

FEROMONI E RISPOSTE NEUROENDOCRINE

RELAZIONI ODORI-ORMONI- COMPORTAMENTO SESSUALE

(Beach e Gilmore 1949)

- ✦ **Cani maschi riconoscono che la femmina è in calore dall'odore della sua orina**
- ✦ **Fino a questo studio si era sempre pensato che l'olfatto avesse un ruolo molto limitato nel controllo del comportamento**
- ✦ **Questo era rinforzato dalla teoria che l'uomo fosse un animale microsmatico con un sistema olfattivo vestigiale**

OLFATTO NEGLI ANNI 2000

- ✦ **I diversi tipi di recettori olfattivi sono almeno un migliaio**
- ✦ **12 milioni di cellule olfattive (uomo) e 50 milioni nel ratto**
- ✦ **Moltissimi ormoni sono stati identificati con funzione di neurotrasmettitori nel bulbo olfattivo**
- ✦ **Gli odori giocano un ruolo di primo piano nel controllo del comportamento riproduttivo e di altri comportamenti**

Different Sensory Modalities Employ Receptor Repertoires of Vastly Different Size



4



29

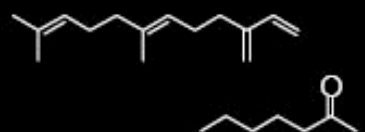
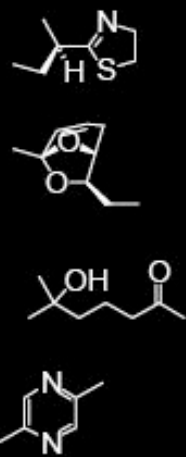


900

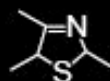
THE OLFACTORY SYSTEM AND INSTINCTIVE BEHAVIORS



PHEROMONES



PREDATOR ODORS



AGGRESSION



MATERNAL BEHAVIOR

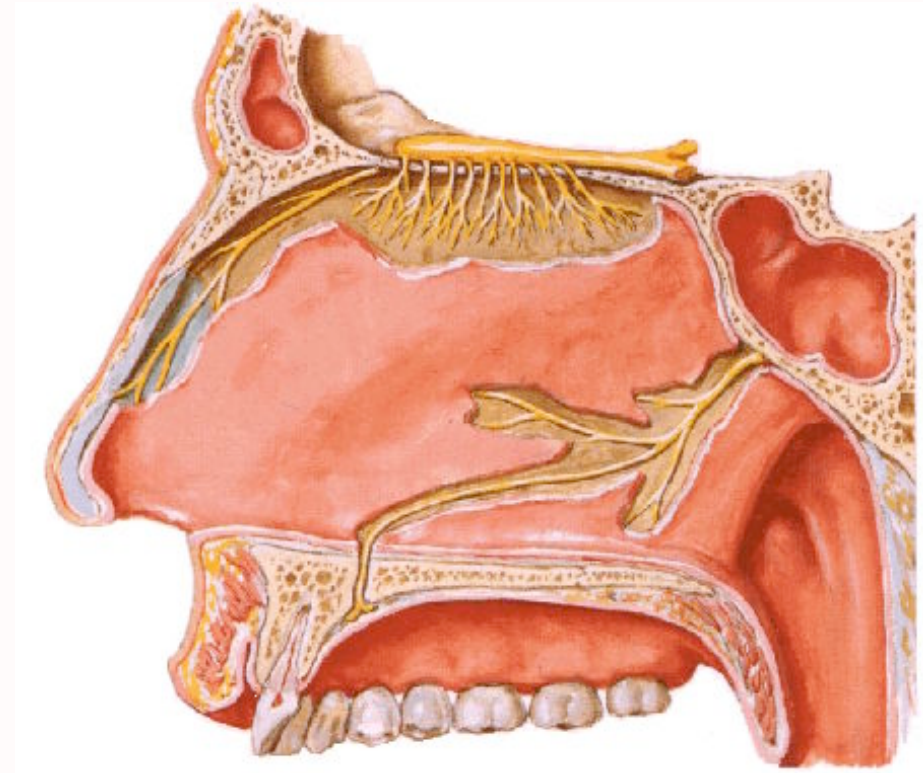


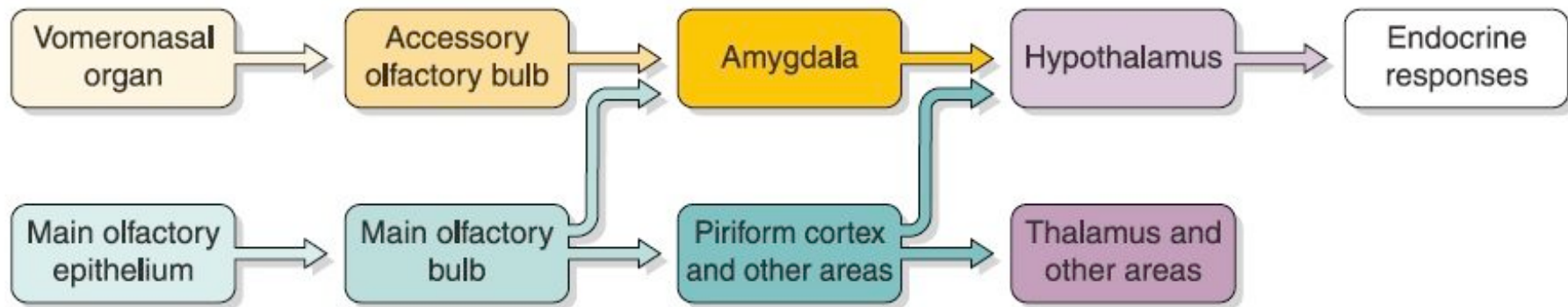
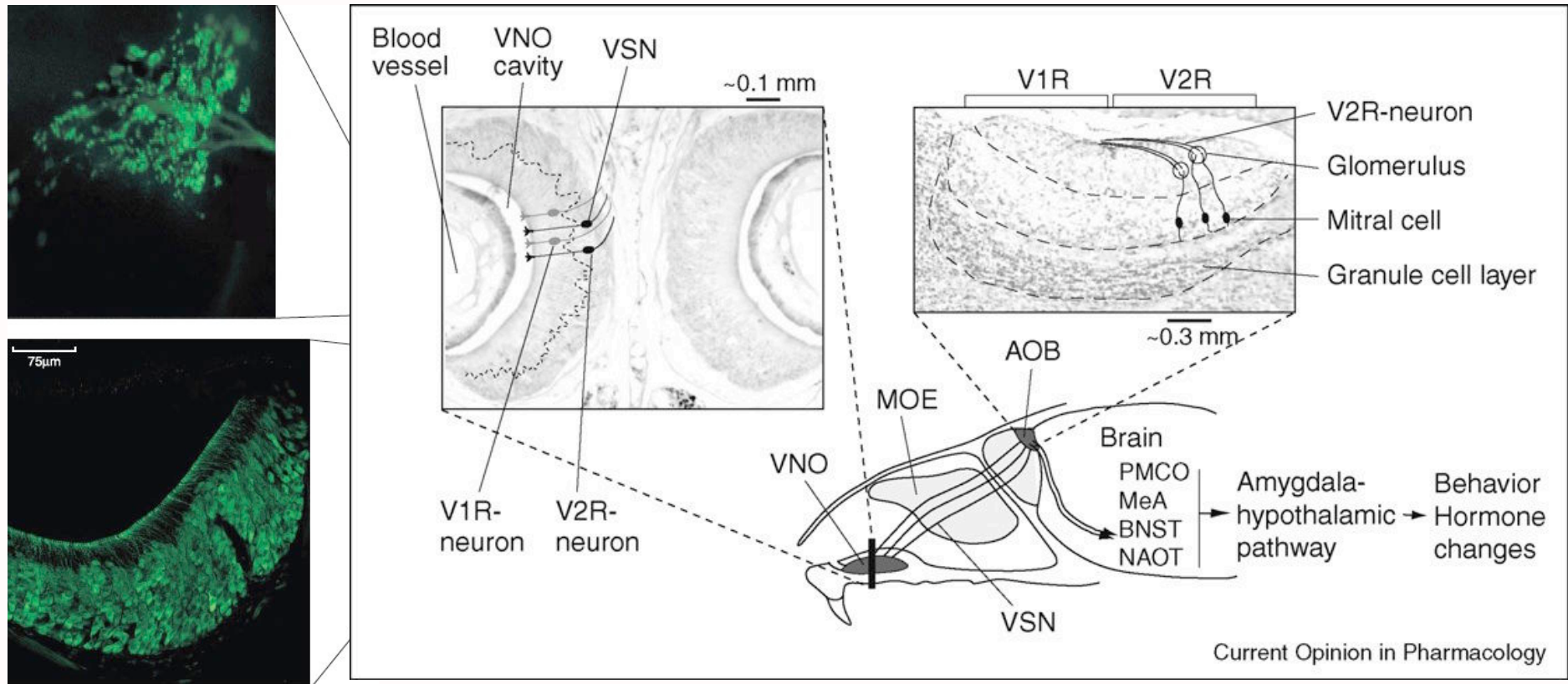
SEXUAL BEHAVIOR



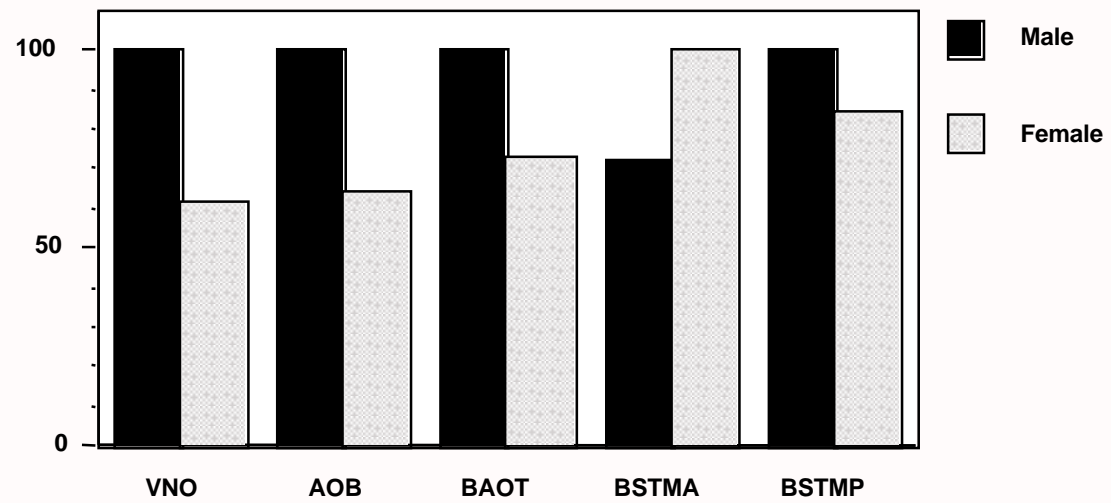
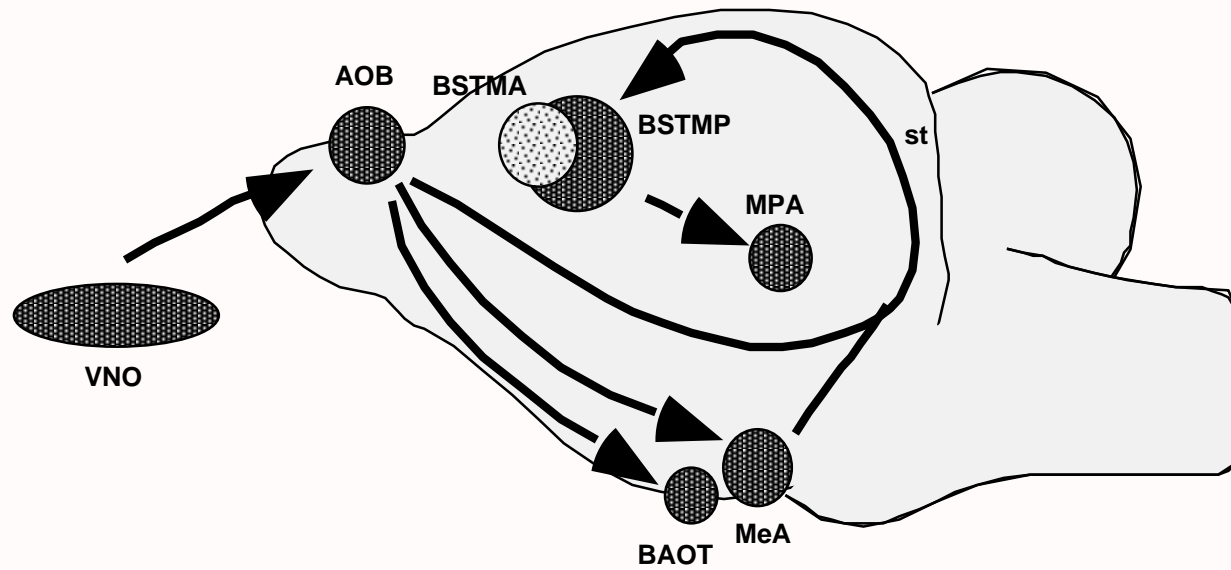
FEAR

- ◆ **Recettori olfattivi presenti nella mucosa olfattiva**
- ◆ **Bulbo olfattivo**
- ◆ **Proiezioni centrali che raggiungono vari distretti del telencefalo, ma anche del tronco**

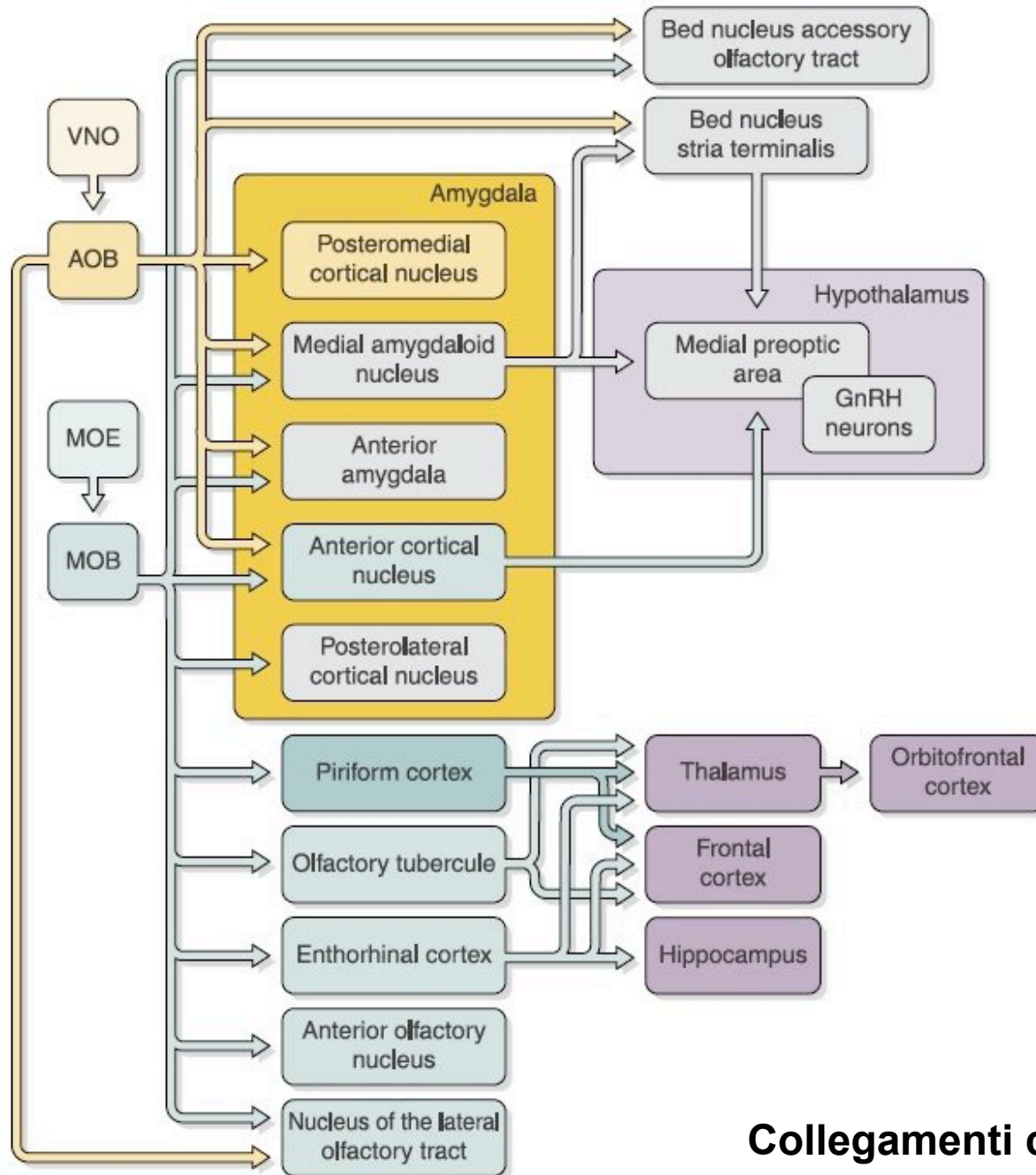




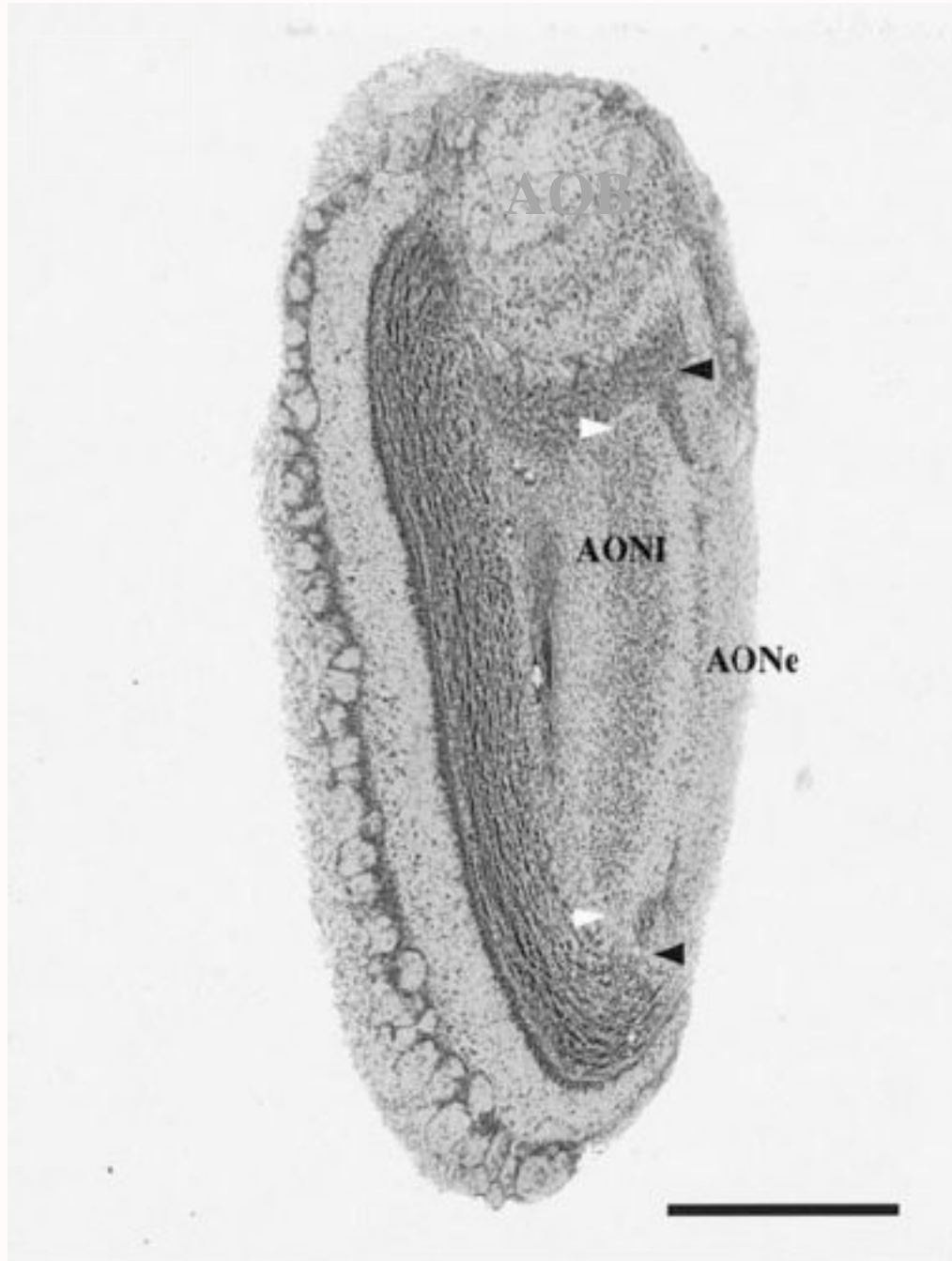
Schema della via olfattiva principale ed accessoria



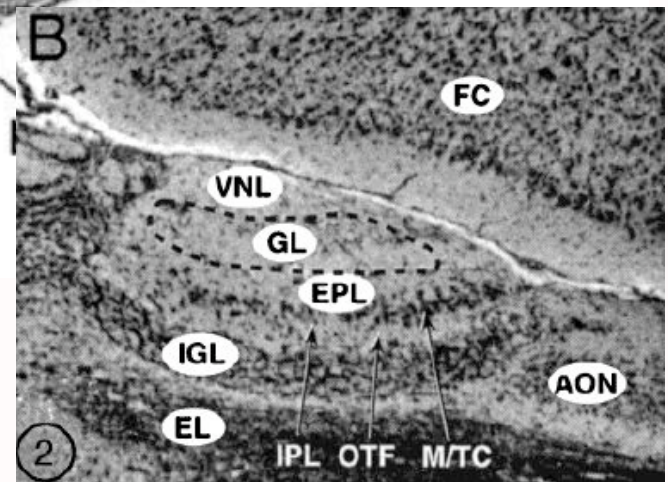
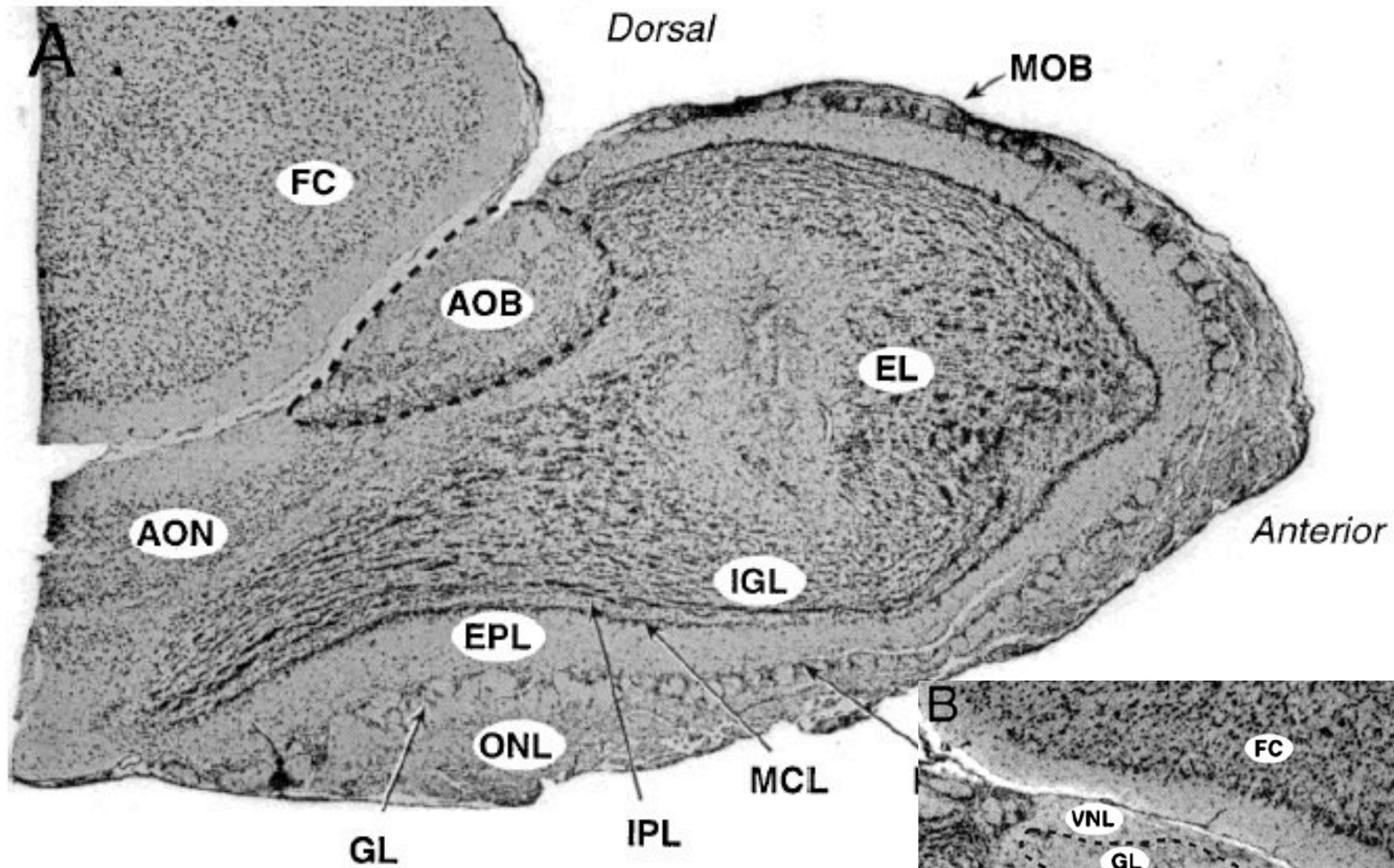
Il sistema olfattivo accessorio è sessualmente dimorfico a tutti i livelli



Collegamenti centrali della via olfattiva

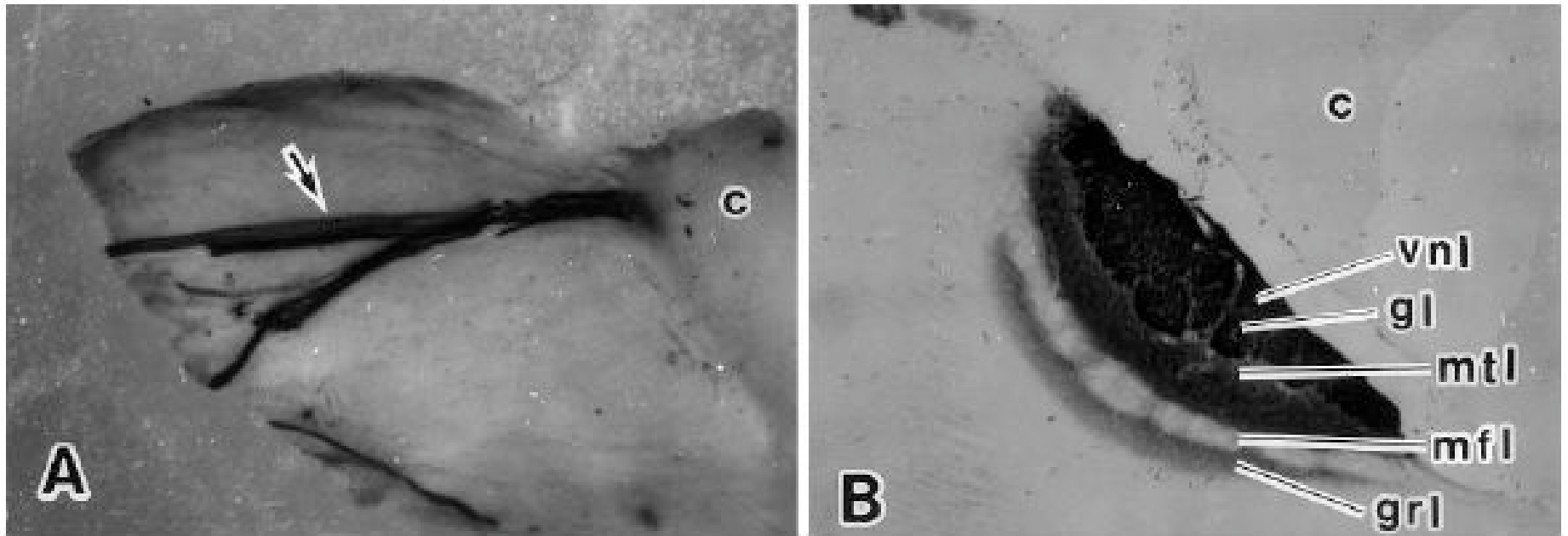


Organizzazione del bulbo olfattivo principale (e accessorio AOB) nei roditori (sezione coronale)

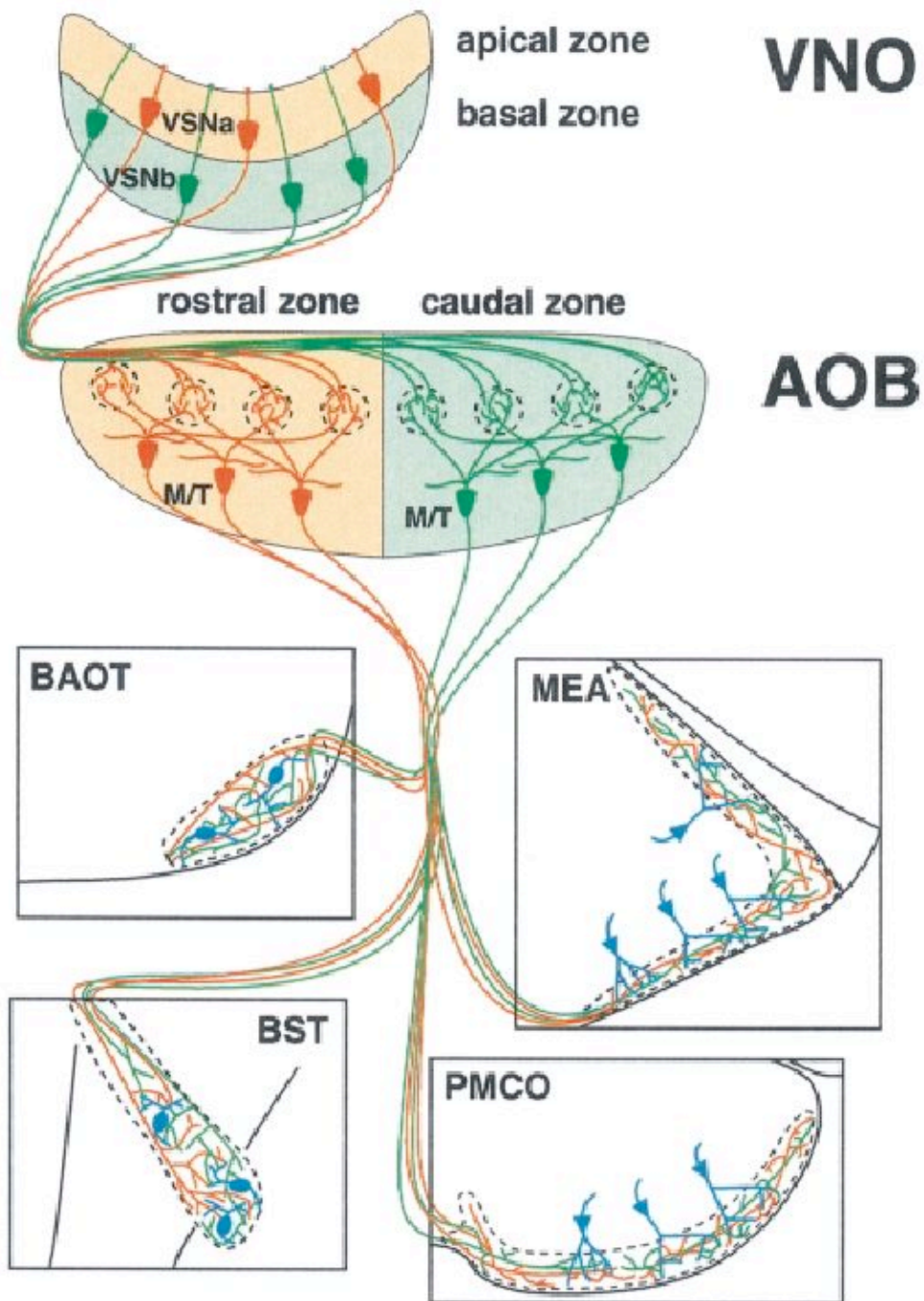


Sezione sagittale

ORGANIZZAZIONE DEL AOB



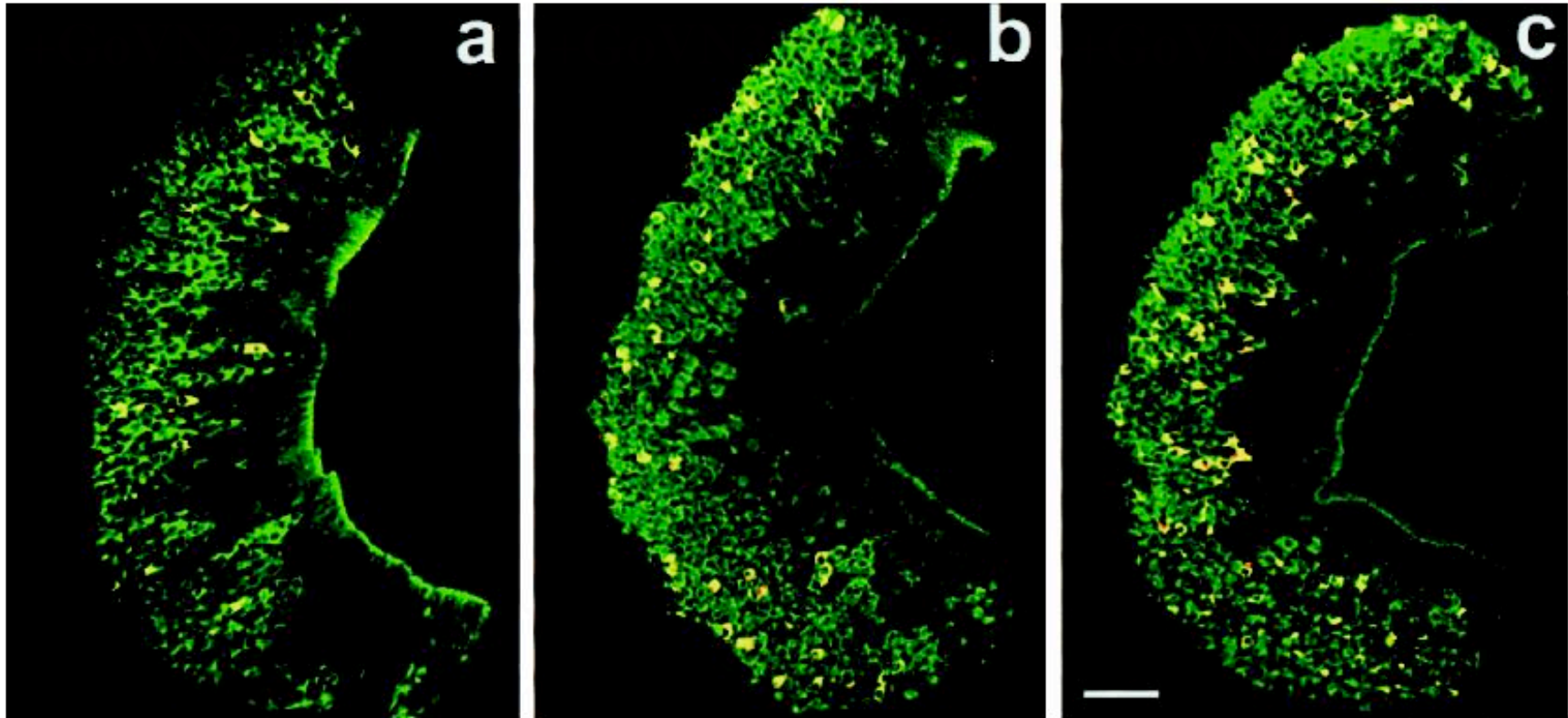
- ◆ A - Parete mediale del bulbo olfattivo con evidenziate le fibre provenienti dal bulbo olfattivo accessorio (AOB)
- ◆ B - AOB: vnl-vomeronasal nerve layer, gl-glomerular layer mtl-mitral cells layer, mfl-myelinated fiber layer, grl-granular layer



Asimmetria nelle proiezioni del VNO: la parte apicale proietta alla parte anteriore del AOB, la parte basale proietta alla parte caudale

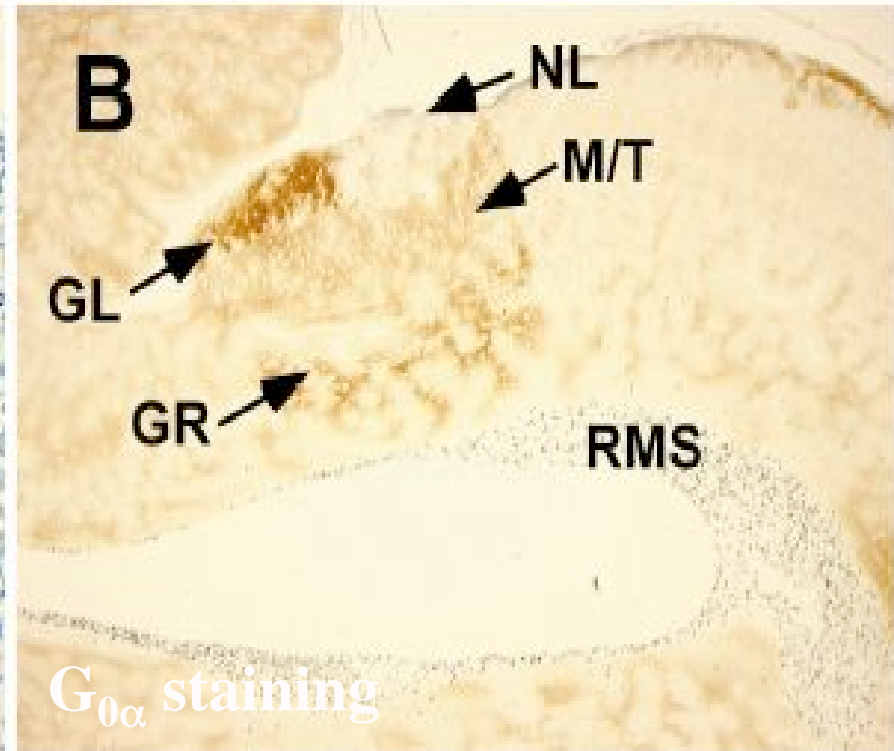
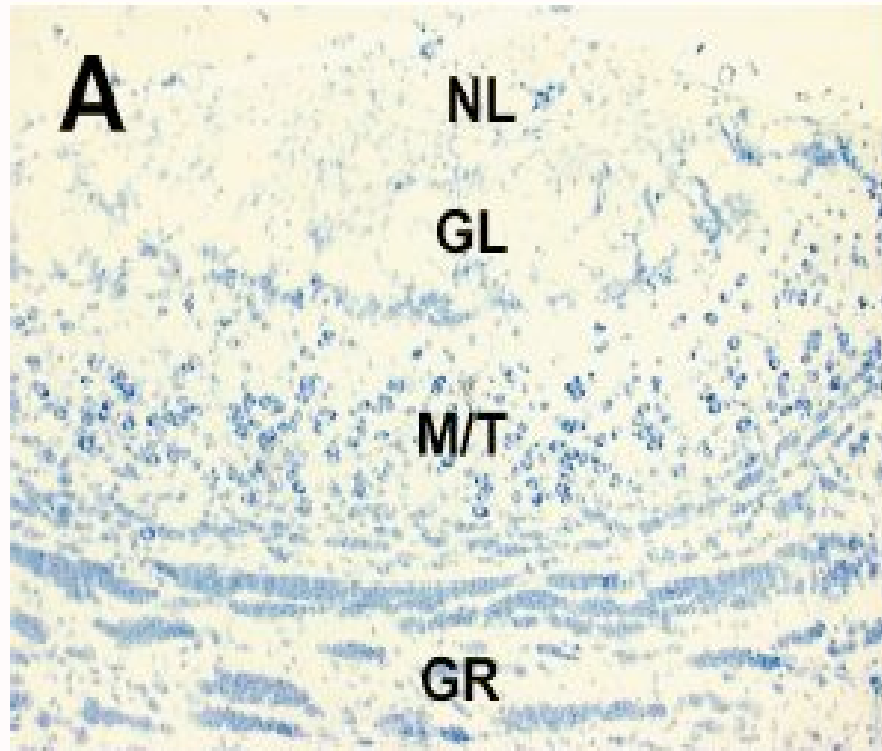
PRESENZA DI MARCATORI MULTIPLI NEL VNO

V2R



- ✦ V2R, VN2, VN3, VN4 sono dell G-protein che servono a trasdurre il segnale di diversi feromoni. I punti gialli indicano colocalizzazione nelle stesse cellule

Presenza di proteina $G_{0\alpha}$ come marcatore specifico della regione anteriore dell'AOB.



Presenza di marcatori specifici nella regione anteriore e posteriore dell'AOB e del VNO e attivazione di sistemi

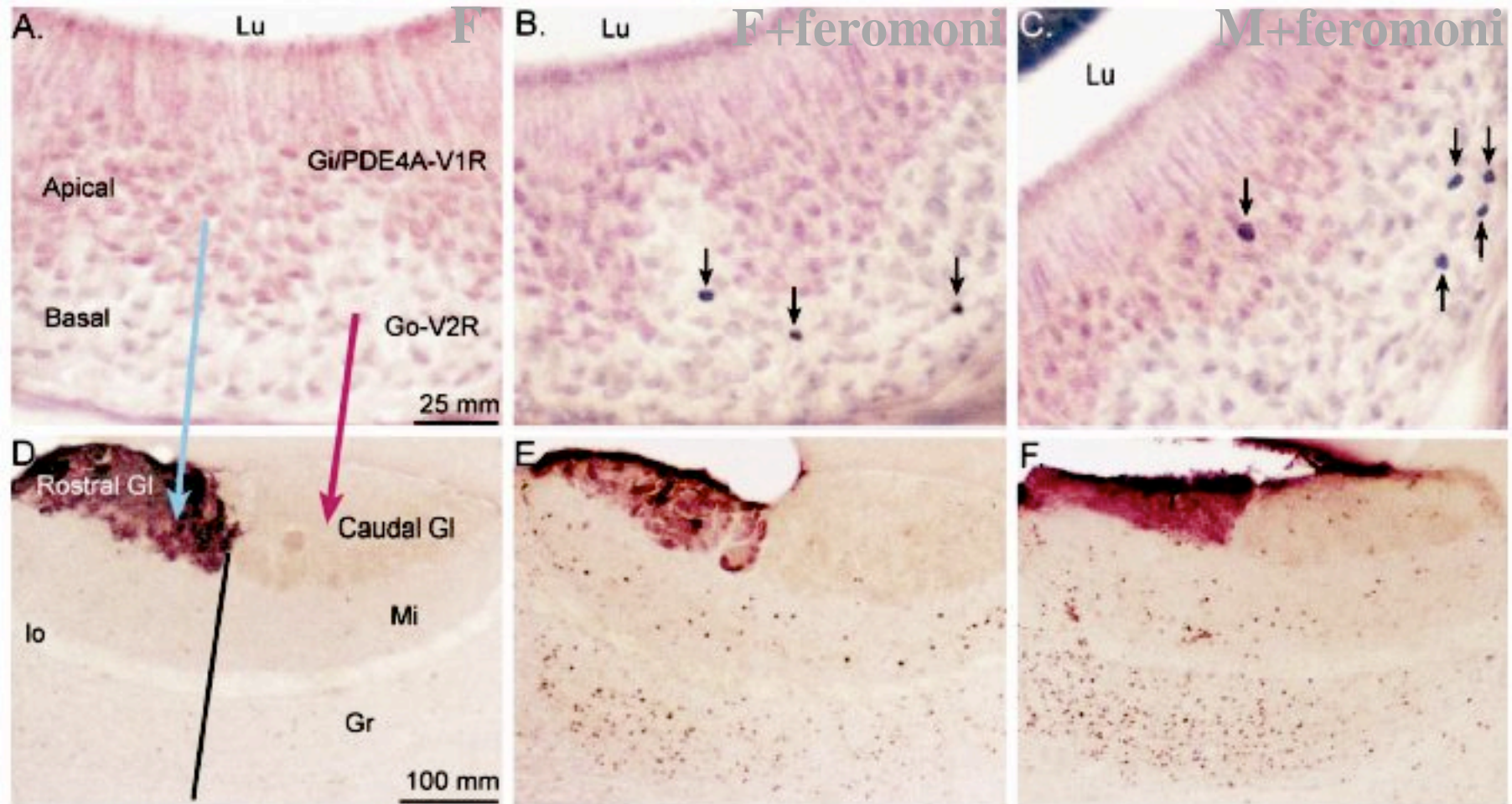


Figure 1. Representative photomicrographs are shown of Egr-1-IR neurons in the VNO (A-C) and Fos-IR neurons in the AOB (D-F) of gonadectomized, steroid hormone-treated animals exposed to different sources of pheromones. A, D, EB-treated female exposed to clean bedding. B, E, EB-treated female exposed to soiled male bedding. C, F, TP-treated male exposed to soiled female bedding. Anti-PDE4A antibody was used to label the apical portion of the VNO, and anti- $G\alpha_{12}$ antibody was used to stain the rostral portion of the AOB glomerular layer. The blue and red arrows in A and D depict the projection of apical and basal VNO neurons to rostral and caudal regions of the AOB, respectively. The black line in D shows the division between rostral and caudal that was extended into the mitral and granule cell layers of the AOB. Black arrows in B and C point to Egr-1-IR neurons in the VNO neuroepithelium. Gl, Glomerular layer; Gr, granule cell layer; lo, lateral olfactory tract; Lu, lumen; Mi, mitral cell layer.

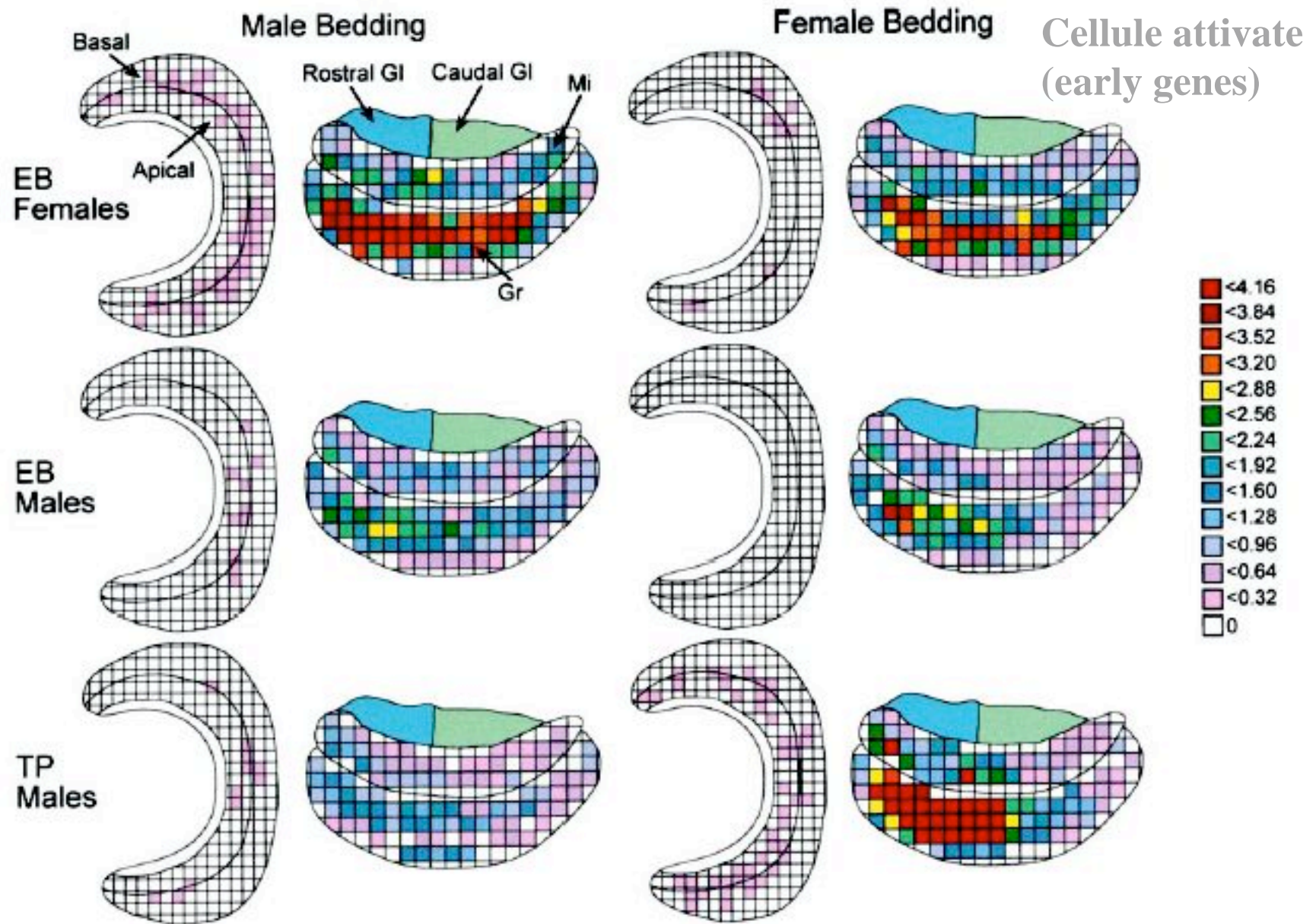


Figure 3. Composite spatial maps illustrate group responses to pheromones in the VNO and AOB. Grid squares were assigned a color based on the mean number of IEG-immunoreactive neurons (Egr-1 in the VNO; Fos in the AOB) induced in a particular square from all subjects in that group. $n = 6$ for EB-female and TP-treated male groups; $n = 8$ for both groups of EB-males. GI, Glomerular layer; Mi, mitral cell layer; Gr, granule cell layer.

Vomeronasal Organ

AOB - Mitral Cell Layer

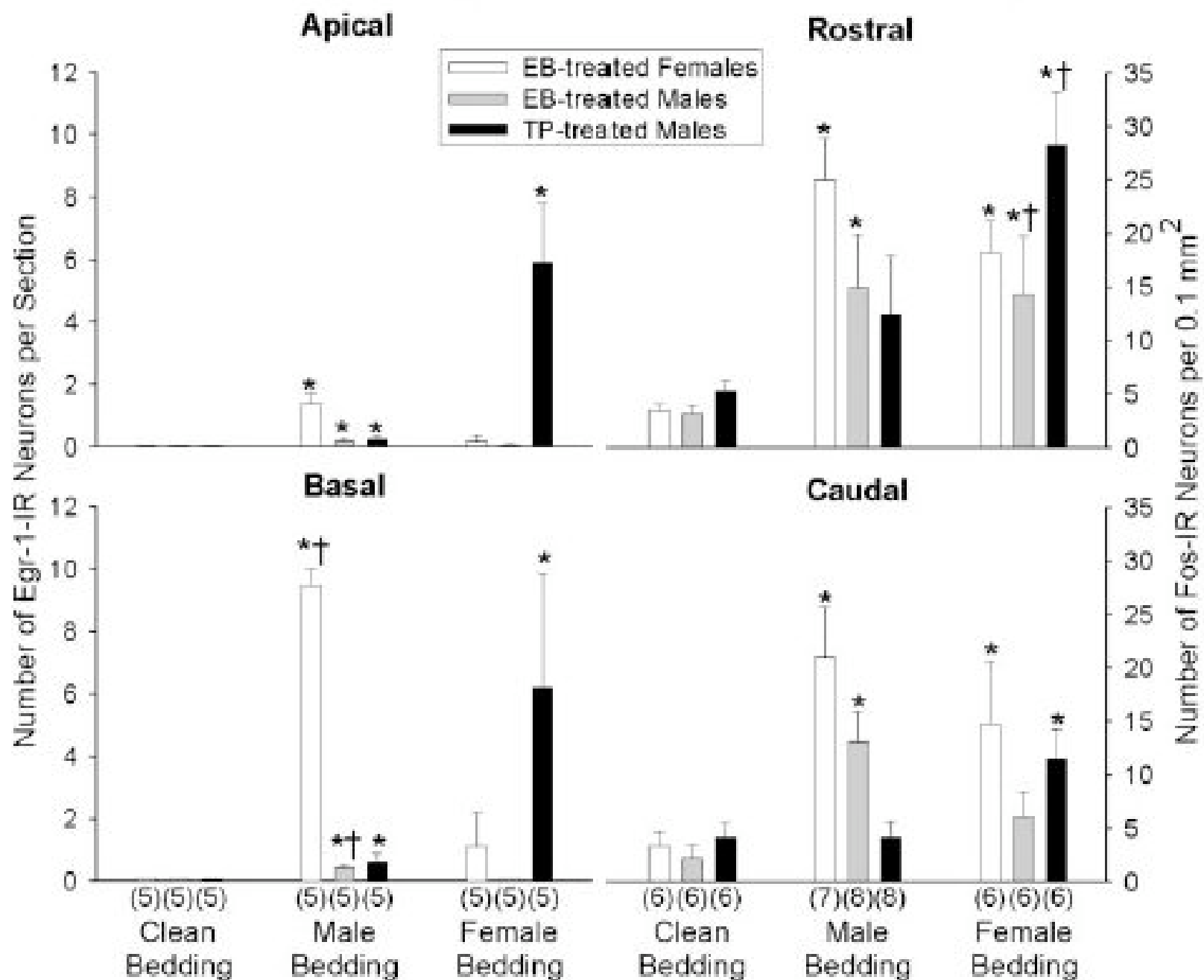
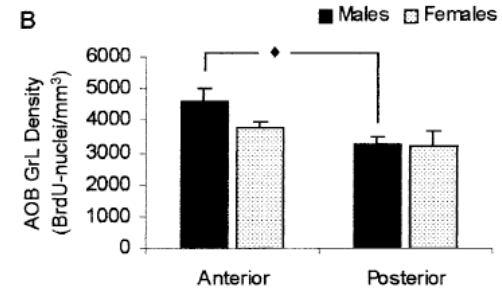
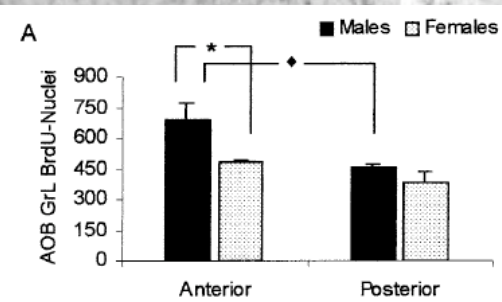
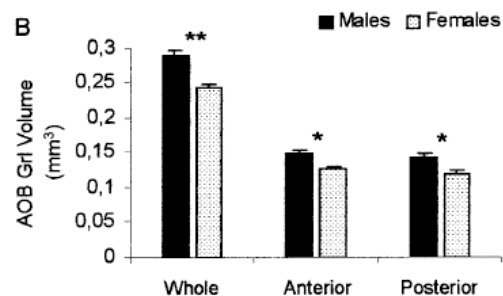
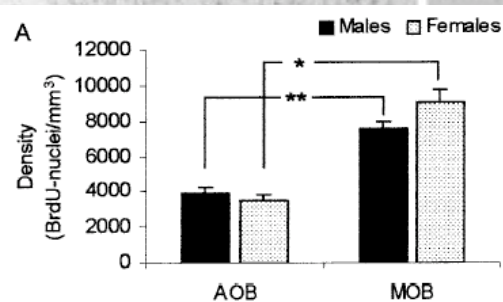
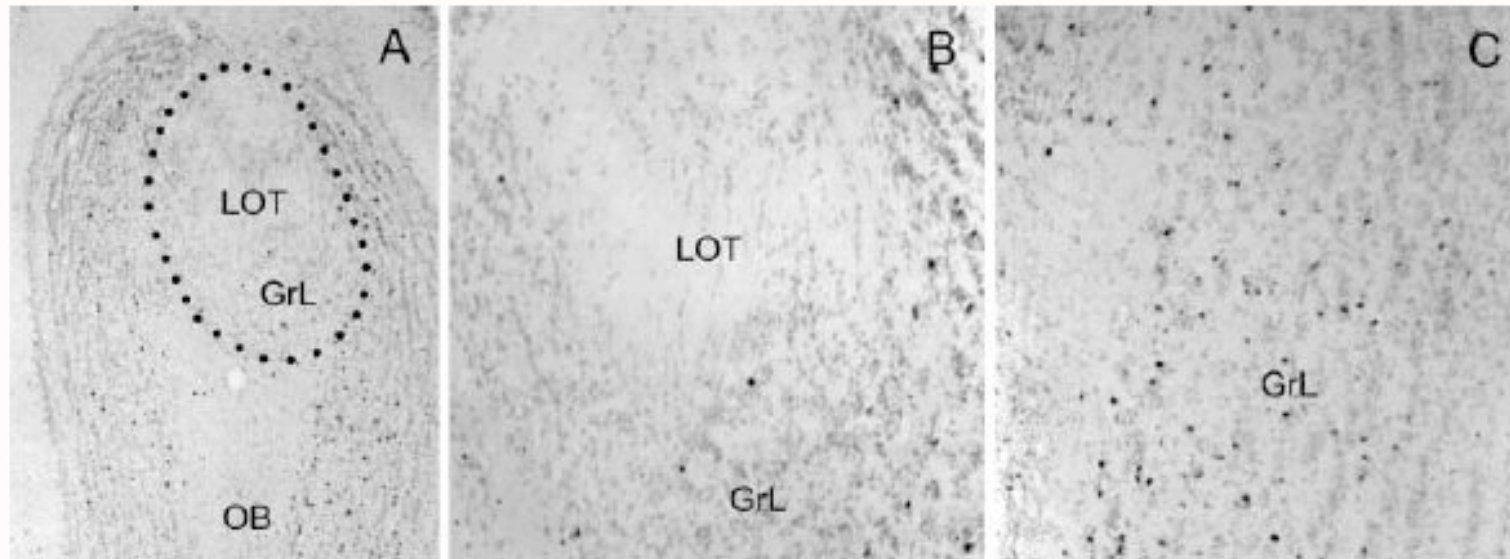


Table 1. Number of Fos-IR neurons in the granule cell layer of the AOB

	Clean bedding	Male bedding	Female bedding
Rostral			
EB females	8 ± 2 (6)	67 ± 19 (6)*	52 ± 14 (6)*
EB males	12 ± 2 (7)	31 ± 8 (8)*	35 ± 12 (8)
TP males	16 ± 4 (6)	23 ± 13 (6)	94 ± 28 (6)*†
Caudal			
EB females	3 ± 1 (6)	50 ± 12 (6)*	29 ± 12 (6)*
EB males	4 ± 1 (7)	22 ± 7 (8)*	15 ± 4 (8)*
TP males	4 ± 1 (6)	11 ± 6 (6)	35 ± 14 (6)*

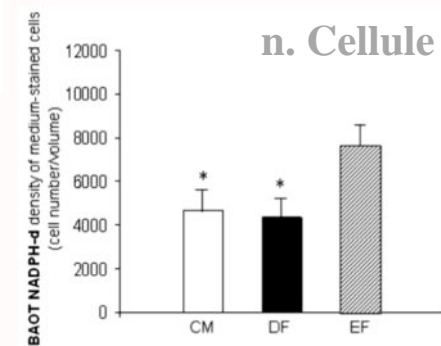
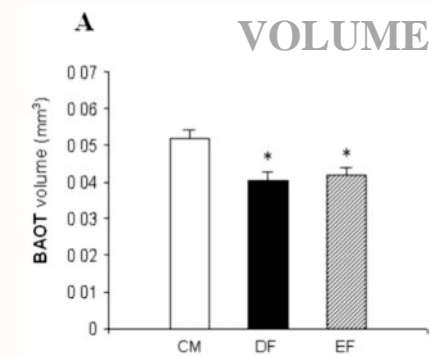
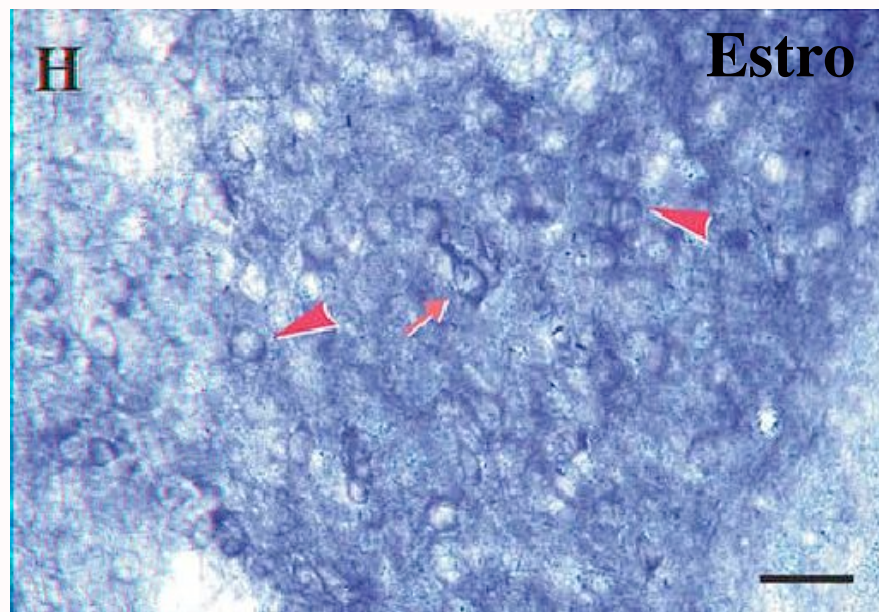
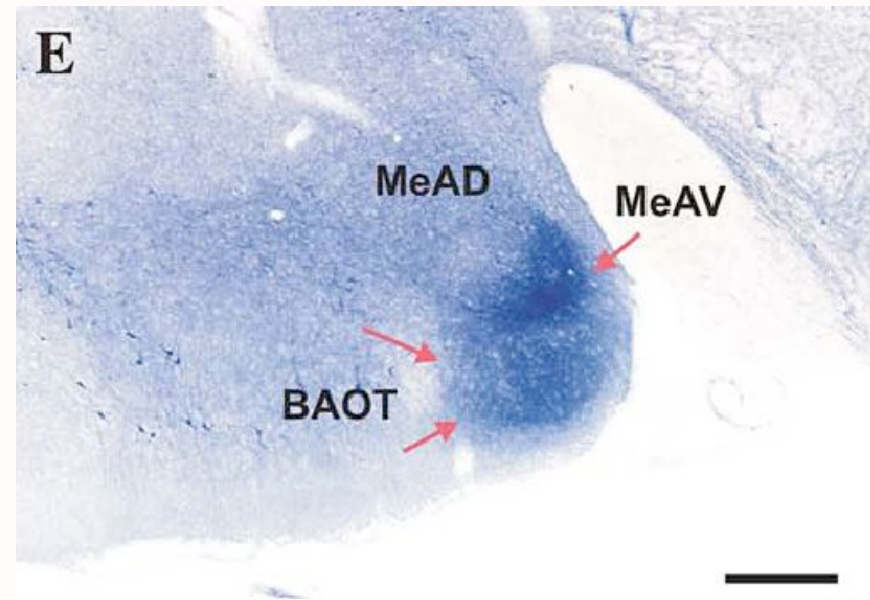
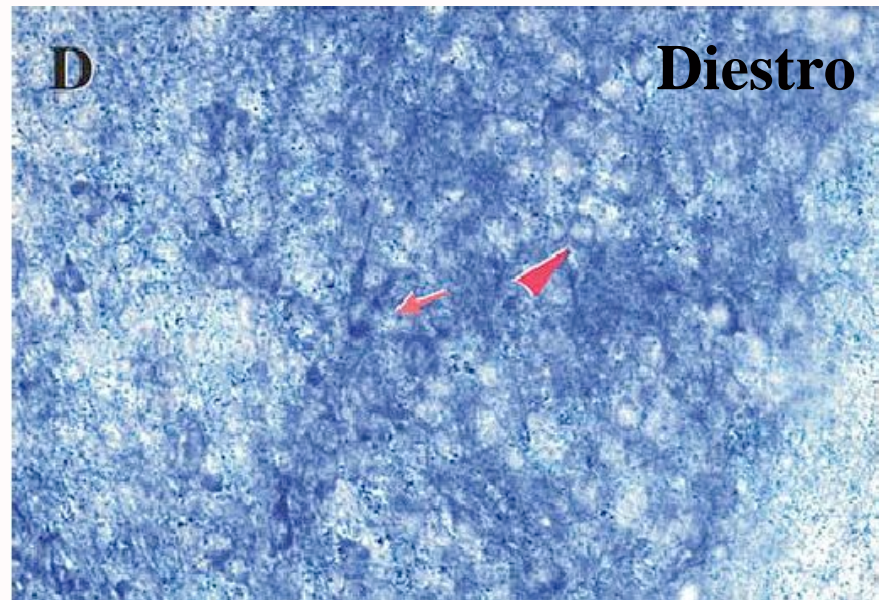
The mean ± SEM number of Fos-IR neurons in the granule cell layer of the AOB are compared in subjects treated with EB or TP and exposed to clean bedding, soiled male bedding, or soiled female bedding. The number of subjects in each group is given in parentheses. Asterisks denote a significant ($p < 0.05$) effect of soiled versus clean bedding (Kruskal–Wallis ANOVA with *post hoc* Mann–Whitney *U* tests). Daggers indicate significant differences between rostral and caudal means for a particular group, as determined by two-way ANOVAs, followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests.

DIMORFISMO NELLA MIGRAZIONE DI NUOVE CELLULE NEL AOB



Il dimorfismo nella migrazione è stato osservato solo nella regione rostrale dell'AOB e non nella regione caudale

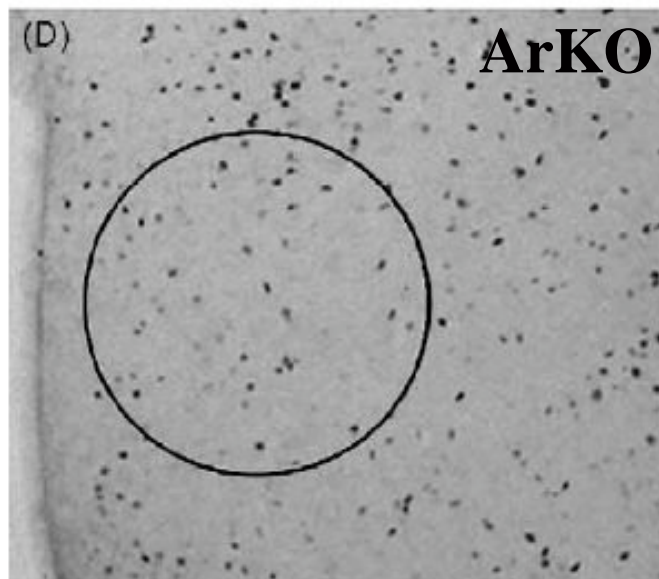
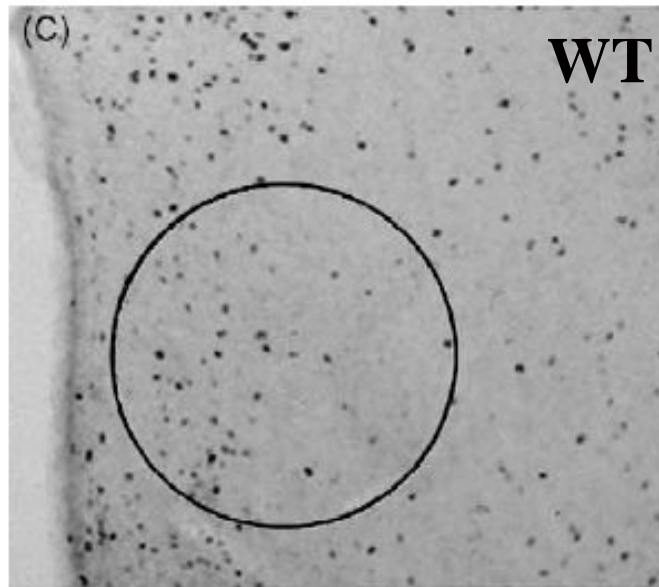
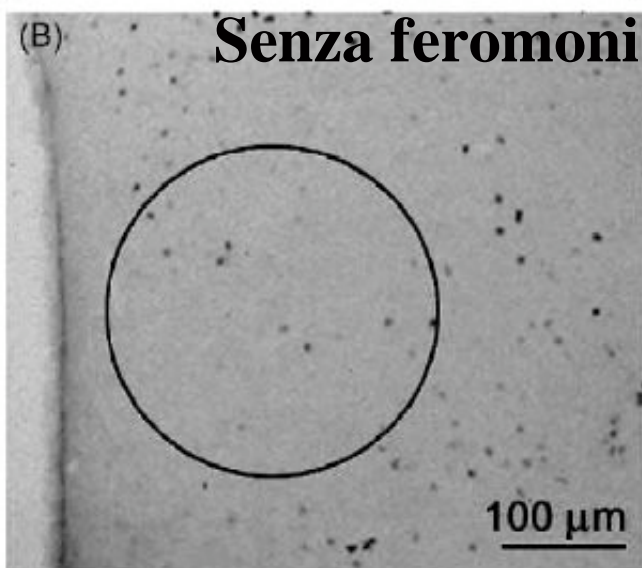
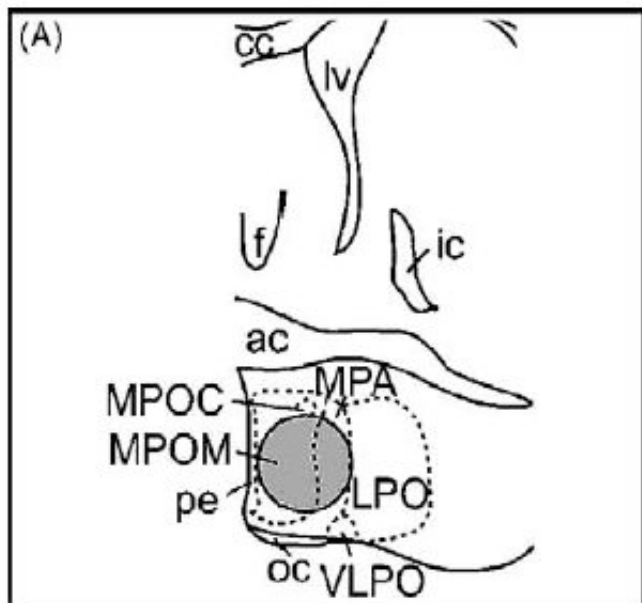
Variazioni NADPH-diaforasi nel BAOT



Cambiamenti legati al ciclo

- ✦ **Nel sistema olfattivo accessorio si sono osservati cambiamenti legati al momento del ciclo della femmina**
- ✦ **Nel BAOT (nucleo della radice olfattiva accessoria) le cellule a diaforasi (produttrici di NO) variano a seconda del ciclo**
- ✦ **Il volume del nucleo invece non cambia**

Attivazione di cellule nell'area preottica



Femmine esposte a feromoni maschili

L'esposizione ai feromoni maschili attiva un gran numero di cellule (dimostrate per la presenza della proteina c-fos) nella regione preottica di femmine di ratto. Negli animali incapaci di sintetizzare estradiolo (KO per aromatasi) avviene ugualmente l'attivazione (indipendente da E₂)

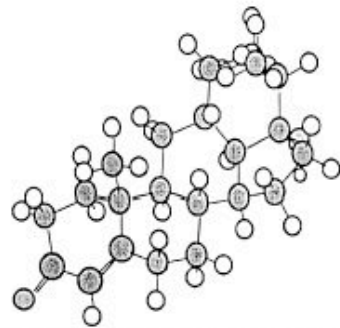
FEROMONI

- ◆ **Segnali chimici secreti da un individuo che regolano risposte comportamentali, neuroendocrine e di sviluppo, specifiche**
- ◆ **Stimolano queste diverse funzioni a livelli molto bassi (10^{-11} M) e questo li distingue dai comuni “odori”**
- ◆ **10^{-7} ml di urina maschile presentate una volta al giorno determinano la maturazione del sistema riproduttivo in animali prepuberi**

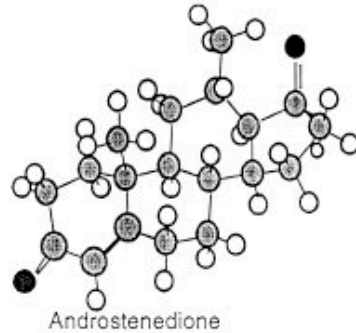
CLASSI DI FEROMONI

- ✦ ***Releasers***: controllano comportamenti stereotipi (es. erezione non da contatto) ed evocano risposte comportamentali a breve termine (es. attacchi aggressivi)
- ✦ ***Primers***: stimolano cambiamenti a lungo termine di sistemi neuroendocrini (es. ciclo ovarico) e risposte comportamentali a lungo termine
- ✦ ***Signalers***: segnalano agli altri membri della stessa specie alcuni stati funzionali come l'identità sessuale o lo stato riproduttivo
- ✦ ***Modulators***: modulano comportamenti già in atto o le reazioni psicologiche ad una determinata situazione

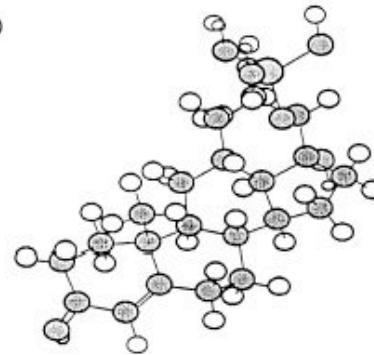
STRUTTURA MOLECOLARE DEI FEROMONI



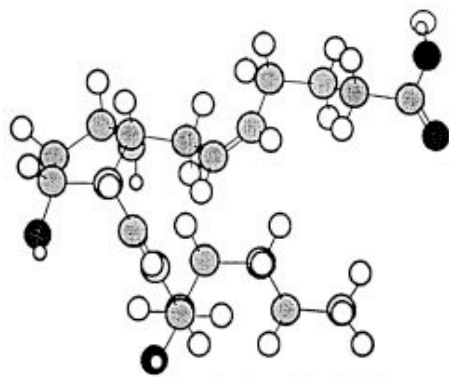
17,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one



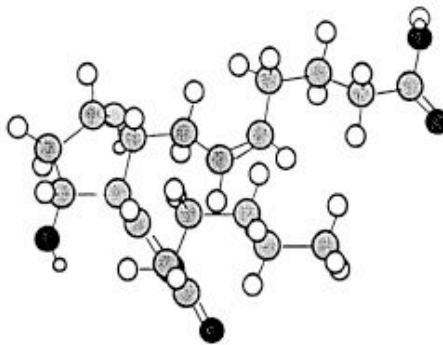
Androstenedione



17,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one-20-sulfate



Prostaglandin F2 α



15Keto-Prostaglandin F2 α

I feromoni (in questo caso quelli prodotti dai pesci rossi) possono essere steroidi o loro derivati, che possono anche essere modificati dai batteri presenti nel suolo. In altri casi i feromoni possono essere peptidi.

AZIONE DEI FEROMONI *PRIMERS*

- ✦ **Stimolano cambiamenti a lungo termine di sistemi neuroendocrini:**
 - **Ciclo ovarico**
 - **Pubertà**
 - **Allattamento**
 - **Invecchiamento e riproduzione**
 - **Funzionamento del testicolo**
 - **Surrene**

***PRIMERS* e CICLO OVARICO**

Feromoni pre-ovulatori nei ratti

- ✦ **Anticipatori del picco preovulatorio di LH**
 - Durante lo sviluppo follicolare e l'aumento di estrogeni le femmine di ratto producono feromoni che accelerano il *timing* del picco di LH
 - Nelle femmine intatte l'esposizione deve essere continua per giorni
 - Accorciamento del ciclo
 - In femmine ovariectomizzate e trattate con estrogeni la risposta con il picco di LH si determina dopo 3 o 4 ore dall'esposizione.

***PRIMERS* e CICLO OVARICO**

Feromoni post-ovulatori nei ratti

- ✦ **Posticipatori del picco preovulatorio di LH**
 - Durante il picco di LH quando aumentano i livelli di progesterone e gli estrogeni sono elevati le femmine producono un feromone che ritarda il picco di LH
 - Nelle femmine intatte l'esposizione deve essere continua per giorni
 - Allungamento del ciclo

***PRIMERS* e CICLO OVARICO**

◆ Differenze Specie-specifiche

– Cavie:

- **Feromoni diversi nelle diverse fasi del ciclo.**
- **Feromoni prodotti nella prima fase diminuiscono la vita del corpo luteo, ma non influenzano l'ovulazione**
- **Feromoni prodotti nella fase luteale aumentano il numero di follicoli atresici, ma non influenzano la vita del corpo luteo**

– Topi:

- **Producono solo feromoni con funzione di posticipare il ciclo estrale**
- **Femmine che vivono in gruppo hanno cicli più lunghi ed un numero maggiore di pseudogavidanze**

PRIMERS e CICLO OVARICO

✦ Dinamiche di gruppo nei ratti

- La produzione di ormoni anticipatori e posticipatori rende particolarmente difficile la predizione dei cicli in popolazioni di femmine intatte**
- Simulazioni al computer dimostrano che, in gruppi di cinque femmine, dopo un certo numero di cicli (7) i cicli ovarici risultano sincronizzati**
- L'analisi simulata ha permesso anche di scoprire l'esistenza di picchi parziali di LH che sono stati poi rilevati sperimentalmente negli animali**
- I picchi parziali di LH non determinano ovulazione ed il risultato è quindi un allungamento del ciclo stesso**

PRIMERS e CICLO OVARICO

- ✦ **Differenze di sensibilità legate al contesto ambientale**
 - **Feromoni ovulatori presentati a femmine in isolamento olfattivo accorciano e non allungano il ciclo spontaneo**
 - **I motivi possono essere:**
 - **La situazione di isolamento estremo può essere molto stressante**
 - **I cambi frequenti della lettiera (necessari per creare l'isolamento olfattivo) diminuiscono l'azione batterica necessaria per la produzione dei feromoni**

***PRIMERS* e CICLO OVARICO**

✦ Differenze legate ai ceppi genetici

– Sprague-Dawley

- **Selezionati per la riproduzione. Ciclo ovarico di 4 giorni**
- **Sembrano avere solamente i feromoni preovulatori che stimolano l'accorciamento del ciclo**

– Wistar

- **Hanno feromoni differenti e cicli di 4 o 5 giorni**
- **Gli effetti dell'urina sono solamente quelli di aumentare la frequenza delle femmine con cicli di 4 giorni**

***PRIMERS* e CICLO OVARICO**

Meccanismi neuroendocrini

- ✦ **Nel ratto gli effetti dei feromoni ovarici sono mediati dalla via olfattiva accessoria**
- ✦ **Nei topi non tutti i *primers* agiscono attraverso il VNO, ma anche attraverso la mucosa olfattiva non specializzata. Questo sembra vero anche per pecore, maiali, cavie, lemuri**
- ✦ ***E' possibile che il VNO non sia indispensabile per mediare l'effetto dei feromoni***

***PRIMERS* e CICLO OVARICO**

Feromoni maschili => femmine

- ◆ **Stimolano la secrezione di GnRH, influenzando il picco preovulatorio di LH e l'ovulazione (prairie voles, hamster)**

- ◆ **Risposte variabili a seconda della fase (opossum):**
 - Fase luteale - riduzione del ciclo
 - Fase follicolare - allungamento del ciclo
 - Fase ovulatoria - nessun effetto

***PRIMERS* e PUBERTA'**

Feromoni femminili

- ◆ **Femmine di topo adulte inibiscono la pubertà di femmine giovani**
 - In laboratorio questo avviene in autunno ed inverno
 - In natura avviene quando si ha alta densità di popolazione, e risulta quindi come un meccanismo di controllo delle dinamiche di popolazione
- ◆ **Nei ratti la sensibilità delle femmine a questo effetto dipende dall'esposizione prenatale agli androgeni (che tende ad inibire l'effetto stesso), legato alla posizione in utero**
 - VNO si differenzia sotto il controllo degli androgeni
- ◆ **Nei primati la femmina socialmente dominante produce feromoni inibitori per le altre femmine del gruppo**

***PRIMERS* e PUBERTA'**

Feromoni femminili

INFLUENZE GENETICHE

- ✦ **I differenti ceppi di ratti reagiscono diversamente se esposti ai feromoni femminili:**
 - **Femmine Holzman che vivono con altre femmine raggiungono la pubertà più tardi di quelle che vivono anche con maschi**
 - **Femmine Winstar non presentano questa inibizione**
 - **Nel ceppo Winstar le femmine raggiungono la pubertà molto più tardi degli altri ceppi**
- ✦ **Questo suggerisce che ci devono essere geni in comune tra l'asse di risposta ai feromoni e l'asse neuroendocrino che regola l'asse ovarico durante la pubertà**

***PRIMERS* e PUBERTA'**

Feromoni maschili

- ◆ **Accelerano la pubertà**
- ◆ **Stimolano l'ovulazione**

- ◆ **Nei topi**
 - **effetti sono massimi in primavera ed estate in laboratorio,**
 - **durante tutto l'anno nelle popolazioni selvatiche**

- ◆ **Nei ratti la sensibilità delle femmine a questo effetto dipende dall'esposizione prenatale agli androgeni (che tende ad inibire l'effetto stesso), legato alla posizione in utero**

***PRIMERS* e PUBERTA'**

Feromoni maschili

- ✦ **L'esperienza postnatale gioca un ruolo importante**
 - **Ratte che vengono allevate con i padri sono più reattive agli effetti acceleranti dei feromoni provenienti dall'urina di maschio delle femmine che sono state allevate solo con femmine.**
- ✦ **L'accelerazione della pubertà da parte dei feromoni maschili è mediata dal VNO (topi e hamster)**

EFFETTI GENETICI

- ✦ **Femmine Holzman rispondono ai feromoni maschili acceleranti la pubertà**
- ✦ **Femmine Wistar non rispondono**

***PRIMERS* e GRAVIDANZA**

- ✦ **Femmine gravide o in allattamento producono feromoni**
 - Nei ratti e nei topi essi accelerano l'ovulazione
- ✦ **Nelle femmine gravide i feromoni maschili possono determinare la fine della gravidanza e l'insorgenza del calore. Questo può avvenire solo se il "costo" non è molto elevato, quindi nei primi tre giorni dopo il concepimento e prima dell'impianto**
- ✦ **Femmine di topo sviluppano una memoria protettiva nei confronti del maschio con cui si accoppia: la sua presenza non induce la distruzione della gravidanza**
 - Questa memoria non dipende da processi cognitivi, ma è mediata dal sistema olfattivo accessorio, forse usando informazioni dai geni per l'istocompatibilità

***PRIMERS* e ALLATTAMENTO**

- ✦ **I feromoni prodotti da femmine in allattamento e anche dai neonati prolungano ed aumentano la variabilità dei cicli ovarici**
- ✦ **Sopprimono in particolare l'estro postpartum**
- ✦ **Questi effetti determinano un ritardo nelle altre femmine del gruppo**
- ✦ **Alla fine si instaura una sincronia nelle nascite che determina anche la possibilità di cure comunitarie alla prole**

***PRIMERS* e INVECCHIAMENTO RIPRODUTTIVO**

- ✦ **Con l'invecchiamento circa il 50% delle femmine entra in uno stato anovulatorio spontaneo**
- ✦ **L'isolamento sociale dalle altre femmine determina un precoce instaurarsi del blocco dell'ovulazione**
- ✦ **Per le femmine giovani lo stato anovulatorio può essere indotto dall'esposizione alla luce per 24 ore**

- ✦ **Le femmine anovulatorie possono riprendere i cicli quando sono esposte a feromoni di maschi giovani**

- ✦ **Il meccanismo è quello dell'induzione della secrezione di progesterone e del picco di LH**

***PRIMERS* e ATTIVITA' DEL TESTICOLO**

- ◆ **Feromoni da femmine in estro stimolano la secrezione di LH nel maschio e quindi la secrezione di testosterone**
- ◆ **In molte specie questa azione avviene durante la stagione di riposo sessuale**
- ◆ **Nel hamster il testosterone facilita l'azione dei feromoni femminili ed entrambi sono necessari per l'accoppiamento**
- ◆ **Nei maschi di topo la risposta è mediata dal VNO**
- ◆ **L'esposizione ai feromoni determina la comparsa di c-fos in tutto il sistema olfattivo accessorio**
- ◆ **Nei ratti tutto il bulbo olfattivo risponde ai feromoni**

***PRIMERS* e ATTIVITA' DEL TESTICOLA**

- ◆ **Ratti maschi prepuberi che vivono in gruppo presentano una pubertà accelerata quando sono esposti a feromoni femminili, ma anche maschili**
- ◆ **Nei topi al contrario, le urine di maschio determinano un ritardo della secrezione**