoori Ale Hashem, R., Ardalani, G., Sadrkhanloo, R., Hayatgheibi, H. 2014. Structure of Vomeronasal Organ (Jacobson organ) in Male Camelus Domesticus Var. dromedaris persica. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 43: 423-428.
- Karlson, P., Lüscher, M. 1959. 'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* 183: 55-56.
- Kassab, A., El-Shafey, A. 2012. Light and Scanning microscopic study on the vomeronasal organ of the buffalo (*Bos bubalis*). *Global Vet* 8: 491-7.
- Katreddi, R.R., Taroc, E.Z.M., Hicks, S.M., Lin, J.M., Liu, S., Xiang, M., Forni, P.E. 2022. Notch signaling determines cell-fate specification of the two main types of vomeronasal neurons of rodents. *Development* 149: dev200448.
- Kean, E.F. 2012. *Scent communication in the Eurasian otter (Lutra lutra) and potential applications for population monitoring*. phd. Cardiff University.
- Keller, L.-A., Niedermeier, S., Claassen, L., Popp, A. 2022. Comparative lectin histochemistry on the murine respiratory tract and primary olfactory pathway using a fully automated staining procedure. *Acta Histochemica* 124: 151877.
- Kelliher, K.R., Baum, M.J., Meredith, M. 2001. The Ferret's vomeronasal organ and accessory olfactory bulb: Effect of hormone manipulation in adult males and females. *The Anatomical Record* 263: 280-288.
- Keverne, E.B. 2004. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiology & Behavior* 83: 177-187.
- Keverne, E.B. 1999. The Vomeronasal Organ. *Science* 286: 716-720.
- Khan, M., Yoo, S.-J., Clijsters, M., Backaert, W., Vanstapel, A., Speleman, K., Lietaer, C. et al. 2021. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell* 184: 5932-5949.e15.

- Kikusui, T., Nagasawa, M., Nomoto, K., Kuse-Arata, S., Mogi, K. 2019. Endocrine regulations in human–dog coexistence through domestication. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 30: 793-806.
- Kimchi, T., Xu, J., Dulac, C. 2007. A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* 448: 1009-1014.
- Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., Touhara, K. 2005. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437: 898-901.
- Kishimoto, J., Keverne, E.B., Emson, P.C. 1993. Calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons. *Brain Research* 610: 325-329.
- Kistner, T.M., Zink, K.D., Worthington, S., Lieberman, D.E. 2021. Geometric morphometric investigation of craniofacial morphological change in domesticated silver foxes. *Scientific Reports* 11: 2582.
- Kiyokawa, Y., Kodama, Y., Kubota, T., Takeuchi, Y., Mori, Y. 2013. Alarm Pheromone Is Detected by the Vomeronasal Organ in Male Rats. *Chemical Senses* 38: 661-668.
- Klemm, W.R., Sherry, C.J., Sis, R.F., Schake, L.M., Waxman, A.B. 1984. Evidence of a role for the vomeronasal organ in social hierarchy in feedlot cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 12: 53-62.
- Kociánová, I., Gorošová, A., Tichý, F., Čížek, P., Machálka, M. 2006. Structure of Masera's Septal Olfactory Organ in Cat (*Felis silvestris* f. *catus*) - Light Microscopy in Selected Stages of Ontogeny. *Acta Veterinaria Brno* 75: 471-475.
- Kokocińska-Kusiak, A., Woszczyło, M., Zybala, M., Maciocha, J., Barłowska, K., Dziecioł, M. 2021. Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical Applications. *Animals* 11: 2463.
- Kondoh, D., Kamikawa, A., Sasaki, M., Kitamura, N. 2017a. Localization of α 1-2 Fucose Glycan in the Mouse Olfactory Pathway. *Cells Tissues Organs* 203: 20-28.
- Kondoh, D., Kawai, Y.K., Watanabe, K., Muranishi, Y. 2022. Artiodactyl livestock species have a uniform vomeronasal system with a vomeronasal type 1 receptor (V1R) pathway. *Tissue and Cell* 77: 101863.
- Kondoh, D., Nakamura, K.G., Ono, Y.S., Yuhara, K., Bando, G., Watanabe, K., Horiuchi, N. et al. 2017b. Histological features of the vomeronasal organ in the giraffe, *Giraffa camelopardalis*. *Microsc. Res. Tech.* 80: 652-656.
- Kondoh, D., Tanaka, Y., Kawai, Y.K., Mineshige, T., Watanabe, K., Kobayashi, Y. 2021. Morphological and Histological Features of the Vomeronasal Organ in African Pygmy Hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Animals* 11: 1462.

secreted by vomeronasal glands of eight Laurasiatheria species. *Acta Histochemica* 122: 1515-15.

- Kondoh, D., Watanabe, K., Nishihara, K., Ono, Y.S., Nakamura, K.G., Yuhara, K., Tomikawa, S. et al. 2017c. Histological Properties of Main and Accessory Olfactory Bulbs in the Common Hippopotamus. *Brain, Behavior and Evolution* 90: 224-231.
- Koos, D.S., Fraser, S.E. 2005. The Grueneberg ganglion projects to the olfactory bulb. *NeuroReport* 16: 1929-1932.
- Kosaka, K., Kosaka, T. 2013. Secretagogin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. *Neuroscience Research* 77: 16-32.
- Kratsing, J.E. 1982. *Australian Mammal Society*. Australian Mammal Society.
- Kratzing, J. 1971. The structure of the vomeronasal organ in the sheep. *Journal of Anatomy* 108: 247-260.
- Kruska, D. 1988. Mammalian Domestication and its Effect on Brain Structure and Behavior. En Jerison, H. J., Jerison, I. (eds.), *Intelligence and Evolutionary Biology*, pp. 211-250. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Kruska, D. 1996. The effect of domestication on brain size and composition in the mink (*Mustela vison*). *Journal of Zoology* 239: 645-661.
- Kruska, D. 2007. The effects of domestication on brain size.
- Kruska, D.C.T. 2005. On the Evolutionary Significance of Encephalization in Some Eutherian Mammals: Effects of Adaptive Radiation, Domestication, and Feralization. *Brain, Behavior and Evolution* 65: 73-108.
- Kruuk, H. 2006. *Otters: ecology, behaviour, and conservation*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Kuhn, M. 2009. Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handbook of Experimental Pharmacology* 47-69.
- Kukekova, A.V., Johnson, J.L., Xiang, X., Feng, S., Liu, S., Rando, H.M., Kharlamova, A.V. et al. 2018. Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nature Ecology & Evolution* 2: 1479-1491.
- Kumar, S., Dhingra, L., Singh, Y. 1981. Anatomy of the vomeronasal organ of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anat. Soc. Ind* 30: 63-66.
- Lacava Melgratti, M.C., Stirling Santos, M.J. 2017. Anatomía de la nariz, cavidad nasal y nasofaringe del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*).
- Larriva-Sahd, J. 2012. Cytological organization of the alpha component of the anterior olfactory nucleus and olfactory limbus. *Frontiers in Neuroanatomy* 6: .

- Larriva-Sahd, J. 2008. The accessory olfactory bulb in the adult rat: A cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *The Journal of Comparative Neurology* 510: 309-350.
- Larson, G., Fuller, D.Q. 2014. The evolution of animal domestication. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45: 115-136.
- Larson, G., Karlsson, E.K., Perri, A., Webster, M.T., Ho, S.Y.W., Peters, J., Stahl, P.W. et al. 2012. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 8878-8883.
- Le Douarin, N., Kalcheim, C. 1999. *The neural crest*. Cambridge university press.
- Lee, K.-H., Park, C., Kim, J., Moon, C., Ahn, M., Shin, T. 2016. Histological and lectin histochemical studies of the vomeronasal organ of horses. *Tissue and Cell* 48: 361-369.
- Lee, W., Ahn, M., Park, C., Taniguchi, K., Moon, C., Shin, T. 2012. Histochemical study of lectin-binding patterns in the rat vomeronasal organ during postnatal development. *Korean Journal of Veterinary Research* 52: 1-8.
- Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., S., P.C., Maul-Pavicic, A., Jäger, M., Li, X.-H. et al. 2004. MHC Class I Peptides as Chemosensory Signals in the Vomeronasal Organ. *Science* 306: 1033-1037.
- Leinders-Zufall, T., Cockerham, R.E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D.L., Reed, R.R., Zufall, F., Munger, S.D. 2007. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 14507-14512.
- Leinders-Zufall, T., Lane, A.P., Puche, A.C., Ma, W., Novotny, M.V., Shipley, M.T., Zufall, F. 2000. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405: 792-796.
- Levy, D.R., Sofer, Y., Brumfeld, V., Zilkha, N., Kimchi, T. 2020. The Nasopalatine Ducts Are Required for Proper Pheromone Signaling in Mice. *Frontiers in Neuroscience* 14: 585323.
- Lévy, F., Keller, M., Poindron, P. 2004. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and Behavior* 46: 284-302.
- Leybold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., Axel, R. 2002. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6376-6381.
- Liberles, S.D., Horowitz, L.F., Kuang, D., Contos, J.J., Wilson, K.L., Siltberg-Liberles, J., Liberles, D.A., Buck, L.B. 2009. Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *PNAS* 106: 9842-9847.

- Liman, E.R., Corey, D.P., Dulac, C. 1999. TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 5791-5796.
- Lin, W., Ogura, T., Margolskee, R.F., Finger, T.E., Restrepo, D. 2008. TRPM5-Expressing Solitary Chemosensory Cells Respond to Odorous Irritants. *Journal of Neurophysiology* 99: 1451-1460.
- Lis, H., Sharon, N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* 98: 637-674.
- Liu, C.Y., Fraser, S.E., Koos, D.S. 2009. Grueneberg ganglion olfactory subsystem employs a cGMP signaling pathway. *The Journal of Comparative Neurology* 516: 36-48.
- Lo, L., Anderson, D.J. 2011. A Cre-Dependent, Anterograde Transsynaptic Viral Tracer for Mapping Output Pathways of Genetically Marked Neurons. *Neuron* 72: 938-950.
- Loo, S.K., Kanagasunteram, R. 1972. The vomeronasal organ in tree shrew and slow loris. *J. Anat.* 112(Pt 2): 165-172.
- López-Mascaraque, L., de Carlos, J.A., Valverde, F. 1990. Structure of the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*): A Golgi study of the intrinsic organization of the superficial layers. *Journal of Comparative Neurology* 301: 243-261.
- Lord, K.A., Larson, G., Coppinger, R.P., Karlsson, E.K. 2020. The history of farm foxes undermines the animal domestication syndrome. *Trends in ecology & evolution* 35: 125-136.
- Loza, C.M., Sánchez-Villagra, M.R., Scarano, A.C., Romero, M., Barbeito, C.G., Carlini, A.A. 2023. The brain of fur seals, seals, and walrus (Pinnipedia): A comparative anatomical and phylogenetic study of cranial endocasts of semiaquatic mammals. *Journal of Mammalian Evolution* 30: 1011-1028.
- Luckhaus, G. 1969. [Light and electron microscopic findings in the epithelial lamina of the vomeronasal organ of the rabbit]. *Anatomischer Anzeiger* 124: 477-489.
- Luo, M. 2008. The Necklace Olfactory System in Mammals. *Journal of Neurogenetics* 22: 229-238.
- Luo, M., Katz, L. 2004. Encoding pheromonal signals in the mammalian vomeronasal system. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 428-434.
- Ma, M., Grosmaître, X., Iwema, C.L., Baker, H., Greer, C.A., Shepherd, G.M. 2003. Olfactory Signal Transduction in the Mouse Septal Organ. *Journal of Neuroscience* 23: 317-324.
- Macdonald, D.W. 1979. Some Observations and Field Experiments on the Urine Marking Behaviour of the Red Fox, *Vulpes vulpes* L. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 51: 1-22.
- Mahdy, E., behery, E., Mohamed, S. 2019. Comparative morpho-histological analysis on the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in Balady dogs (*Canis familiaris*)

and New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 6: 506.

- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L.B. 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* 96: 713-723.
- Malz, C.R., Knabe, W., Kuhn, H.-J. 2000. Pattern of calretinin immunoreactivity in the main olfactory system and the vomeronasal system of the tree shrew, *Tupaia belangeri*. *The Journal of Comparative Neurology* 420: 428-436.
- Mamasuew, K., Breer, H., Fleischer, J. 2008. Grueneberg ganglion neurons respond to cool ambient temperatures. *European Journal of Neuroscience* 28: 1775-1785.
- Mamasuew, K., Hofmann, N., Kretschmann, V., Biel, M., Yang, R.-B., Breer, H., Fleischer, J. 2011. Chemo- and Thermosensory Responsiveness of Grueneberg Ganglion Neurons Relies on Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling Elements. *Neurosignals* 19: 198-209.
- Manning, C.J., Wakeland, E.K., Potts, W.K. 1992. Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* 360: 581-583.
- Maras, P.M., Petruilis, A. 2008. Olfactory experience and the development of odor preference and vaginal marking in female Syrian hamsters. *Physiology & Behavior* 94: 545-551.
- Margolis, F.L. 1972. A Brain Protein Unique to the Olfactory Bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69: 1221-1224.
- Martinez-Marcos, A. 2009. On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Progress in Neurobiology* 87: 21-30.
- Martín-Sánchez, A., McLean, L., Beynon, R.J., Hurst, J.L., Ayala, G., Lanuza, E., Martínez-García, F. 2015. From sexual attraction to maternal aggression: When pheromones change their behavioural significance. *Hormones and Behavior* 68: 65-76.
- Maruniak, J.A., Wysocki, C.J., Taylor, J.A. 1986. Mediation of male mouse urine marking and aggression by the vomeronasal organ. *Physiology & Behavior* 37: 655-657.
- Massolo, A., Dani, F.R., Bella, N. 2009. Sexual and individual cues in the peri-anal gland secretum of crested porcupines (*Hystrix cristata*). *Mammalian Biology* 74: 488-496.
- Mateo, J.M. 2003. Kin recognition in ground squirrels and other rodents. *Journal of Mammalogy* 84: 1163-1181.
- Matsubara, K., Akaogi, S., Nakamuta, S., Tsujimoto, T., Nakamuta, N. 2019. Characteristics of Olfactory Organs in Sika Deer (*Cervus nippon*). *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24: 115-122.
- Matsunami, H., Buck, L.B. 1997. A Multigene Family Encoding a Diverse Array of Putative Pheromone Receptors in Mammals. *Cell* 90: 775-784.

- Matsuno, T., Kiyokage, E., Toida, K. 2017. Synaptic distribution of individually labeled mitral cells in the external plexiform layer of the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 525: 1633-1648.
- Matsuoka, M., Yoshida-Matsuoka, J., Iwasaki, N., Norita, M., Costanzo, R.M., Ichikawa, M. 2001. Immunocytochemical Study of Gi2 α and Go α on the Epithelium Surface of the Rat Vomeronasal Organ. *Chemical Senses* 26: 161-166.
- Matthies, H., Staak, S., Krug, M. 1996. Fucose and fucosyllactose enhance in-vitro hippocampal long-term potentiation. *Brain Research* 725: 276-280.
- McClanahan, K., Rosell, F. 2020. Conspecific recognition of pedal scent in domestic dogs. *Scientific Reports* 10: 17837.
- McCotter, R.E. 1912. The connection of the vomeronasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other mammals. *The Anatomical Record* 6: 299-318.
- McLean, S. 2014. Scent glands of the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *New Zealand Journal of Zoology* 41: 193-202.
- McLean, S., Davies, N.W., Wiggins, N.L. 2012. Scent Chemicals of the Brushtail Possum, *Trichosurus vulpecula*. *Journal of Chemical Ecology* 38: 1318-1339.
- McLean, S., Nichols, D.S., Davies, N.W. 2021. Volatile scent chemicals in the urine of the red fox, *Vulpes vulpes* Yue, B.-S. (ed.),. *PLOS ONE* 16: e0248961.
- Meagher, S., Penn, D.J., Potts, W.K. 2000. Male-male competition magnifies inbreeding depression in wild house mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 3324-3329.
- Mechin, V., Pageat, P., Teruel, E., Asproni, P. 2021. Histological and Immunohistochemical Characterization of Vomeronasal Organ Aging in Mice. *Animals* 11: 1211.
- Meisami, E., Bhatnagar, K.P. 1998. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique* 43: 476-499.
- Melese-d'Hospital, P.Y., Hart, B.L. 1985. Vomeronasal organ cannulation in male goats: Evidence for transport of fluid from oral cavity to vomeronasal organ during flehmen. *Physiology & Behavior* 35: 941-944.
- Menco, B.Ph.M., Carr, V.McM., Ezeh, P.I., Liman, E.R., Yankova, M.P. 2001. Ultrastructural localization of G-proteins and the channel protein TRP2 to microvilli of rat vomeronasal receptor cells. *The Journal of Comparative Neurology* 438: 468-489.
- Menco, B.P.M., Bruch, R.C., Dau, B., Danho, W. 1992. Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G protein subunit Golf α and type III adenylyl cyclase. *Neuron* 8: 441-453.

- Mendoza, A. es S. 1993. Morphological studies on the rodent main and accessory olfactory systems: The regio olfactoria and vomeronasal organ. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 175: 425-446.
- Mennella, J.A., Moltz, H. 1988. Infanticide in the male rat: The role of the vomeronasal organ. *Physiology & Behavior* 42: 303-306.
- Meredith, M. 1994. Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiology & Behavior* 56: 345-354.
- Meredith, M., Marques, D.M., O'Connell, R.J., Stern, F.L. 1980. Vomeronasal Pump: Significance for Male Hamster Sexual Behavior. *Science* 207: 1224-1226.
- Meredith, M., O'Connell, R.J. 1979. Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *The Journal of Physiology* 286: 301-316.
- Meyer, W., Bartels, T. 1989. Histochemical study on the eccrine glands in the foot pad of the cat. *Basic and Applied Histochemistry* 33: 219-238.
- Meyer, W., Tsukise, A. 1995. Lectin histochemistry of snout skin and foot pads in the wolf and the domesticated dog (Mammalia: Canidae). *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 177: 39-49.
- Miklosi, A. 2007. *Dog Behaviour, Evolution, and Cognition*. Oxford University Press.
- Millot, J.L. 1994. Olfactory and visual cues in the interaction systems between dogs and children. *Behavioural Processes* 33: 177-188.
- Millot, J.L., Filiatre, J.C., Eckerlin, A., Gagnon, A.C., Montagner, H. 1987. Olfactory cues in the relations between children and their pet dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 19: 189-195.
- Miodonski, R. 1968. Bulbus olfactorius of the dog (*Canis familiaris*). *Acta Biologica Cracoviensia* 11: 65-76.
- Moawad, U.K., Awaad, A.S., Abedellaah, B.A. 2017. Morphological, histochemical and computed tomography on the vomeronasal organ (Jacobson's organ) of Egyptian native breeds of goats (*Capra hircus*). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 6: 174-183.
- Mohrhardt, J., Nagel, M., Fleck, D., Ben-Shaul, Y., Spehr, M. 2018. Signal Detection and Coding in the Accessory Olfactory System. *Chemical Senses* 43: 667-695.
- Mollo, E., Fontana, A., Roussis, V., Polese, G., Amodeo, P., Ghiselin, M.T. 2014. Sensing marine biomolecules: smell, taste, and the evolutionary transition from aquatic to terrestrial life. *Frontiers in Chemistry* 2: .
- Mombaerts, P. 2001. How smell develops. *Nature Neuroscience* 4: 1192-1198.

- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., Axel, R. 1996. Visualizing an Olfactory Sensory Map. *Cell* 87: 675-686.
- Monti-Graziadei, G.A., Margolis, F.L., Harding, J.W., Graziadei, P.P. 1977. Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 25: 1311-1316.
- Moodie, J.D., Byers, J.A. 1989. The Function of Scent Marking by Males on Female Urine in Pronghorns. *Journal of Mammalogy* 70: 812-814.
- Moran, D.T., Rowley, J.C., Jafek, B.W., Lovell, M.A. 1982. The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology* 11: 721-746.
- Morey, D.F. 1994. The early evolution of the domestic dog. *American Scientist*.
- Mori, K., Kishi, K., Ojima, H. 1983. Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 219: 339-355.
- Mori, K., Manabe, H., Narikiyo, K. 2014. Possible functional role of olfactory subsystems in monitoring inhalation and exhalation. *Frontiers in Neuroanatomy* 8: .
- Mori, K., Nagao, H., Yoshihara, Y. 1999. The Olfactory Bulb: Coding and Processing of Odor Molecule Information. *Science* 286: 711-715.
- Mucignat, C. 2004. High-resolution Magnetic Resonance Spectroscopy of the Mouse Vomeronasal Organ. *Chemical Senses* 29: 693-696.
- Müller-Schwarze, D. 2006. *Chemical Ecology of Vertebrates*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Müller-Schwarze, D. 1971. Pheromones in black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Animal Behaviour* 19: 141-152.
- Müller-Schwarze, D., Källquist, L., Mossing, T., Brundin, A., Andersson, G. 1978. Responses of reindeer to interdigital secretions of conspecifics. *Journal of Chemical Ecology* 4: 325-335.
- Müller-Schwarze, D., Quay, W.B., Brundin, A. 1977. The caudal gland in reindeer (*Rangifer tarandus* L.): Its behavioral role, histology, and chemistry. *Journal of Chemical Ecology* 3: 591-601.
- Müller-Schwarze, D., Volkman, N.J., Zemanek, K.F. 1977. Osmetricchia: specialized scent hair in black-tailed deer. *Journal of Ultrastructure Research* 59: 223-230.
- Munger, S.D. 2009. Noses within noses. *Nature* 459: 521-522.
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., McDougall, L.M., Cockerham, R.E., Schmid, A., Wandernoth, P., Wennemuth, G. et al. 2010. An Olfactory Subsystem that Detects

- Carbon Disulfide and Mediates Food-Related Social Learning. *Current Biology* 20: 1438-1444.
- Muñiz-de Miguel, S., Barreiro-Vázquez, J.D., Sánchez-Quinteiro, P., Ortiz-Leal, I., González-Martínez, Á. 2023. Behavioural disorder in a dog with congenital agenesis of the vomeronasal organ and the septum pellucidum. *Veterinary Record Case Reports* 11: e571.
- Murrey, H.E., Ficarro, S.B., Krishnamurthy, C., Domino, S.E., Peters, E.C., Hsieh-Wilson, L.C. 2009. Identification of the Plasticity-Relevant Fucose- α (1-2)-Galactose Proteome from the Mouse Olfactory Bulb. *Biochemistry* 48: 7261-7270.
- Mykytowycz, R. 1972. The behavioural role of the mammalian skin glands. *Die Naturwissenschaften* 59: 133-139.
- Nagayama, S., Homma, R., Imamura, F. 2014. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits* 8: .
- Nakajima, T., Sakaue, M., Kato, M., Saito, S., Ogawa, K., Taniguchi, K. 1998. Immunohistochemical and enzyme-histochemical study on the accessory olfactory bulb of the dog. *The Anatomical Record* 252: 393-402.
- Natynczuk, S., Bradshaw, J.W.S., McDonald, D.W. 1989. Chemical constituents of the anal sacs of domestic dogs. *Biochemical Systematics and Ecology* 17: 83-87.
- Ngwenya, A., Patzke, N., Ihunwo, A.O., Manger, P.R. 2011. Organisation and chemical neuroanatomy of the African elephant (*Loxodonta africana*) olfactory bulb. *Brain Structure and Function* 216: 403-416.
- Niven, J.E., Laughlin, S.B. 2008. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *Journal of Experimental Biology* 211: 1792-1804.
- Noonan, M.J., Tinnesand, H.V., Müller, C.T., Rosell, F., Macdonald, D.W., Buesching, C.D. 2019. Knowing Me, Knowing You: Anal Gland Secretion of European Badgers (*Meles meles*) Codes for Individuality, Sex and Social Group Membership. *Journal of Chemical Ecology* 45: 823-837.
- Oboti, L., Ibarra-Soria, X., Pérez-Gómez, A., Schmid, A., Pyrski, M., Paschek, N., Kircher, S. et al. 2015. Pregnancy and estrogen enhance neural progenitor-cell proliferation in the vomeronasal sensory epithelium. *BMC Biology* 13: 104.
- Ogura, T., Krosnowski, K., Zhang, L., Bekkerman, M., Lin, W. 2010. Chemoreception Regulates Chemical Access to Mouse Vomeronasal Organ: Role of Solitary Chemosensory Cells Koch, K.-W. (ed.), *PLoS ONE* 5: e11924.
- Oikawa, T., Shimamura, K., Saito, T.R., Taniguchi, K. 1994. Fine Structure of the Vomeronasal Organ in the Chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Experimental Animals* 43: 487-497.
- Ortiz-Hidalgo, C. 2011. Abelardo Gallego (1879–1930) and his contributions to histotechnology: The Gallego stains. *Acta Histochemica* 113: 189-193.

- Ortiz-Jiménez, L., Barja, I. 2021. Surrounded by challenges: The simulated presence of competitors and predators modulates perianal secretion marking behaviour in the European mink (*Mustela lutreola*). *Behavioural Processes* 193: 104508.
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Barreiro-Vázquez, J.-D., López-Beceiro, A., Fidalgo, L., Shin, T., Sanchez-Quinteiro, P. 2024. The vomeronasal system of the wolf (*Canis lupus signatus*): The singularities of a wild canid. *Journal of Anatomy* Epub ahead of print.
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., López-Callejo, L.N., Fidalgo, L.E., López-Beceiro, A., Sanchez-Quinteiro, P. 2022a. Comparative Neuroanatomical Study of the Main Olfactory Bulb in Domestic and Wild Canids: Dog, Wolf and Red Fox. *Animals* 12: 1079.
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Vargas-Barroso, V., Fidalgo, L.E., López-Beceiro, A.M., Larriva-Sahd, J.A., Sánchez-Quinteiro, P. 2023. The olfactory limbus of the red fox (*Vulpes vulpes*). New insights regarding a noncanonical olfactory bulb pathway. *Frontiers in Neuroanatomy* 16: 1097467.
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Villamayor, P.R., Fidalgo, L.E., López-Beceiro, A., Sanchez-Quinteiro, P. 2022b. Can domestication shape Canidae brain morphology? The accessory olfactory bulb of the red fox as a case in point. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 240: 151881.
- Ortiz-Leal, I., Torres, M.V., Villamayor, P.R., López-Beceiro, A., Sanchez-Quinteiro, P. 2020. The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model. *Journal of Anatomy* 237: 890-906.
- Osakada, T., Abe, T., Itakura, T., Mori, H., Ishii, K.K., Eguchi, R., Murata, K. et al. 2022. Hemoglobin in the blood acts as a chemosensory signal via the mouse vomeronasal system. *Nature Communications* 13: 556.
- Osakada, T., Ishii, K.K., Mori, H., Eguchi, R., Ferrero, D.M., Yoshihara, Y., Liberles, S.D. et al. 2018. Sexual rejection via a vomeronasal receptor-triggered limbic circuit. *Nature Communications* 9: 4463.
- Otaki, J.M., Firestein, S. 1999. Segregated expression of neurestin in the developing olfactory bulb. *NeuroReport* 10: 2677.
- Over, R., Cohen-Tannoudji, J., Dehnhard, M., Claus, R., Signoret, J.P. 1990. Effect of pheromones from male goats on LH-secretion in anoestrous ewes. *Physiology & Behavior* 48: 665-668.
- Owen, M.A., Swaisgood, R.R., Slocomb, C., Amstrup, S.C., Durner, G.M., Simac, K., Pessier, A.P. 2015. An experimental investigation of chemical communication in the polar bear. *Journal of Zoology* 295: 36-43.
- Pageat, P., Gaultier, E. 2003. Current research in canine and feline pheromones. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33: 187-211.

- Pallé, A., Montero, M., Fernández, S., Tezanos, P., de las Heras, J.A., Luskey, V., Birnbaumer, L. et al. 2020. *Gai2+* vomeronasal neurons govern the initial outcome of an acute social competition. *Scientific Reports* 10: 894.
- Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F., Lanuza, E. 2012. Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Frontiers in Neuroanatomy* 6: .
- Pardo-Bellver, C., Vila-Martin, M.E., Martínez-Bellver, S., Villafranca-Faus, M., Teruel-Sanchis, A., Savarelli-Balsamo, C.A., Drabik, S.M. et al. 2022. Neural activity patterns in the chemosensory network encoding vomeronasal and olfactory information in mice. *Frontiers in Neuroanatomy* 16: 988015.
- Parillo, F., Diverio, S. 2009. Glycocomposition of the apocrine interdigital gland secretions in the fallow deer (*Dama dama*). *Research in Veterinary Science* 86: 194-199.
- Park, C., Ahn, M., Lee, J.-Y., Lee, S., Yun, Y., Lim, Y.-K., Taniguchi, K., Shin, T. 2014. A morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb in the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochemica* 116: 258-264.
- Park, J., Lee, W., Jeong, C., Kim, H., Taniguchi, K., Shin, T. 2012. Developmental changes affecting lectin binding in the vomeronasal organ of domestic pigs, *Sus scrofa*. *Acta Histochemica* 114: 24-30.
- Parkash, T., Kumar, P., Singh, G. 2016. Gross Anatomical and Light Microscopical Studies on Vomeronasal Organ of Young Pigs (*Sus scrofa*). 4: 5.
- Pérez-Gómez, A., Stein, B., Leinders-Zufall, T., Chamero, P. 2014. Signaling mechanisms and behavioral function of the mouse basal vomeronasal neuroepithelium. *Frontiers in Neuroanatomy* 8: 135.
- Pérez-Revuelta, L., Téllez de Meneses, P.G., López, M., Briñón, J.G., Weruaga, E., Díaz, D., Alonso, J.R. 2020. Secretagogin expression in the mouse olfactory bulb under sensory impairments. *Scientific Reports* 10: 21533.
- Peters, B.P., Goldstein, I.J. 1979. The use of fluorescein-conjugated *Bandeiraea simplicifolia* B4-isolectin as a histochemical reagent for the detection of α -D-galactopyranosyl groups. *Experimental Cell Research* 120: 321-334.
- Pihlström, H. 2008. Comparative Anatomy and Physiology of Chemical Senses in Aquatic Mammals. En Thewissen, J. G. M. (ed.), *Sensory Evolution on the Threshold: Adaptations in Secondary Aquatic Vertebrates*, pp. 0. University of California Press.
- Pincheira-Donoso, D., Hunt, J. 2017. Fecundity selection theory: concepts and evidence: Fecundity selection. *Biological Reviews* 92: 341-356.
- Plogmann, D., Kruska, D. 1990. Volumetric Comparison of Auditory Structures in the Brains of European Wild Boars (*Sus scrofa*) and Domestic Pigs (*Sus scrofa* f. dom.). *Brain, behavior and evolution* 35: 146-55.

- Policarpo, M., Baldwin, M.W., Casane, D., Salzburger, W. 2024. Diversity and evolution of the vertebrate chemoreceptor gene repertoire. *Nature Communications* 15: 1421.
- Popova, N.K. 2006. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *BioEssays* 28: 495-503.
- Porter, R.H., Blaustein, A.R. 1989. Mechanisms and ecological correlates of kin recognition. *Science Progress* 73: 53-66.
- Potter, S.M., Zheng, C., Koos, D.S., Feinstein, P., Fraser, S.E., Mombaerts, P. 2001. Structure and Emergence of Specific Olfactory Glomeruli in the Mouse. *The Journal of Neuroscience* 21: 9713-9723.
- Price, C.J., Banks, P.B., Brown, S., Latham, M.C., Latham, A.D.M., Pech, R.P., Norbury, G.L. 2020. Invasive mammalian predators habituate to and generalize avian prey cues: a mechanism for conserving native prey. *Ecological Applications* 30: .
- Price, E.O. 2002. *Animal domestication and behavior*. CABI Pub, Wallingford, Oxon, UK ; New York.
- Price, E.O. 1984. Behavioral aspects of animal domestication. *The quarterly review of biology* 59: 1-32.
- Prieto-Godino, L.L., Rytz, R., Bargeton, B., Abuin, L., Arguello, J.R., Peraro, M.D., Benton, R. 2016. Olfactory receptor pseudo-pseudogenes. *Nature* 539: 93-97.
- Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Ubeda-Bañon, I., Del Mar Arroyo-Jimenez, M., Marcos, P., Artacho-Pérula, E., Crespo, C. et al. 2007. Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *The Journal of Comparative Neurology* 504: 346-362.
- Purugganan, M.D. 2022. What is domestication? *Trends in Ecology & Evolution* 37: 663-671.
- Pusey, A., Wolf, M. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 201-206.
- Quay, W.B. 1959. Microscopic Structure and Variation in the Cutaneous Glands of the Deer, *Odocoileus virginianus*. *Journal of Mammalogy* 40: 114.
- Rafiq, K., Jordan, N.R., Meloro, C., Wilson, A.M., Hayward, M.W., Wich, S.A., McNutt, J.W. 2020. Scent-marking strategies of a solitary carnivore: boundary and road scent marking in the leopard. *Animal Behaviour* 161: 115-126.
- Rajanarayanan, S., Archunan, G. 2004. Occurrence of flehmen in male buffaloes (*Bubalus bubalis*) with special reference to estrus. *Theriogenology* 61: 861-866.
- Ramakers, G.J.A., Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Margolis, F.L., Van Bergen En Henegouwen, P.M.P., Gispen, W.H. 1992. Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in the mouse olfactory bulb: Predominant presence in preterminal axons. *Journal of Neurocytology* 21: 853-869.

- Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N.P.N., Bachor, O.A., Stevanović, S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
- Ramón y Cajal, S. 1904. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados : estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. Volumen II.
- Ramón y Cajal, S.R. 1902. Textura del lobulo olfativo accesorio. 1: 141-150.
- Rasmussen, L.E.L., Lee, T.D., Roelofs, W.L., Zhang, A., Daves, G.D. 1996. Insect pheromone in elephants. *Nature* 379: 684-684.
- Reep, R.L., Finlay, B.L., Darlington, R.B. 2007. The Limbic System in Mammalian Brain Evolution. *Brain, Behavior and Evolution* 70: 57-70.
- Reid, D.G., Jinchu, H., Yan, H. 1991. Ecology of the red panda *Ailurus fulgens* in the Wolong Reserve, China. *Journal of Zoology* 225: 347-364.
- Rekwot, P.I., Ogwu, D., Oyedipe, E.O., Sekoni, V.O. 2001. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal Reproduction Science* 65: 157-170.
- Retzius, G. 1894. Die Riechzellen der Ophidier in der Riechschleimhaut und im Jacobson'schen Organ. 48-51.
- Ring, G., Mezza, R.C., Schwob, J.E. 1997. Immunohistochemical identification of discrete subsets of rat olfactory neurons and the glomeruli that they innervate. *Journal of Comparative Neurology* 388: 415-434.
- Rivière, S., Challet, L., Fluegge, D., Spehr, M., Rodriguez, I. 2009. Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* 459: 574-577.
- Roberts, M.S., Gittleman, J.L. 1984. *Ailurus fulgens*. *Mammalian species*.
- Roberts, R.J., Gosling, L.M., Collins, S.A., Walters, R.L., Atkinson, N.W. 1996. Avoidance of Scent-Marked Areas Depends On the Intruder's Body Size. *Behaviour* 133: 491-502.
- Rodewald, A., Gisder, D., Gebhart, V.M., Oehring, H., Jirikowski, G.F. 2016. Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 77: 19-23.
- Rodolfo-Masera, T. 1943. Su l'esistenza di un particolare organo olfattivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 48: 157-213.
- Rodriguez, I., Feinstein, P., Mombaerts, P. 1999. Variable Patterns of Axonal Projections of Sensory Neurons in the Mouse Vomeronasal System. *Cell* 97: 199-208.
- Rodriguez, I., Greer, C.A., Mok, M.Y., Mombaerts, P. 2000. A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nature Genetics* 26: 18-19.

- Rodriguez, I., Mombaerts, P. 2002. Novel human vomeronasal receptor-like genes reveal species-specific families. *Current biology: CB* 12: R409-411.
- Roppolo, D., Ribaud, V., Jungo, V.P., Lüscher, C., Rodriguez, I. 2006. Projection of the Grüneberg ganglion to the mouse olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* 23: 2887-2894.
- Ryba, N.J.P., Tirindelli, R. 1997. A New Multigene Family of Putative Pheromone Receptors. *Neuron* 19: 371-379.
- Saksena, S., Chandra, G. 1980. Gross histological and certain histochemical observations on the vomeronasal organ of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Indian Journal of Animal Health (India)*.
- Salazar, I., Barber, P.C., Cifuentes, J.M. 1992. Anatomical and immunohistological demonstration of the primary neural connections of the vomeronasal organ in the dog. *The Anatomical Record* 233: 309-313.
- Salazar, I., Cifuentes, J.M., Quinteiro, P.S., Caballero, G. 1994a. The vomeronasal system of the mink, *Mustela vison*. I. The vomeronasal organ. *Functional and Developmental Morphology* 4: 113-117.
- Salazar, I., Cifuentes, J.M., Quinteiro, P.S., Caballero, T.G. 1994b. Structural, morphometric, and immunohistological study of the accessory olfactory bulb in the dog. *The Anatomical Record* 240: 277-285.
- Salazar, I., Cifuentes, J.M., Sánchez-Quinteiro, P. 2013. Morphological and Immunohistochemical Features of the Vomeronasal System in Dogs. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 296: 146-155.
- Salazar, I., Fdez de Troconiz, P., Prieto, M.D., Cifuentes, J.M., Quinteiro, P.S. 1996a. Anatomy and Cholinergic Innervation of the Sinus paranasalis in Dogs. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* 25: 49-53.
- Salazar, I., Lombardero, M., Alemañ, N., Sánchez Quinteiro, P. 2003a. Development of the vomeronasal receptor epithelium and the accessory olfactory bulb in sheep. *Microscopy Research and Technique* 61: 438-447.
- Salazar, I., Lombardero, M., Cifuentes, J.M., Quinteiro, P.S., Aleman, N. 2003b. Morphogenesis and growth of the soft tissue and cartilage of the vomeronasal organ in pigs. *Journal of Anatomy* 202: 503-514.
- Salazar, I., Quinteiro, P.S., Alemañ, N., Cifuentes, J.M., Troconiz, P.F. 2007. Diversity of the vomeronasal system in mammals: The singularities of the sheep model. *Microscopy Research and Technique* 70: 752-762.
- Salazar, I., Quinteiro, P.S., Cifuentes, J.M. 1995. Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 177: 475-481.

- Salazar, I., Quinteiro, P.S., Cifuentes, J.M. 1997a. The Soft-tissue Components of the Vomeronasal Organ in Pigs, Cows and Horses. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 26: 179-186.
- Salazar, I., Quinteiro, P.S., Cifuentes, J.M., Lombardero, M. 1998. The Accessory Olfactory Bulb of the Mink, *Mustela vison*: a Morphological and Lectin Histochemical Study. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* 27: 297-300.
- Salazar, I., Rueda, A., Cifuentes, J.M. 1984. Anatomy of the vomeronasal organ in the dog. *Folia Morphologica* 32: 331-341.
- Salazar, I., Sánchez Quinteiro, P. 2003. Differential development of binding sites for four lectins in the vomeronasal system of juvenile mouse: from the sensory transduction site to the first relay stage. *Brain Research* 979: 15-26.
- Salazar, I., Sánchez Quinteiro, P. 1998a. Lectin binding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. *Anatomy and Embryology* 198: 331-339.
- Salazar, I., Sánchez Quinteiro, P., Cifuentes, J.M., Fernández, P., Lombardero, M. 1997b. Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. *The Anatomical Record* 247: 129-136.
- Salazar, I., Sanchez Quinteiro, P., Cifuentes, J.M., Garcia Caballero, T. 1996b. The vomeronasal organ of the cat. *Journal of Anatomy* 188 (Pt 2): 445-454.
- Salazar, I., Sánchez Quinteiro, P., Lombardero, M., Aleman, N., Fernández de Trocóniz, P. 2004. The Prenatal Maturity of the Accessory Olfactory Bulb in Pigs. *Chemical Senses* 29: 3-11.
- Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P. 2011. A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microscopy Research and Technique* 74: 1109-1120.
- Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P. 1998b. Supporting tissue and vasculature of the mammalian vomeronasal organ: The rat as a model. *Microscopy Research and Technique* 41: 492-505.
- Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P. 2009. The risk of extrapolation in neuroanatomy: the case of the mammalian accessory olfactory bulb. *Frontiers in Neuroanatomy* 3: .
- Salazar, I., Sánchez-Quinteiro, P., Alemañ, N., Prieto, D. 2008. Anatomical, immunohistochemical and physiological characteristics of the vomeronasal vessels in cows and their possible role in vomeronasal reception. *Journal of Anatomy* 212: 686-696.
- Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Cifuentes, J.M., De Troconiz, P.F. 2006. General organization of the perinatal and adult accessory olfactory bulb in mice. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 288A: 1009-1025.

- Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Lombardero, M., Cifuentes, J.M. 2000. A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. *Journal of Anatomy* 196: 15-22.
- Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Lombardero, M., Cifuentes, J.M. 2001. Histochemical Identification of Carbohydrate Moieties in the Accessory Olfactory Bulb of the Mouse Using a Panel of Lectins. *Chemical Senses* 26: 645-652.
- Sam, M., Vora, S., Malnic, B., Ma, W., Novotny, M.V., Buck, L.B. 2001. Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature* 412: 142-142.
- Sánchez-Villagra, M.R. 2001. Ontogenetic and phylogenetic transformations of the vomeronasal complex and nasal floor elements in marsupial mammals. *Zoological Journal of the Linnean Society* 131: 459-479.
- Scalia, F., Winans, S.S. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *The Journal of Comparative Neurology* 161: 31-55.
- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., Perrier, G. 2003. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424: 68-72.
- Schmid, A., Pyrski, M., Biel, M., Leinders-Zufall, T., Zufall, F. 2010. Grueneberg Ganglion Neurons Are Finely Tuned Cold Sensors. *Journal of Neuroscience* 30: 7563-7568.
- Schneider, N.Y., Fletcher, T.P., Shaw, G., Renfree, M.B. 2012. *Goα* Expression in the Vomeronasal Organ and Olfactory Bulb of the Tamar Wallaby. *Chemical Senses* 37: 567-577.
- Schneider, N.Y., Fletcher, T.P., Shaw, G., Renfree, M.B. 2008. The vomeronasal organ of the tamar wallaby. *Journal of Anatomy* 213: 93-105.
- Schoenfeld, T.A., Clancy, A.N., Forbes, W.B., Macrides, F. 1994. The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. Part I: Receptor neuron projections to the main olfactory bulb. *Brain Research Bulletin* 34: 183-210.
- Schröder, H., Moser, N., Huggenberger, S. 2020. The Mouse Olfactory System. En Schröder, H., Moser, N., Huggenberger, S. (eds.), *Neuroanatomy of the Mouse: An Introduction*, pp. 319-331. Springer International Publishing, Cham.
- Schulte, B.A., Müller-Schwarze, D., Tang, R., Webster, F.X. 1994. Beaver (*Castor canadensis*) responses to major phenolic and neutral compounds in castoreum. *Journal of Chemical Ecology* 20: 3063-3081.
- Sergiel, A., Naves, J., Kujawski, P., Maślak, R., Serwa, E., Ramos, D., Fernández-Gil, A. et al. 2017. Histological, chemical and behavioural evidence of pedal communication in brown bears. *Scientific Reports* 7: 1052.

Serpell, J. 2017. *The Domestic Dog*. Cambridge University Press.

- Serwańska-Leja, K., Juzwa, W., Uzar, T. 2023. Comparative Anatomy and Functioning of Olfactory Tract in Selected Canidae. *Polish Journal of Environmental Studies* 32: 2787-2794.
- Shabadash, S.A., Zelikina, T.I. 1997. [The caudal gland in the cat is a hepatoid gland]. *Izvestiia Akademii Nauk. Serii Biologicheskoi* 556-570.
- Shapiro, L.S., Halpern, M., Ee, P.-L. 1995. Lectin histochemical identification of carbohydrate moieties in opossum chemosensory systems during development, with special emphasis on VVA-identified subdivisions in the accessory olfactory bulb. *Journal of Morphology* 224: 331-349.
- Shepherd, G.M. ed. . 2004. *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press.
- Sherborne, A.L., Thom, M.D., Paterson, S., Jury, F., Ollier, W.E.R., Stockley, P., Beynon, R.J., Hurst, J.L. 2007. The Genetic Basis of Inbreeding Avoidance in House Mice. *Current Biology* 17: 2061-2066.
- Shinoda, K., Shiotani, Y., Osawa, Y. 1989. “Necklace olfactory glomeruli” form unique components of the rat primary olfactory system. *Journal of Comparative Neurology* 284: 362-373.
- Shinohara, H., Asano, T., Kato, K. 1992. Differential localization of G-proteins Gi and Go in the accessory olfactory bulb of the rat. *The Journal of Neuroscience* 12: 1275-1279.
- Singh, P.B., Brown, R.E., Roser, B. 1987. MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature* 327: 161-164.
- Smear, M., Resulaj, A., Zhang, J., Bozza, T., Rinberg, D. 2013. Multiple perceptible signals from a single olfactory glomerulus. *Nature Neuroscience* 16: 1687-1691.
- Smith, T.D., Alport, L.J., Burrows, A.M., Bhatnagar, K.P., Dennis, J.C., Tuladhar, P., Morrison, E.E. 2007. Perinatal size and maturation of the olfactory and vomeronasal neuroepithelia in lorisooids and lemuroids. *American Journal of Primatology* 69: 74-85.
- Smith, T.D., Garrett, E.C., Bhatnagar, K.P., Bonar, C.J., Bruening, A.E., Dennis, J.C., Kinzinger, J.H. et al. 2011. The Vomeronasal Organ of New World Monkeys (Platyrrhini). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 294: 2158-2178.
- Smith, T.D., Muchlinski, M.N., Bhatnagar, K.P., Durham, E.L., Bonar, C.J., Burrows, A.M. 2015. The vomeronasal organ of *Lemur catta*: *Lemur catta* VNO. *American Journal of Primatology* 77: 229-238.
- Smith, T.D., Siegel, M.I., Bhatnagar, K.P. 2001. Reappraisal of the vomeronasal system of catarrhine primates: Ontogeny, morphology, functionality, and persisting questions. *The Anatomical Record* 265: 176-192.
- Stensmyr, M.C. 2016. Evolutionary Genetics: Smells like a Pseudo-pseudogene. *Current Biology* 26: R1294-R1296.

- Storan, M.J., Key, B. 2006. Septal organ of Grüneberg is part of the olfactory system. *The Journal of Comparative Neurology* 494: 834-844.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., Koentges, G. 2002. Loss of Sex Discrimination and Male-Male Aggression in Mice Deficient for TRP2. *Science* 295: 1493-1500.
- Stowers, L., Marton, T.F. 2005. What Is a Pheromone? Mammalian Pheromones Reconsidered. *Neuron* 46: 699-702.
- Strotmann, J. 2004. Olfactory Receptor Proteins in Axonal Processes of Chemosensory Neurons. *Journal of Neuroscience* 24: 7754-7761.
- Suárez, R., Fernández-Aburto, P., Manger, P.R., Mpodozis, J. 2011a. Deterioration of the Gao Vomeronasal Pathway in Sexually Dimorphic Mammals. *PLoS ONE* 6: e26436.
- Suárez, R., Santibáñez, R., Parra, D., Coppi, A.A., Abrahão, L.M.B., Sasahara, T.H.C., Mpodozis, J. 2011b. Shared and differential traits in the accessory olfactory bulb of caviomorph rodents with particular reference to the semiaquatic capybara: The AOB of capybaras and other caviomorphs. *Journal of Anatomy* 218: 558-565.
- Swaney, W.T., Keverne, E.B. 2009. The evolution of pheromonal communication. *Behavioural Brain Research* 200: 239-247.
- Switzer, III., R.C., Johnson, J.I., Kirsch, J.A.W. 1980. Phylogeny Through Brain Traits. *Brain, Behavior and Evolution* 17: 339-363.
- Tachibana, T., Fujiwara, N., Nawa, T. 1990. The ultrastructure of the ganglionated nerve plexus in the nasal vestibular mucosa of the musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora). *Archives of Histology and Cytology* 53: 147-156.
- Takahashi, L.K., Nakashima, B.R., Hong, H., Watanabe, K. 2005. The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29: 1157-1167.
- Takahashi, Y., Kaba, H. 2010. Muscarinic receptor type 1 (M1) stimulation, probably through KCNQ/Kv7 channel closure, increases spontaneous GABA release at the dendrodendritic synapse in the mouse accessory olfactory bulb. *Brain Research* 1339: 26-40.
- Takami, S. 2002. Recent progress in the neurobiology of the vomeronasal organ. *Microscopy Research and Technique* 58: 228-250.
- Takami, S., Fernandez, G.D., Graziadei, P.P.C. 1992a. The morphology of GABA-immunoreactive neurons in the accessory olfactory bulb of rats. *Brain Research* 588: 317-323.
- Takami, S., Getchell, M.L., Getchell, T.V. 1994. Lectin histochemical localization of galactose, N-acetylgalactosamine, and N-acetylglucosamine in glycoconjugates of the rat vomeronasal organ, with comparison to the olfactory and septal mucosae. *Cell and Tissue Research* 277: 211-230.

- Takami, S., Getchell, M.L., Getchell, T.V. 1995. Resolution of sensory and mucoid glycoconjugates with terminal β -galactose residues in the mucomicrovillar complex of the vomeronasal sensory epithelium by dual confocal laser scanning microscopy. *Cell and Tissue Research* 280: 211-216.
- Takami, S., Graziadei, P.P.C., Ichikawa, M. 1992b. The differential staining patterns of two lectins in the accessory olfactory bulb of the rat. *Brain Research* 598: 337-342.
- Takigami, S. 2004. Morphological Evidence for Two Types of Mammalian Vomeronasal System. *Chemical Senses* 29: 301-310.
- Takigami, S., Mori, Y., Ichikawa, M. 2000. Projection Pattern of Vomeronasal Neurons to the Accessory Olfactory Bulb in Goats. *Chemical Senses* 25: 387-393.
- Taniguchi, K., Mikami, S. 1985. Fine structure of the epithelia of the vomeronasal organ of horse and cattle: A comparative study. *Cell and Tissue Research* 240: .
- Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., Schuenemann, V.J., Sawyer, S.K., Greenfield, D.L., Germonpré, M.B. et al. 2013. Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs. *Science* 342: 871-874.
- Tinnesand, H.V., Buesching, C.D., Noonan, M.J., Newman, C., Zedrosser, A., Rosell, F., Macdonald, D.W. 2015. Will Trespassers Be Prosecuted or Assessed According to Their Merits? A Consilient Interpretation of Territoriality in a Group-Living Carnivore, the European Badger (*Meles meles*) Zimmermann, E. (ed.),. *PLOS ONE* 10: e0132432.
- Tirindelli, R., Mucignat-Caretta, C., Ryba, N.J.P. 1998. Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends in Neurosciences* 21: 482-486.
- Toftegaard, C.L., Bradley, A.J. 1999. Structure of specialized osmetrichia in the brown antechinus *Antechinus stuartii* (Marsupialia: Dasyuridae). *Journal of Zoology* 248: 27-30.
- Tomiyasu, J., Kondoh, D., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Haneda, S., Matsui, M. 2018. Lectin histochemical studies on the olfactory gland and two types of gland in vomeronasal organ of the brown bear. *Acta Histochemica* 120: 566-571.
- Tomiyasu, J., Kondoh, D., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Sasaki, M., Kitamura, N., Haneda, S., Matsui, M. 2017. Morphological and histological features of the vomeronasal organ in the brown bear. *Journal of Anatomy* 231: 749-757.
- Tomiyasu, J., Korzekwa, A., Kawai, Y.K., Robstad, C.A., Rosell, F., Kondoh, D. 2022. The vomeronasal system in semiaquatic beavers. *Journal of Anatomy* 241: 809-819.
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Ferreira, A., Rois, J.L., Sanchez-Quinteiro, P. 2023a. Immunohistological study of the unexplored vomeronasal organ of an endangered mammal, the dama gazelle (*Nanger dama*). *Microscopy Research and Technique* 86: 1206-1233.

- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Ferreiro, A., Rois, J.L., Sanchez-Quinteiro, P. 2021. Neuroanatomical and Immunohistological Study of the Main and Accessory Olfactory Bulbs of the Meerkat (*Suricata suricatta*). *Animals* 12: 91.
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Sanchez-Quinteiro, P. 2023b. Pheromone Sensing in Mammals: A Review of the Vomeronasal System. *Anatomia* 2: 346-413.
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P.R., Ferreiro, A., Rois, J.L., Sanchez-Quinteiro, P. 2022. Does a third intermediate model for the vomeronasal processing of information exist? Insights from the macropodid neuroanatomy. *Brain Structure and Function* 227: 881-899.
- Torres, M.V., Ortiz-Leal, I., Villamayor, P.R., Ferreiro, A., Rois, J.L., Sanchez-Quinteiro, P. 2020. The vomeronasal system of the newborn capybara: a morphological and immunohistochemical study. *Scientific Reports* 10: 13304.
- Trinh, K., Storm, D.R. 2003. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature Neuroscience* 6: 519-525.
- Trut, L. 1999. Early Canid Domestication: The Farm-Fox Experiment. *American Scientist* 87: 160.
- Trut, L., Oskina, I., Kharlamova, A. 2009. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *BioEssays* 31: 349-360.
- Vaccarezza, O.L., Sepich, L.N., Tramezzani, J.H. 1981. The vomeronasal organ of the rat. *Journal of Anatomy* 132: 167-185.
- van Beeck Calkoen, S.T.S., Kreikenbohm, R., Kuijper, D.P.J., Heurich, M. 2021. Olfactory cues of large carnivores modify red deer behavior and browsing intensity Snell-Rood, E. (ed.),. *Behavioral Ecology* 32: 982-992.
- van Valkenburgh, B., Pang, B., Bird, D., Curtis, A., Yee, K., Wysocki, C., Craven, B.A. 2014. Respiratory and Olfactory Turbinals in Feliform and Caniform Carnivorans: The Influence of Snout Length. *The Anatomical Record* 297: 2065-2079.
- Valverde, F., López-Mascaraque, L., De Carlos, J.A. 1989. Structure of the nucleus olfactorius anterior of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Journal of Comparative Neurology* 279: 581-600.
- Vargas-Barroso, V., Peña-Ortega, F., Larriva-Sahd, J.A. 2017. Olfaction and Pheromones: Unconventional Sensory Influences and Bulbar Interactions. *Frontiers in Neuroanatomy* 11: 108.
- Vazquez, N., König, H.E., Jerbi, H., Pérez, W. 2018. Gross anatomy of the nose, nasal cavity and larynx in the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758). *Anatomical Science* 1: .

- Vedin, V., Eriksson, B., Berghard, A. 2010. Organization of the chemosensory neuroepithelium of the vomeronasal organ of the Scandinavian moose *Alces alces*. *Brain Research* 1306: 53-61.
- Verhaagen, J., Oestreicher, A., Gispen, W., Margolis, F. 1989. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *The Journal of Neuroscience* 9: 683-691.
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J.E., Amorim, I.R., Rice, J.E., Honeycutt, R.L., Crandall, K.A. et al. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* 276: 1687-1689.
- Villafranca-Faus, M., Vila-Martín, M.E., Esteve, D., Merino, E., Teruel-Sanchis, A., Cervera-Ferri, A., Martínez-Ricós, J. et al. 2021. Integrating pheromonal and spatial information in the amygdalo-hippocampal network. *Nature Communications* 12: 5286.
- Villamayor, P.R., Cifuentes, J.M., Fdz.-de-Troconiz, P., Sanchez-Quinteiro, P. 2018. Morphological and immunohistochemical study of the rabbit vomeronasal organ. *Journal of Anatomy* 233: 814-827.
- Villamayor, P.R., Cifuentes, J.M., Quintela, L., Barcia, R., Sanchez-Quinteiro, P. 2020. Structural, morphometric and immunohistochemical study of the rabbit accessory olfactory bulb. *Brain Structure and Function* 225: 203-226.
- Vogt, K. 2015. *Olfactory communication and hunting behaviour of Eurasian lynx Lynx lynx in the Northwestern Swiss Alps*. Thesis. University_of_Basel.
- Vogt, K., Boos, S., Breitenmoser, U., Kölliker, M. 2016. Chemical composition of Eurasian lynx urine conveys information on reproductive state, individual identity, and urine age. *Chemoecology* 26: 205-217.
- Vonholdt, B.M., Pollinger, J.P., Lohmueller, K.E., Han, E., Parker, H.G., Quignon, P., Degenhardt, J.D. et al. 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464: 898-902.
- Voznessenskaya, V.V. 2014. Influence of Cat Odor on Reproductive Behavior and Physiology in the House Mouse: (Mus Musculus). En Mucignat-Caretta, C. (ed.), *Neurobiology of Chemical Communication*, Frontiers in Neuroscience, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Wagner, L., Oliyarnyk, O., Gartner, W., Nowotny, P., Groeger, M., Kaserer, K., Waldhäusl, W., Pasternack, M.S. 2000. Cloning and Expression of Secretagogen, a Novel Neuroendocrine- and Pancreatic Islet of Langerhans-specific Ca²⁺-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 275: 24740-24751.
- Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Okamura, H., Mori, Y., Ichikawa, M. 2007. Expression of a vomeronasal receptor gene (V1r) and G protein α subunits in goat, *Capra hircus*, olfactory receptor neurons. *Journal of Comparative Neurology* 503: 371-380.

- Walz, A., Feinstein, P., Khan, M., Mombaerts, P. 2007. Axonal wiring of guanylate cyclase-D-expressing olfactory neurons is dependent on neuropilin 2 and semaphorin 3F. *Development (Cambridge, England)* 134: 4063-4072.
- Wang, X., Pipes, L., Trut, L.N., Herbeck, Y., Vladimirova, A.V., Gulevich, R.G., Kharlamova, A.V. et al. 2018. Genomic responses to selection for tame/aggressive behaviors in the silver fox (*Vulpes vulpes*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 10398-10403.
- Weiler, E. 2005. Postnatal Development of the Rat Vomeronasal Organ. *Chemical Senses* 30: i127-i128.
- Weiler, E., Benali, A. 2005. Olfactory epithelia differentially express neuronal markers. *Journal of Neurocytology* 34: 217-240.
- Weiler, E., Farbman, A.I. 2003. The Septal Organ of the Rat During Postnatal Development. *Chemical Senses* 28: 581-593.
- Weiler, E., McCulloch, M.A., Farbman, A.I. 1999. Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development. *The European Journal of Neuroscience* 11: 700-711.
- Wekesa, K.S., Anholt, R.R.H. 1999. Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system. *Brain Research* 837: 117-126.
- Weruaga, E., Briñón, J.G., Porteros, A., Arévalo, R., Aijón, J, Alonso, J.R. 2001. A Sexually Dimorphic Group of Atypical Glomeruli in the Mouse Olfactory Bulb. *Chemical Senses* 26: 7-15.
- Wetschureck, N., Offermanns, S. 2005. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews* 85: 1159-1204.
- Wilkins, A.S., Wrangham, R.W., Fitch, W.T. 2014. The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics* 197: 795-808.
- Winans, S.S., Scalia, F. 1970. Amygdaloid Nucleus: New Afferent Input from the Vomeronasal Organ. *Science* 170: 330-332.
- Witt, M., Georgiewa, B., Knecht, M., Hummel, T. 2002. On the chemosensory nature of the vomeronasal epithelium in adult humans. *Histochemistry and Cell Biology* 117: 493-509.
- Wöhrmann-Repenning, A. 1984a. Comparative anatomical studies of the vomeronasal complex and the rostral palate of various mammals. *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch* 130: 501-530.
- Wöhrmann-Repenning, A. 1984b. [Phylogenetic aspects of the Jacobson's organ and nasopalatine duct topography in insectivores, primates, Tupaia and Didelphis]. *Anatomischer Anzeiger* 157: 137-149.

- Wolff, J., Sherman, P.W. eds. . 2007. *Rodent societies: an ecological & evolutionary perspective*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wood, W.F. 1997. 2-Methylbutanoic acid and 2-nonanone from the metatarsal glands of impala, *Aepyceros melampus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 275.
- Wood, W.F. 2003. Volatile Components in Metatarsal Glands of Sika Deer, *Cervus nippon*. *Journal of Chemical Ecology* 29: 2729-2733.
- Wood, W.F., Shaffer, T.B., Kubo, A. 1995. Volatile ketones from interdigital glands of black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *Journal of Chemical Ecology* 21: 1401-1408.
- Woodley, S.K., Cloe, A.L., Waters, P., Baum, M.J. 2004. Effects of Vomeronasal Organ Removal on Olfactory Sex Discrimination and Odor Preferences of Female Ferrets. *Chemical Senses* 29: 659-669.
- Woszczyło, M., Jezierski, T., Szumny, A., Nizański, W., Dziecioł, M. 2020. The Role of Urine in Semiochemical Communication between Females and Males of Domestic Dog (*Canis familiaris*) during Estrus. *Animals* 10: 2112.
- Wouterlood, F.G., Härtig, W. 1995. Calretinin-immunoreactivity in mitral cells of the rat olfactory bulb. *Brain Research* 682: 93-100.
- Wyatt, T.D. 2013. *Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures*. 2.^a ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wysocki, C., Nyby, J., Whitney, G., Beauchamp, G., Katz, Y. 1982. The vomeronasal organ: Primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiology & Behavior* 29: 315-327.
- Wysocki, C.J. 1979. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 3: 301-341.
- Wysocki, C.J., Cowart, B.J., Radil, T. 2003. Nasal trigeminal chemosensitivity across the adult life span. *Perception & Psychophysics* 65: 115-122.
- Wysocki, C.J., Lepri, J.J. 1991. Consequences of removing the vomeronasal organ. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 39: 661-669.
- Yamagiwa, Y., Kurata, M., Satoh, H. 2022. Histological Features of the Nasal Passage in Juvenile Japanese White Rabbits. *Toxicologic Pathology* 50: 218-231.
- Yan, X., Joshi, A., Zang, Y., Assunção, F., Fernandes, H.M., Hummel, T. 2022. The Shape of the Olfactory Bulb Predicts Olfactory Function. *Brain Sciences* 12: 128.
- Yang, W., Choi, Y., Park, C., Lee, K.-H., Ahn, M., Kang, W., Heo, S.-D. et al. 2021. Histological and lectin histochemical studies in the vomeronasal organ of the Korean black goat, *Capra hircus coreanae*. *Acta Histochemica* 123: 151684.

- Yildiz, N., Akkoç, C.Ö., Arican, L. 2008. Vomeronasal organ in labrador retriever dog (*canis familiaris*). *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 52: 185–188.
- Yohe, L.R., Davies, K.T.J., Rossiter, S.J., Dávalos, L.M. 2019. Expressed Vomeronasal Type-1 Receptors (V1rs) in Bats Uncover Conserved Sequences Underlying Social Chemical Signaling Chang, B. (ed.),. *Genome Biology and Evolution* 11: 2741-2749.
- Yohe, L.R., Hoffmann, S., Curtis, A. 2018. Vomeronasal and Olfactory Structures in Bats Revealed by DiceCT Clarify Genetic Evidence of Function. *Frontiers in Neuroanatomy* 12: .
- Yohe, L.R., Krell, N.T. 2023. An updated synthesis of and outstanding questions in the olfactory and vomeronasal systems in bats: Genetics asks questions only anatomy can answer. *The Anatomical Record*.25290.
- Yoshida-Matsuoka, J., Matsuoka, M., Costanzo, R.M., Ichikawa, M. 2000. Morphological and Histochemical Changes in the Regenerating Vomeronasal Epithelium. *Journal of Veterinary Medical Science* 62: 1253-1261.
- Young, J.M., Trask, B.J. 2007. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends in Genetics* 23: 212-215.
- Yu, L., Jin, W., Wang, J., Zhang, X., Chen, M., Zhu, Z., Lee, H. et al. 2010. Characterization of TRPC2, an essential genetic component of VNS chemoreception, provides insights into the evolution of pheromonal olfaction in secondary-adapted marine mammals. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1467-1477.
- Zeder, M. 2012a. Pathways to Animal Domestication. *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution, and Sustainability*227-259.
- Zeder, M.A. 2012b. The domestication of animals. *Journal of anthropological research* 68: 161-190.
- Zellmer, N.T., Timm-Davis, L.L., Davis, R.W. 2021. Sea Otter Behavior: Morphologic, Physiologic, and Sensory Adaptations. En Davis, R. W., Pagano, A. M. (eds.), *Ethology and Behavioral Ecology of Sea Otters and Polar Bears*, Ethology and Behavioral Ecology of Marine Mammals, pp. 23-55. Springer International Publishing, Cham.
- Zeuner, F.E. 1963. A history of domesticated animals. *A history of domesticated animals*.
- Zhang, J., Webb, D.M. 2003. Evolutionary deterioration of the vomeronasal pheromone transduction pathway in catarrhine primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8337-8341.
- Zhang, Z., Nikaido, M. 2020. Inactivation of ancV1R as a Predictive Signature for the Loss of Vomeronasal System in Mammals. *Genome Biology and Evolution* 12: 766-778.
- Zhao, H., Xu, D., Zhang, S., Zhang, J. 2011. Widespread Losses of Vomeronasal Signal Transduction in Bats. *Molecular Biology and Evolution* 28: 7-12.

- Zheng, L.M., Ravel, N., Jourdan, F. 1987. Topography of centrifugal acetylcholinesterase-positive fibres in the olfactory bulb of the rat: Evidence for original projections in atypical glomeruli. *Neuroscience* 23: 1083-1093.
- Zhou, G., Lane, G., Cooper, S.L., Kahnt, T., Zelano, C. 2019. Characterizing functional pathways of the human olfactory system. *eLife* 8: e47177.
- Zhou, Y., Shearwin-Whyatt, L., Li, J., Song, Z., Hayakawa, T., Stevens, D., Fenelon, J.C. et al. 2021. Platypus and echidna genomes reveal mammalian biology and evolution. *Nature* 592: 756-762.
- Zimmerman, A.D., Munger, S.D. 2021. Olfactory subsystems associated with the necklace glomeruli in rodents. *Cell and Tissue Research* 383: 549-557.
- Zufall, F., Munger, S.D. 2001. From odor and pheromone transduction to the organization of the sense of smell. *Trends in Neurosciences* 24: 191-193.
- Zuri, I., Fishelson, L., Terkel, J. 1998. Morphology and cytology of the nasal cavity and vomeronasal organ in juvenile and adult blind mole rats (*Spalax ehrenbergi*). *The Anatomical Record* 251: 460-471.

8 ANEXO I

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 19, 2024

This Agreement between University of Santiago de Compostela -- Pablo Sanchez-Quinteiro ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5732721127297

License date Feb 19, 2024

Licensed Content
Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content
Publication Journal of Anatomy

Licensed Content
Title The vomeronasal organ of wild canids: the fox (*Vulpes vulpes*) as a model

Licensed Content
Author Pablo Sanchez-Quinteiro, Ana López-Beceiro, Paula R. Villamayor, et al

Licensed Content
Date Jun 25, 2020

Licensed Content
Volume 237

Licensed Content
Issue 5

Licensed Content
Pages 17



Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of new work	Neuroanatomía comparada de la comunicación química en cánidos: un estudio de los sistemas vomeronasal y olfativo principal en perro, lobo y zorro
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Feb 2024
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Faculty of Veterinary Sciences of Lugo Lugo, other Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED

BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com.





Esta tesis investiga la comunicación química en cánidos, destacando cómo la domesticación ha modulado sus sistemas olfativos. Se utilizaron técnicas de anatomía e histología para examinar los subsistemas olfativos, revelando diferencias significativas en la expresión de proteínas y en la estructura celular. Los hallazgos sugieren adaptaciones únicas en cánidos salvajes para la percepción olfativa, incluyendo un sistema olfativo más complejo en el zorro y mecanismos de integración olfativa aún desconocidos en el lobo. A pesar de cierta uniformidad en los sistemas olfativos, se observó una involución en los perros, probablemente debido a la domesticación. Este estudio abre nuevas direcciones para investigaciones futuras en biología de la conservación y la relación entre domesticación, adaptación y evolución sensorial.