

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE
XXIV CICLO

**Il sistema olfattivo accessorio del
topo: effetti della delezione del gene
codificante per la subunità Gy8.**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Vittorio Gallese

Tutor:
Chiar.mo Prof. Roberto Tirindelli

Tesi di Dottorato del Dott. Simone Tonelli

Indice.

1. Riassunto	3
2. Introduzione	5
3. Materiali e metodi	15
• Mantenimento degli animali	15
• Generazione dei topi $G\gamma 8^{-/-}$	16
• Immunoistochimica	17
• Ibridizzazione in situ	19
• Misurazione dell'organo vomeronasale e del bulbo olfattivo	21
• Analisi della proliferazione cellulare	22
• Analisi delle risposte fisiologiche	24
• Test comportamentali	25
• Analisi statistica dei dati	27
4. Risultati	28
• Alterazioni morfologiche nel sistema vomeronasale dei topi $G\gamma 8^{-/-}$	28
• Risposte fisiologiche nel sistema vomeronasale dei topi $G\gamma 8^{-/-}$	35
• Anomalie comportamentali dei topi $G\gamma 8^{-/-}$	37
5. Discussione	41
6. Bibliografia	46

Riassunto.

I sistemi chemosensoriali deputati al riconoscimento di molecole esogene si sono evoluti anticamente, e rivestono probabilmente un ruolo fondamentale nell'evoluzione e nella diffusione delle specie nel regno animale.

L'olfatto, in particolare, è la modalità sensoriale primaria per molti vertebrati; nei roditori, esso ha avuto uno sviluppo nettamente predominante rispetto ad altri sensi.

Il sistema olfattivo del topo (*Mus musculus*), si divide in due sottosistemi deputati rispettivamente al riconoscimento di molecole odorose convenzionali (sistema olfattivo principale) e di ferormoni (sistema olfattivo accessorio).

La struttura periferica deputata al riconoscimento dei ferormoni è l'organo vomeronasale (VNO), nel quale sono presenti due principali classi di neuroni sensoriali che si distinguono per la loro localizzazione, apicali e basali, per l'espressione di specifiche proteine-G e di recettori per ferormoni a loro accoppiati funzionalmente.

Questo studio si concentra su topi mutanti che hanno subito la delezione genica della subunità $\gamma 8$ della proteina eterotrimerica G_{α} , specificamente espressa dai neuroni della porzione basale del VNO in combinazione con i recettori della famiglia V2R.

I topi utilizzati per questo studio hanno mostrato alterazioni sia a carico dell'organo vomeronasale sia a carico del bulbo olfattivo accessorio (AOB), quest'ultimo bersaglio delle proiezioni provenienti dai neuroni sensoriali

dell'organo vomeronasale.

In particolare, nell'organo vomeronasale si riscontra una diminuzione dei neuroni basali che ha inizio al momento dello svezzamento e procede fino al raggiungimento del primo anno di età, allorché si riscontra un numero di neuroni inferiore del 70% rispetto ai topi di controllo.

Inoltre, i topi mutanti per G γ 8 mostrano alterazioni funzionali, evidenziabili in una minor attivazione del bulbo olfattivo accessorio in seguito all'esposizione a ferormoni.

La probabile conseguenza di queste alterazioni anatomiche e fisiologiche si riflette in una significativa riduzione dell'aggressività mediata dai ferormoni, sia nei topi maschi che nelle femmine.

In conclusione, lo studio dimostra come la subunità G γ 8 rivesta un ruolo centrale nel riconoscimento mediato dai ferormoni, suggerendo di conseguenza un ruolo in tale funzione per i recettori della famiglia V2R.

Introduzione.

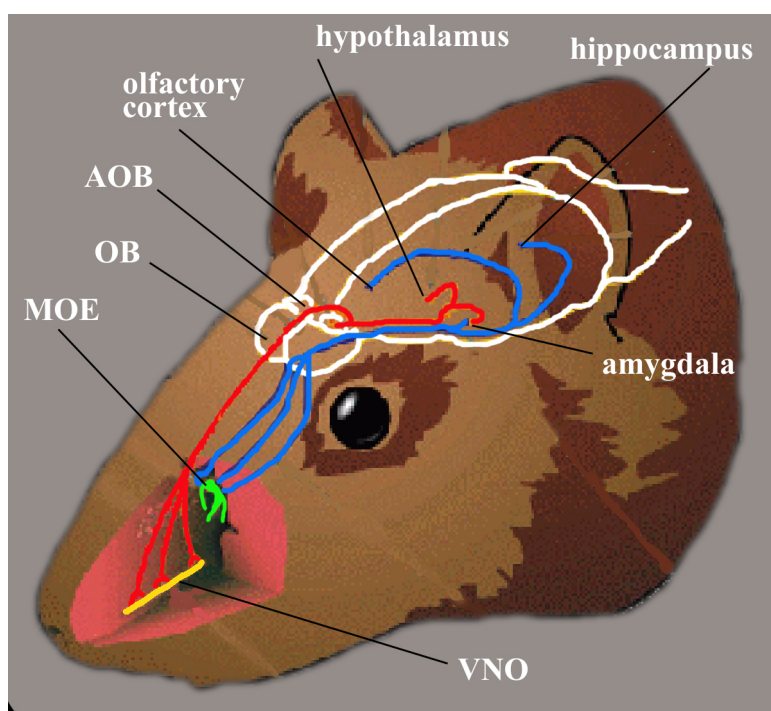
Fin dalla comparsa delle prime forme di vita sulla terra, la produzione di composti chimici e la capacità di riconoscerli hanno rappresentato una carta fondamentale nelle mani dei processi evolutivi; senza tali capacità non sarebbe stata possibile la comunicazione tra batteri unicellulari e, in seguito, la comparsa di organismi sempre più complessi in cui miliardi di cellule cooperano e comunicano organizzandosi in tessuti, sistemi ed apparati con funzioni estremamente varie.

Nel regno animale, lo sviluppo di organi e sistemi complessi deputati esclusivamente al riconoscimento di molecole esogene si è concretizzato nella comparsa di quelli che comunemente definiamo come sensi chimici: gusto ed olfatto. Il sistema olfattivo, in particolare, si è rivelato di vitale importanza per la sopravvivenza dell'individuo e delle specie: esso fornisce informazioni essenziali quali la commestibilità del cibo, la presenza di un predatore o la possibilità di accoppiarsi.

Se da un lato alcune specie, tra cui quella umana, hanno sviluppato nuovi meccanismi sensoriali così efficienti da rendere i deficit olfattivi perfettamente compatibili con la vita, vi sono altre specie che hanno invece ottenuto un olfatto talmente sviluppato da dipenderne in maniera assoluta: è il caso dei roditori, ed in particolare del topo.

Nel topo, così come in altri vertebrati, un'ulteriore suddivisione del sistema olfattivo ha portato ad una specializzazione ancor più spiccata (Fig.1): da un lato il sistema olfattivo principale, costituito dall'epitelio olfattivo e dal

bulbo olfattivo principale, deputato al riconoscimento di odoranti ed in grado di fornire informazioni sull'ambiente circostante o sul cibo; dall'altro il sistema olfattivo accessorio, costituito dall'organo vomeronasale e dal bulbo olfattivo accessorio, in grado di mediare risposte ai feromoni recanti informazioni sugli altri individui presenti.



Fig,1 Organizzazione generale del sistema olfattivo del topo.

I due sistemi sono profondamente diversi non solo perché fanno riferimento a due distinti organi sensoriali periferici: essi mostrano differenze macroscopiche per quanto riguarda la processazione dell'informazione e l'invio al sistema nervoso centrale, unite a differenze a livello molecolare per quanto concerne i sistemi recettoriali e le vie di trasduzione (Lledo, Gheusi et al. 2005).

Sia l'epitelio olfattivo sia l'organo vomeronasale sono costituiti da un

neuroepitelio, i cui neuroni una volta attivati inviano l'informazione grezza al primo centro di processamento costituito dai bulbi olfattivi, rispettivamente principale ed accessorio. Da qui, l'informazione segue due vie nettamente distinte: l'informazione proveniente dal sistema olfattivo principale raggiunge l'ippocampo, l'amigdala e la corteccia olfattiva, sede di quella che in un parallelismo con la specie umana potremmo definire come percezione cosciente. Tutt'altro destino invece è riservato all'informazione proveniente dal sistema olfattivo accessorio: essa viene inviata all'amigdala ed all'ipotalamo; attraverso tale struttura sottocorticale vengono controllate risposte di tipo neuroendocrino e cambiamenti fisiologici, quali la sincronizzazione dell'estro nelle femmine che vivono insieme e l'attitudine aggressiva di un maschio di fronte ad un intruso.

Anche i neuroni sensoriali dell'epitelio olfattivo e dell'organo vomeronasale presentano notevoli differenze riguardo l'espressione dei recettori olfattivi (Wu, Tirindelli et al. 1996): nell'epitelio olfattivo ciascun neurone esprime un solo recettore olfattivo (Ngai 2004), cosicché ciascun odorante viene rappresentato come la combinazione dell'attivazione di più neuroni più o meno sensibili o specifici per quella determinata molecola. I neuroni dell'epitelio vomeronasale, invece, utilizzano una strategia completamente diversa: ciascun neurone esprime in maniera combinatoriale (Martini, Silvotti et al. 2001) (Silvotti, Moiani et al. 2007) più recettori appartenenti a famiglie diverse, oltre a proteine appartenenti alla famiglia MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità).

L'organo vomeronasale è un organo a simmetria bilaterale, di forma allungata, situato immediatamente al di sopra del palato; la forma cava favorisce il contatto del neuroepitelio con le molecole che raggiungono

l'interno del lume dell'organo durante l'inspirazione (Jacobson, Trotier et al. 1998) (Fig.2).

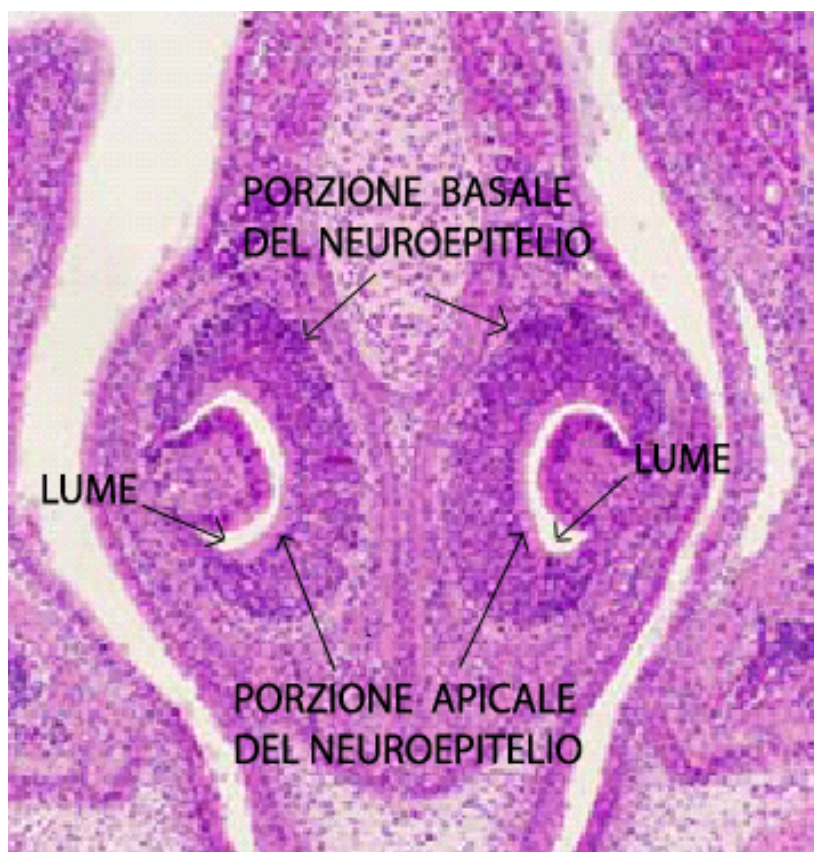


Fig.2 Sezione coronale dell'organo vomeronasale.

I neuroni sensoriali dell'organo vomeronasale esprimono recettori caratterizzati dalla presenza di sette eliche transmembranarie, i quali si trovano accoppiati a proteine G eterotrimeriche (Krieger, Schmitt et al. 1999) la cui attivazione innesca una cascata trasduzionale che, mediante attivazione di una fosfolipasi C (Sasaki, Okamoto et al. 1999) (Wekesa and Anholt 1997), porta alla scissione del lipide di membrana fosfatidilinositolo in inositolo trifosfato e diacilglicerolo. L'inositolo trifosfato è in grado di mobilitare le riserve di calcio intracellulari e il diacilglicerolo può stimolare

l'apertura del canale cationico TRPC2, il quale causa a sua volta l'ingresso di ioni Ca^{2+} dal comparto extracellulare; l'aumento della concentrazione intracellulare di tali ioni causa l'apertura di ulteriori canali cationici, Ca^{2+} dipendenti, con conseguente ingresso nella cellula di altri ioni Ca^{2+} e di ioni Na^+ . Si ha quindi una depolarizzazione della membrana plasmatica, e contestualmente la genesi del potenziale di azione (Tirindelli, Dibattista et al. 2009).

Il neuroepitelio vomeronasale può essere suddiviso in due zone macroscopicamente distinte: una zona basale ed una zona apicale. Nelle due zone sono presenti neuroni sensoriali che esprimono diversi recettori ed utilizzano diverse isoforme delle componenti la trasduzione del segnale.

I neuroni della zona apicale esprimono recettori della superfamiglia V1R, caratterizzati da un breve dominio extracellulare; i recettori espressi dai neuroni della porzione basale, denominati V2R, sono invece caratterizzati da un lungo dominio extracellulare (Dulac and Axel 1995) (Herrada and Dulac 1997) (Matsunami and Buck 1997) (Ryba and Tirindelli 1997) (Fig.3).

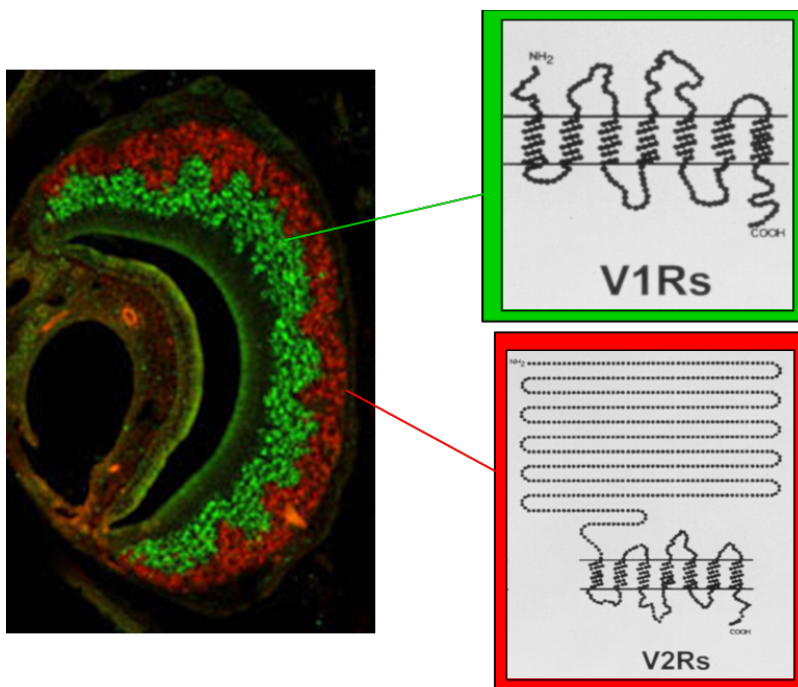


Fig.3 Immunoistochimica con anticorpi per i recettori vomeronasali della famiglia V1R (verde) e V2R (rosso). Si possono distinguere la regione apicale e basale, rispettivamente, dell'epitelio vomeronasale.

Inoltre, i neuroni della zona apicale e basale inviano i loro assoni a porzioni distinte del bulbo olfattivo accessorio, rispettivamente anteriore e posteriore (Fig.4).

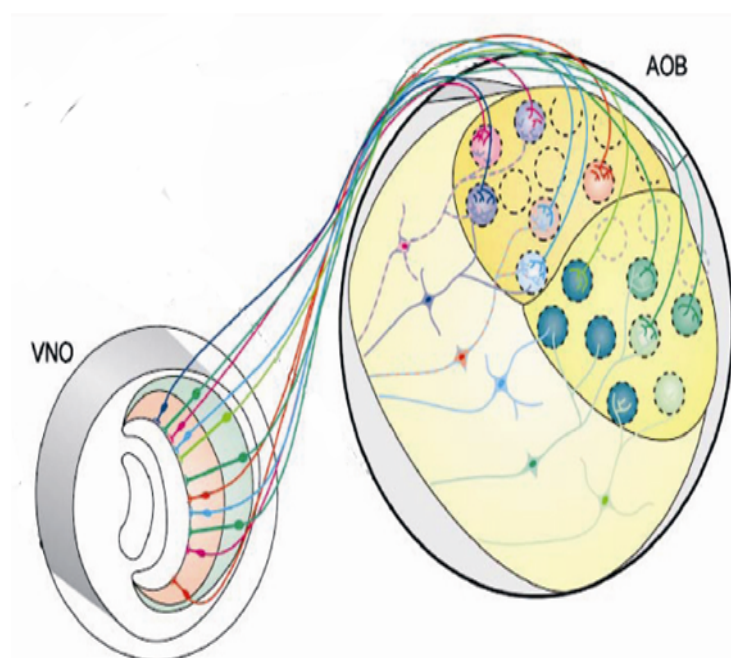


Fig.4 Schema riassuntivo dell'organizzazione delle proiezioni dei neuroni vomeronasali ai glomeruli del bulbo olfattivo accessorio anteriore (neuroni apicali) e posteriore (neuroni basali).

Ciò che accomuna i recettori delle famiglie V1R e V2R è il fatto di essere entrambi accoppiati a proteine G eterotrimeriche (Krieger, Schmitt et al. 1999) (Berghard and Buck 1996) (Jia and Halpern 1996): il legame del ferormone al recettore causa l'attivazione della proteina G, la quale si scinde nella subunità α e nel complesso costituito dalle subunità $\beta\gamma$. Per lungo tempo si è ritenuto che solo la subunità α fosse responsabile dell'attivazione della cascata trasduzionale, ma studi in vitro hanno dimostrato che il complesso $\beta\gamma$ è in grado di attivare direttamente la fosfolipasi C (Kuang, Wu et al. 1996), suggerendo per tale complesso un

ruolo da protagonista e non soltanto accessorio.

Le isoforme delle subunità che formano tali proteine G si differenziano nei neuroni che esprimono recettori V1R o V2R: i recettori V1R si trovano accoppiati al complesso $\alpha 2\beta 2\gamma 2$, mentre i V2R sono accoppiati alla proteina G composta dalle subunità $\alpha\beta 2\gamma 8$ (Berghard and Buck 1996) (Jia and Halpern 1996) (Fig.5,6).

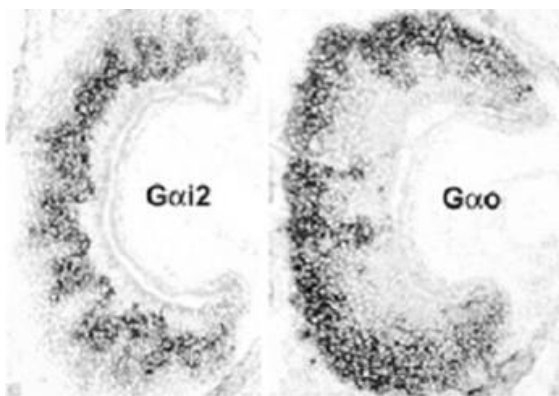


Fig.5 Ibridizzazione in situ che mostra la localizzazione delle subunità $G\alpha i 2$ e $G\alpha o$ nell'epitelio vomeronasale del topo.

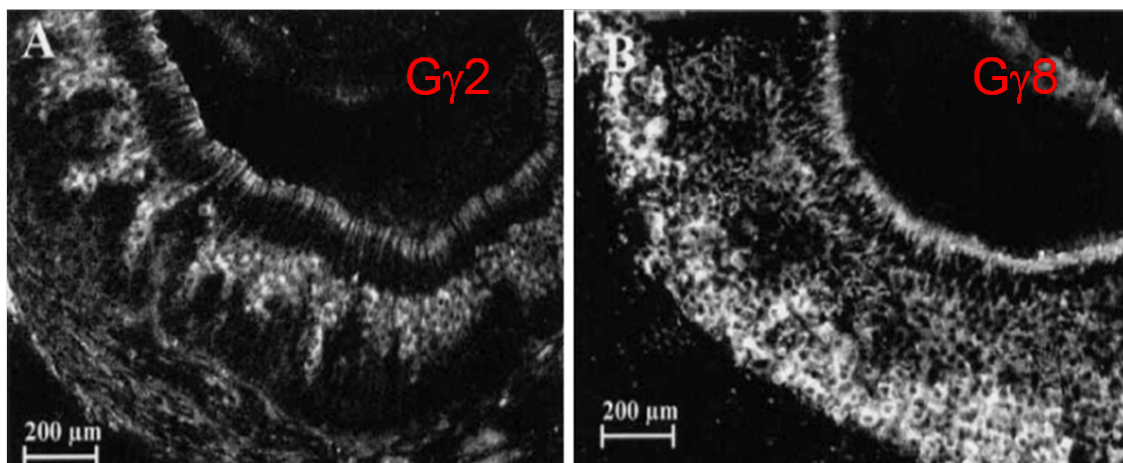


Fig.6 Ibridizzazione in situ che mostra la localizzazione delle subunità $G\gamma 2$ e $G\gamma 8$ nell'epitelio vomeronasale del topo.

Si ritiene che la distinzione in due distinte popolazioni neuronali rifletta una

distinzione anche per quanto riguarda il tipo di ferormoni riconosciuti: è stato infatti dimostrato che l'attivazione della subunità $\alpha 2$ avviene solo per opera di molecole lipofile volatili, mentre molecole proteiche quali l' $\alpha 2$ -globulina, la principale proteina contenuta nelle urine maschili, sono in grado di stimolare la subunità $\alpha 0$ (Chamero, Marton et al. 2007) (Norlin, Gussing et al. 2003).

Numerosi studi hanno investigato il ruolo delle subunità $\alpha 0$ ed $\alpha 2$ nell'organo vomeronasale, dimostrando come la loro delezione causi una diminuzione dei neuroni basali ed apicali rispettivamente (Chamero, Katsoulidou et al.) (Norlin, Gussing et al. 2003).

A tali deficit si associano riduzioni delle dimensioni delle zone del bulbo olfattivo accessorio a cui essi proiettano normalmente, e nel caso della $G\alpha 0$, variazioni comportamentali nell'aggressività sia tra i maschi sia per quanto concerne le femmine con prole. Recentemente è stato anche dimostrato come l'aggressività materna, mediata dalla subunità $G\alpha 0$, passi attraverso il riconoscimento delle MUPs (Major Urinary Proteins) che si trovano in gran quantità nelle urine dei maschi adulti (Chamero, Katsoulidou et al.).

La subunità $G\gamma 8$ è una proteina specifica del sistema olfattivo: la si trova infatti esclusivamente nell'epitelio olfattivo e nell'organo vomeronasale (Ryba and Tirindelli 1995). Tuttavia a differenza dell'epitelio olfattivo, nel quale essa viene espressa nei neuroni immaturi, nell'organo vomeronasale l'espressione è localizzata nei neuroni della zona basale dove compone la proteina G eterotrimerica $G\alpha\beta 2\gamma 8$ (Tirindelli and Ryba 1996).

La disponibilità di un modello murino con delezione del gene codificante la subunità $G\gamma 8$ (Fig.7) ha consentito la realizzazione del mio lavoro di tesi, in cui viene valutato il contributo di tale subunità alla trasduzione del segnale

nel sistema vomeronasale.

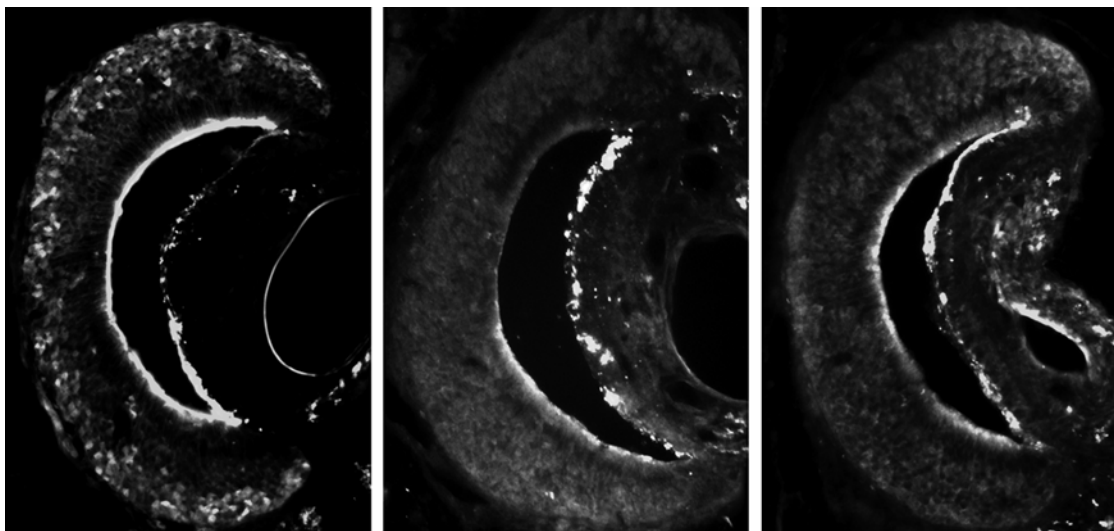


Fig.7 Immunoistochimica con anticorpo anti-G γ 8 su sezioni coronali dell'organo vomeronasale di topi di tipo selvatico (a sinistra), di tipo selvatico con l'aggiunta del peptide utilizzato per realizzare l'anticorpo (al centro) e con delezione del gene per la subunit  G γ 8.

Materiali e metodi.

Mantenimento degli animali.

Gli animali utilizzati nel presente lavoro sono stati allevati ed utilizzati per gli esperimenti nell'assoluto rispetto delle Direttive Europee (86/609 EEC, 2003/65 EC) e della legge Italiana relative all'allevamento ed all'utilizzo degli animali in laboratorio; le tecniche utilizzate sono state approvate dal Comitato Etico sulla Sperimentazione Animale dell'Università di Parma ed autorizzate dal Ministero della Salute della Repubblica Italiana.

Generazione dei topi $G\gamma 8^{-/-}$.

Il locus genico $G\gamma 8$ è stato bersaglio di ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali con un costrutto contenente il transattivatore della tetraciclina (TTA), destinato a sostituire l'intera sequenza del gene. Un clone scelto tra le cellule ingegnerizzate (5%) è stato utilizzato per la produzione di topi chimerici.

Per gli esperimenti, topi possedenti l'allele $G\gamma 8^{-/-}$ sono stati reincrociati con animali del ceppo FVB/N per dieci generazioni per ottenere nidiate di topi $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$, questi ultimi da utilizzare come controllo.

Immunoistochimica.

Topi adulti sono stati anestetizzati con fenobarbitale e perfusi prima con tampone fosfato salino (PBS) e successivamente con paraformaldeide 4%. L'organo vomeronasale ed il bulbo olfattivo accessorio sono stati estratti, postfissati per 4 ore in paraformaldeide 4% e crioprotetti per una notte con saccarosio 30%. I tessuti sono stati quindi congelati nella matrice per inclusione OCT (Cellpath, UK) e tagliati al criostato.

Sezioni dello spessore di 16 μm sono state poste su vetrini gelatinizzati e trattate con sodio dodecil solfato (SDS) 0,5% per 10 minuti, a cui è seguita una fase di blocco degli antigeni aspecifici con una soluzione di albumina sierica bovina 1% triton X-100 0,3% per 20 minuti. Sono state quindi incubate con l'anticorpo primario diluito 1:100 nella medesima soluzione di blocco, per 36 ore a 4°C.

Successivamente le sezioni sono state lavate con PBS ed incubate in anticorpo secondario biotinilato (Vector, Burlingame, CA) diluito 1:100 in PBS. Infine, le sezioni sono state nuovamente lavate ed incubate con complesso avidina-biotina-perossidasi (ABC kit) secondo le istruzioni fornite dal produttore (Vector, Burlingame, CA) o con avidina coniugata con un fluoroforo (Alexa-488 o Alexa-568), diluita 1:300 per un'ora. Le sezioni sono state nuovamente lavate e, nel caso di utilizzo del kit ABC, incubate per 10 minuti con diaminobenzidina (Sigma).

Infine sono state coperte con il coprioggetto, osservate al microscopio e fotografate con una fotocamera digitale Nikon. Le immagini fluorescenti sono state ottenute utilizzando un microscopio in fluorescenza Zeiss.

Il conteggio delle cellule marcate è stato effettuato utilizzando il software

Adobe Photoshop.

Ibridizzazione in situ.

Topi adulti sono stati anestetizzati con un'overdose di pentobarbitale sodico ed in seguito sacrificati. I tessuti freschi, non perfusi, sono stati estratti ed immediatamente congelati in OCT.

Sezioni dello spessore di 16 μm sono state poste su vetrini silanizzati, postfissate con paraformaldeide 4% per 10 minuti e permeabilizzate con triton X-100 1% in PBS. In seguito sono state acetilate con soluzione di blocco (trietanolammina 0,6%, anidride acetica 0,25%), preibridizzate con tampone di ibridazione (formammide 50%, soluzione di Denhardt 5X, tampone citrato salino SSC 5X, rRNA 0,5mg/ml, pH 7.6) ed incubate con sonde marcate con digossigenina diluite 1:5000 in tampone di ibridazione per una notte a 72°C.

Il giorno successivo sono state lavate con PBS ed incubate per un'ora in tampone di sodio citrato 0,2%, ed incubate con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina (Roche Diagnostics, Milano, IT) diluito 1:500 in tampone di blocco (acido maleico 0,1M, NaCl 0,15M, albumina 1%, pH 7.5)

In seguito, le sezioni sono state lavate ed incubate con Nitro-blu-tetrazolio (NBT) e Bromo-cloro-indolil-fosfato (BCIP) per 12 ore in tampone alcalino (Tris-HCl 100mM, NaCl 100mM, MgCl 5mM, pH 9,5). Le sezioni sono state infine lavate con acqua, coperte con coprioggetto, osservate al microscopio e fotografate con una fotocamera digitale Nikon. Le immagini fluorescenti sono state ottenute utilizzando un microscopio in fluorescenza Zeiss.

Il conteggio delle cellule marcate è stato effettuato utilizzando il software

Adobe Photoshop.

Misurazione dell'organo vomeronasale e del bulbo olfattivo.

Topi adulti sono stati anestetizzati con fenobarbitale e perfusi prima con tampone fosfato salino (PBS) e successivamente con paraformaldeide 4%. L'organo vomeronasale ed il bulbo olfattivo sono stati estratti, postfissati per 4 ore in paraformaldeide 4% e crioprotetti per una notte con saccarosio 30%. I tessuti sono stati quindi congelati nella matrice per inclusione OCT (Cellpath, UK) e tagliati al criostato. Sezioni coronali dell'organo vomeronasale e sagittali del bulbo olfattivo accessorio, dello spessore di 16 μm , sono state ottenute nella porzione mediale dei rispettivi organi.

Nell'organo vomeronasale, la distinzione tra porzione basale ad apicale è stata effettuata mediante ibridizzazione in situ con sonde antisense per $G\alpha$ e $G\alpha 2$ rispettivamente, o mediante immunisto chimica con anticorpi anti-V2R (Silvotti et al, 2007).

Per la misurazione dell'area nel bulbo olfattivo accessorio, la porzione posteriore è stata individuata mediante immunisto chimica con anticorpo anti- $G\alpha$.

Le sezioni sono state fotografate e le fotografie sono state analizzate utilizzando il software Nis Elements (Nikon) per valutare la superficie delle aree di interesse.

Analisi della proliferazione cellulare.

A topi adulti è stata effettuata un'iniezione intraperitoneale di Bromodesossiuridina (60 mg/kg).

Dopo ventiquattro ore sono stati anestetizzati con fenobarbitale e perfusi prima con tampone fosfato salino (PBS) e successivamente con paraformaldeide 4%. L'organo vomeronasale è stato estratto, postfissato per 4 ore in paraformaldeide 4% e crioprotetto per una notte con saccarosio 30%. In seguito è stato congelato nella matrice per inclusione OCT (Cellpath, UK) e tagliato al criostato.

Utilizzando il criostato sono state ottenute sezioni dello spessore di 16 μ m, successivamente poste su vetrini gelatinizzati, dalla porzione mediale dell'organo vomeronasale.

Le sezioni sono state bollite per 20 minuti in tampone citrato 10mM (pH5,5), risciacquate velocemente in acqua e incubate per 2 minuti in HCl 0,1M; infine abbondantemente lavate con PBS.

Sono state quindi incubate per una notte in anticorpo monoclonale anti-BrdU (G3G4, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa University) diluito 1:200 in soluzione di blocco (Triton X-100 0,3%, Albumina Sierica Bovina 1%).

Successivamente le sezioni sono state lavate con PBS ed incubate in anticorpo secondario biotinilato (Vector, Burlingame, CA) diluito 1:100 in PBS per due ore. Infine, le sezioni sono state nuovamente lavate ed incubate con complesso Avidina-Biotina-perossidasi (ABC kit) secondo le istruzioni fornite dal produttore (Vector, Burlingame, CA), ed in seguito lavate con PBS ed incubate per 10 minuti con Diaminobenzidina (Sigma).

Sono state quindi coperte con il coprioggetto, osservate al microscopio e fotografate con una fotocamera digitale Nikon. Il conteggio delle cellule marcate è stato effettuato utilizzando il software Adobe Photoshop.

Analisi delle risposte fisiologiche.

Sono state utilizzate le lettiere di maschi adulti, stabulati singolarmente. Per ciascun esperimento, le lettiere di quattro maschi sono state mescolate e ridivise in sei gabbie pulite.

Femmine $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$, prive di esperienza sessuale, sono state poste singolarmente nelle gabbie e lasciate lì per due ore. Sono state quindi anestetizzate con fenobarbitale e perfuse prima con tampone fosfato salino (PBS) e successivamente con paraformaldeide 4%. Il bulbo olfattivo accessorio è stato estratto, postfissato per 4 ore in paraformaldeide 4% e crioprotetto per una notte con saccarosio 30%. I tessuti sono stati quindi congelati nella matrice per inclusione OCT (Cellpath, UK) e tagliati al criostato.

Sezioni dello spessore di 16 μm sono state ottenute nell'intero spessore del bulbo olfattivo ed incubate con anticorpo anti-c-fos (Molecular Probes) diluito 1:100 per 48 ore. L'immunoreattività è stata rivelata utilizzando un anticorpo secondario coniugato con Alexa-488. La distinzione della porzione posteriore del bulbo olfattivo accessorio è stata effettuata mediante contromarcatura con un anticorpo anti-G αo ottenuto nel coniglio, seguito da un anticorpo secondario coniugato con Alexa-568.

Test comportamentali.

Per valutare l'integrità del sistema olfattivo principale, topi adulti $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$ sono stati mantenuti a digiuno per una notte. Il mattino successivo gli animali sono stati momentaneamente rimossi dalle loro gabbie e una porzione di mangime è stata nascosta sotto la lettiera, ad una profondità approssimativa di 3 cm. E' stato misurato il tempo impiegato dai topi per reperire il cibo, fino ad un massimo di 300 secondi.

Gli esperimenti sul comportamento materno sono stati condotti su femmine con prole di 5 giorni, nella cui gabbia la prole è stata posizionata nell'angolo opposto rispetto al nido. Durante il test, della durata di un'ora, il comportamento delle madri è stato registrato con una videocamera digitale e successivamente analizzato mediante il software Observer. I parametri analizzati sono stati la latenza del ritrovamento, il tempo passato nel nido, il tempo trascorso allattando i piccoli e quello trascorso pulendo gli stessi, il tempo impiegato nella costruzione di un nido.

Per il test dell'aggressività maschile, topi vergini dell'età di tre mesi sono stati posti in gabbie singole per sei giorni senza sostituire la lettiera; sono stati quindi introdotti topi intrusi di sesso maschile, la cui permanenza nella gabbia del residente è stata di dieci minuti. I parametri valutati comprendono la latenza del primo attacco, il numero di attacchi ed il numero di morsi, il tempo totale di attacco ed il tempo utilizzato per l'investigazione sociale.

I medesimi parametri sono stati misurati anche per quanto concerne l'aggressività materna.

Topi in gestazione $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$ sono stati isolati, e lasciati con la prole per

i 7 giorni successivi al parto; la prole è stata rimossa e sono stati inseriti nella gabbia intrusi di sesso maschile o femminile in maniera randomizzata, per un tempo totale di permanenza pari a dieci minuti.

Analisi statistica dei dati.

Per l'analisi statistica dei dati è stato usato il software SPSS.

Per valutare la significatività delle differenze tra le medie dei due gruppi, relativamente alle misure anatomiche ed alle risposte fisiologiche, è stato applicato il test t di Student per campioni indipendenti.

Il test statistico non parametrico U di Mann-Whitney è stato invece utilizzato per valutare se i due gruppi differissero significativamente per quanto concerneva i test comportamentali; l'uso di un test di questo tipo è stato determinato dal fatto che i dati non presentavano una distribuzione normale.

Risultati.

Alterazioni morfologiche nel sistema vomeronasale dei topi $G\gamma 8^{-/-}$.

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati gli effetti della delezione della subunità $G\gamma 8$ sul sistema olfattivo principale e secondario del topo. Gli studi effettuati rivelano come non siano rilevabili alterazioni nel sistema olfattivo principale degli animali $G\gamma 8^{-/-}$; è stato valutato lo spessore totale dell'epitelio olfattivo in sezioni rappresentative dopo marcatura con anticorpo anti-OMP, una proteina presente nei neuroni olfattivi maturi, e non sono state osservate differenze rispetto ai soggetti di controllo ($p > 0,05$).

Per valutare gli effetti della delezione di $G\gamma 8$ sull'organo vomeronasale, è stata approntata una marcatura con anticorpi anti-V2R (famiglia C), che riconoscono specificamente recettori espressi dai soli neuroni della regione basale. Benché l'organizzazione in due distinte zone rimanga evidente nei topi $G\gamma 8^{-/-}$, la zona basale mostra una significativa riduzione dello spessore (Fig.8).

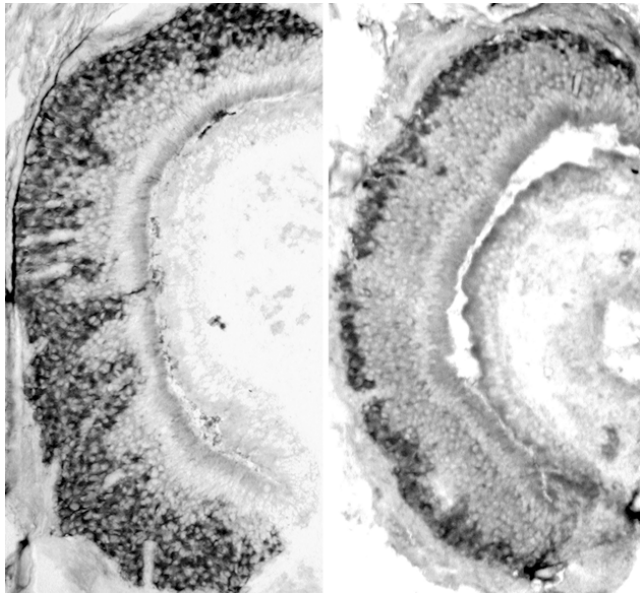


Fig.8 Immunoistochimica con anticorpi anti-V2Rs, che mostra la differenza di spessore nello strato basale dell'epitelio vomerosale in topi $G\gamma 8^{+/+}$ (a sinistra) e $G\gamma 8^{-/-}$ (a destra).

Per valutare quantitativamente tale riduzione, è stata effettuata una ibridizzazione in situ con sonde antisenso specifiche per proteine G della zona basale ($G\alpha$) ed apicale ($G\beta 2$) in sezioni di organo vomeronasale in topi $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$ dell'età di tre mesi. Mentre la zona apicale non mostra variazioni significative ($p > 0,05$), nella zona basale dell'organo vomeronasale dei topi $G\gamma 8^{-/-}$ si nota una riduzione dello spessore dell'epitelio pari al 30% dello spessore totale ($p < 0,005$) (Fig.9).

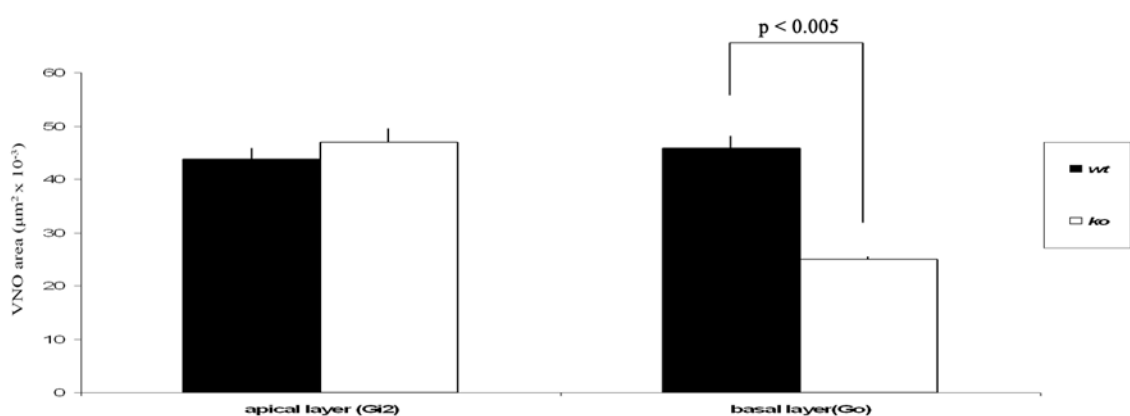


Fig. 9 Analisi statistica delle aree delle porzioni apicale e basale dell'epitelio vomeronasale.

Una riduzione così marcata dello spessore dell'epitelio potrebbe essere imputabile a due diversi meccanismi: una precoce diminuzione della proliferazione cellulare e del successivo differenziamento in neuroni maturi, oppure un'alterazione dell'equilibrio tra processi neurogenetici ed apoptotici in età adulta. Per rispondere a tale quesito, i neuroni basali sono stati marcati utilizzando un anticorpo specifico anti-V2R (famiglia A3) in animali $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$ ad età diverse a partire dalla nascita ed è stato effettuato il conteggio dei neuroni marcati (Fig.10).

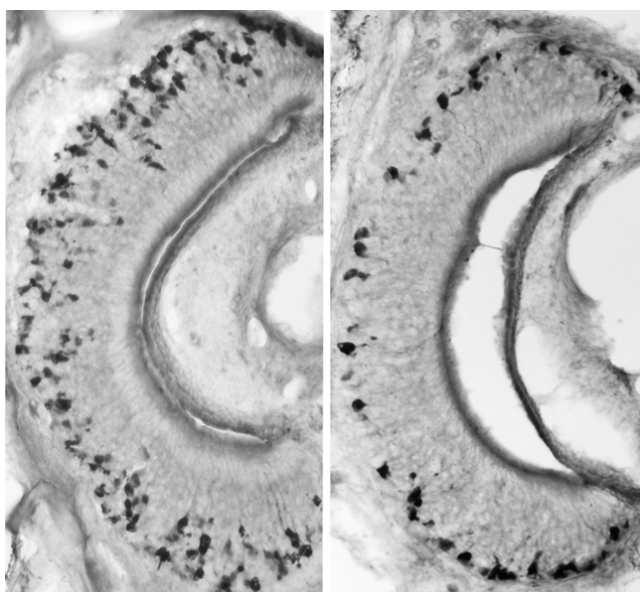


Fig.10 Immunoistochimica con anticorpo anti-VN4 (famiglia A3-V2Rs) che evidenzia differenze nella quantità dei neuroni basali VN4-positivi nei topi $G\gamma 8^{+/+}$ (a sinistra) e $G\gamma 8^{-/-}$ (a destra).

Si è potuto evidenziare come il numero dei neuroni basali nei topi $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$ non vari significativamente alla nascita ($p > 0,05$) né nelle prime settimane, fino ad arrivare al ventunesimo giorno di vita ($p > 0,05$). Da questo momento, corrispondente allo svezzamento degli animali da parte della madre, si assiste ad una progressiva riduzione dei neuroni basali nell'organo vomeronasale, negli animali $G\gamma 8^{-/-}$, fino ad arrivare ad un 70% in meno all'età di 52 settimane ($p < 0,05$) (Fig.11). Differenze tra individui di sesso diverso non sono state invece osservate né all'età di 6 settimane ($p > 0,05$) né all'età di 12 settimane ($p > 0,05$).

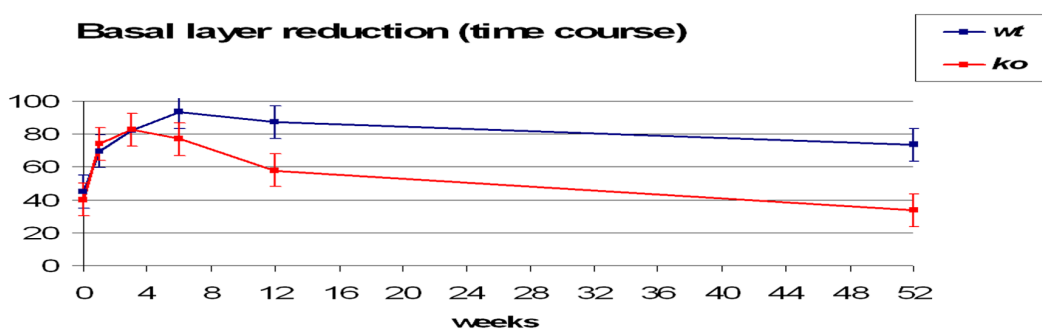


Fig.11 Grafico che mostra come la riduzione dei neuroni basali VN4-positivi inizi nei topi $G\gamma 8^{-/-}$ (rosso) al momento dello svezzamento per proseguire in maniera costante.

I neuroni basali si suddividono a loro volta in distinte sottopopolazioni, esprimenti diversi recettori della famiglia C dei V2R (Vmn2r1 e Vmn2r2), che dai dati in letteratura sembrano mostrare diverse storie evolutive; abbiamo quindi valutato, mediante anticorpi specifici, se tale riduzione colpisse specificatamente una delle due sottopopolazioni. I risultati ottenuti, non mostrati nel presente lavoro, non hanno evidenziato differenze nei topi $G\gamma 8^{-/-}$ per quanto riguarda le sottopopolazioni neuronali della regione basale dell'organo vomeronasale.

Per valutare eventuali variazioni nella proliferazione cellulare è stata

somministrata a topi adulti della Bromodesossisuridina. Si tratta di un nucleotide modificato, la cui presenza è rilevabile mediante anticorpi specifici, comunemente utilizzato come marker di proliferazione cellulare: esso viene incorporato nel genoma cellulare in luogo della timina, durante la duplicazione del DNA, e viene successivamente rilevato mediante immunistoichimica nelle cellule che si sono originate da una mitosi cellulare recente. Il numero di cellule che hanno incorporato il nucleotide modificato, negli organi vomeronasali dei topi $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$, non presenta variazioni significative ($p > 0,05$) (Fig.12).

Una riduzione così marcata dei neuroni vomeronasali dovrebbe, a rigor di logica, comportare effetti altrettanto marcati sul primo bersaglio dei neuroni stessi ovvero sul bulbo olfattivo, specificatamente nella porzione posteriore in quanto è quella che riceve normalmente le proiezioni dei neuroni vomeronasali dello strato basale. La marcatura effettuata relativamente alla localizzazione della $G\alpha o$, espressa anche nei terminali degli assoni dei neuroni vomeronasali, evidenzia come anche nei topi $G\gamma 8^{-/-}$ sia mantenuta la distinzione tra bulbo olfattivo accessorio posteriore ed anteriore, relativamente alla ricezione di proiezioni provenienti rispettivamente dalle zone basale ed apicale dell'organo vomeronasale. Nessuna differenza per quanto riguarda le dimensioni sono state riscontrate nella porzione anteriore del bulbo ($p > 0,05$) dei topi $G\gamma 8^{-/-}$ mentre per la porzione posteriore si osserva una riduzione dell'area totale di circa il 30% ($p < 0,005$), compatibile con la riduzione dei neuroni basali nell'organo vomeronasale (Fig.12).

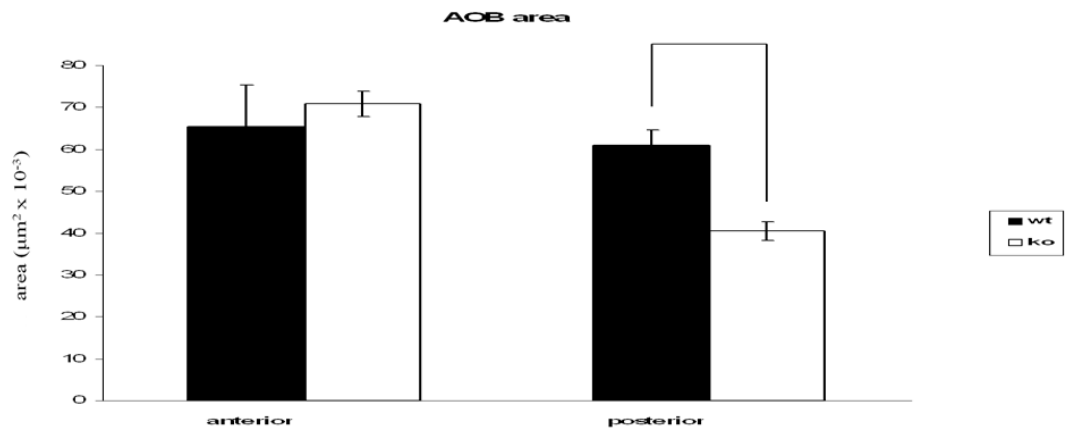


Fig.12 Grafico che mostra la riduzione dell' area del bulbo olfattivo posteriore nei topi $G\gamma 8^{-/-}$.

Risposte fisiologiche nel sistema vomeronasale dei topi $G\gamma 8^{-/-}$.

Si è pensato di valutare se le variazioni morfologiche descritte in precedenza potessero avere conseguenze sulle risposte fisiologiche, quantificando l'attivazione del sistema vomeronasale di topi femmina in seguito all'esposizione alle lettieri in cui sono stati presenti dei maschi. Si è quindi valutata la produzione del fattore di trascrizione prodotto in seguito all'espressione del gene c-fos; si tratta di un gene ubiquitario appartenente alla famiglia degli Immediate Early Genes, ovvero quei geni che vengono espressi per primi in seguito ad eventi significativi che avvengono all'interno della cellula: la loro espressione è solitamente volta alla sintesi di fattori di trascrizione, i quali innescano a loro volta l'espressione di altri geni per arrivare a risposte complesse. Nei topi, è stato dimostrato come l'espressione di c-fos ed altri geni precoci sia legata alla genesi della memoria olfattiva (Brennan, Hancock et al. 1992). Nel bulbo olfattivo, in particolare, si è visto come l'esposizione della femmina ad urine maschili causi aumenti significativi dell'espressione di c-fos nella porzione posteriore, che riceve proiezioni dai neuroni dello strato basale dell'organo vomeronasale (Chamero, Katsoulidou et al.).

I livelli di espressione di c-fos negli animali esposti a lettieri pulite non presentano differenze tra le femmine $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$ ($p > 0,05$). L'esposizione alla lettiera utilizzata dal maschio provoca, negli animali di controllo e rispetto alla lettiera pulita, un aumento delle cellule glomerulari c-fos positive dell'ordine di 3-4 volte sia nella porzione anteriore ($p < 0,005$) sia nella porzione posteriore ($p < 0,05$).

Nelle femmine $G\gamma 8^{-/-}$ l'attivazione della porzione anteriore del bulbo

olfattivo accessorio è mantenuta intatta ($p < 0,01$) (Fig.13) con l'esposizione alla lettiera usata dal maschio, mentre non si notano differenze nel numero di cellule c-fos positive ($p > 0,05$) tra esposizione ad una lettiera sporca e pulita nella porzione posteriore (Fig.14); ciò è indizio del fatto che tale porzione, nei topi $G\gamma 8^{-/-}$, ha perso la capacità di attivarsi in risposta allo stimolo utilizzato. Benché nell'esperimento siano state considerate anche le cellule mitrali, con risultati concordanti, si è preferito fare riferimento alle sole cellule glomerulari; ciò è dovuto al fatto che la suddivisione tra regione anteriore e posteriore risulta meno marcata tra la popolazione delle cellule mitrali.

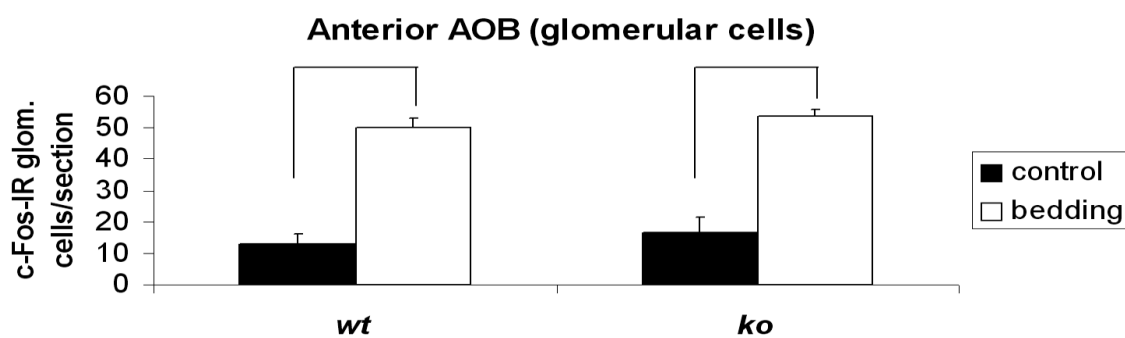


Fig.13 Cellule immunoreattive per c-fos nel bulbo olfattivo anteriore: la delezione della subunità $G\gamma 8$ non ha alcun effetto.

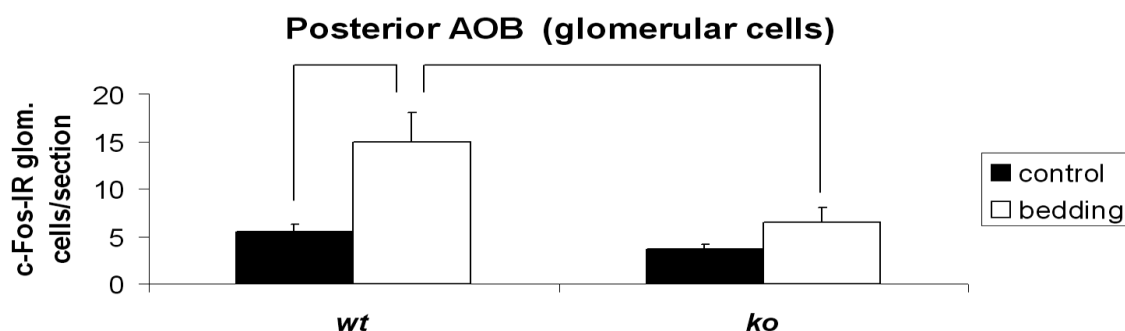


Fig.14 Cellule immunoreattive per c-fos nel bulbo olfattivo posteriore: la delezione della subunità $G\gamma 8$ rende tale porzione del bulbo insensibile all'esposizione ad urine maschili..

Anomalie comportamentali dei topi $G\gamma 8^{-/-}$.

I dati presenti in letteratura evidenziano come l'asportazione chirurgica dell'organo vomeronasale o la delezione genetica di componenti del suo sistema trasduzionale causino modificazioni più o meno profonde nel comportamento, in special modo per quanto riguarda i comportamenti sessuali o quelli comunque legati alla vita sociale.

Prima di procedere a tali valutazioni, è stata verificata l'assenza di deficit macroscopici: i topi $G\gamma 8^{-/-}$ non presentano deficit riproduttivi, e la loro prole è assimilabile a quella dei topi di controllo per quanto concerne sia il numero dei nati sia il loro peso. Non mostrano deficit locomotori, e la ricerca di cibo (Cookie Test) non richiede tempi significativamente più lunghi rispetto ai topi $G\gamma 8^{+/+}$; ciò indica che il sistema olfattivo principale non presenta alterazioni.

Sono stati valutati in primis alcuni comportamenti materni che sono noti per essere indipendenti dall'integrità del sistema vomeronasale, come il tempo speso a leccare la prole o a preparare il nido, e non sono state notate differenze tra i topi $G\gamma 8^{-/-}$ e $G\gamma 8^{+/+}$.

I topi sono animali territoriali: quando un maschio adulto dominante rileva la presenza di un intruso nel suo territorio, esso viene attaccato violentemente allo scopo di cacciarlo. Topi adulti $G\gamma 8^{-/-}$ o $G\gamma 8^{+/+}$ sono stati posti singolarmente in gabbie isolate allo scopo di renderli dominanti: quando veniva successivamente introdotto un intruso, i topi $G\gamma 8^{-/-}$ mostravano una riduzione significativa del numero di morsi ($p < 0,005$), nonché del numero ($p < 0,05$) e della durata totale degli attacchi ($p < 0,05$) rispetto ai controlli.

Coerentemente, nei topi $G\gamma 8^{-/-}$ si sono osservati aumenti del tempo trascorso tra l'inserimento dell'intruso ed il primo attacco ($p < 0,005$) e del tempo impegnato in investigazione sociale ($p < 0,005$) (Fig.16,17).

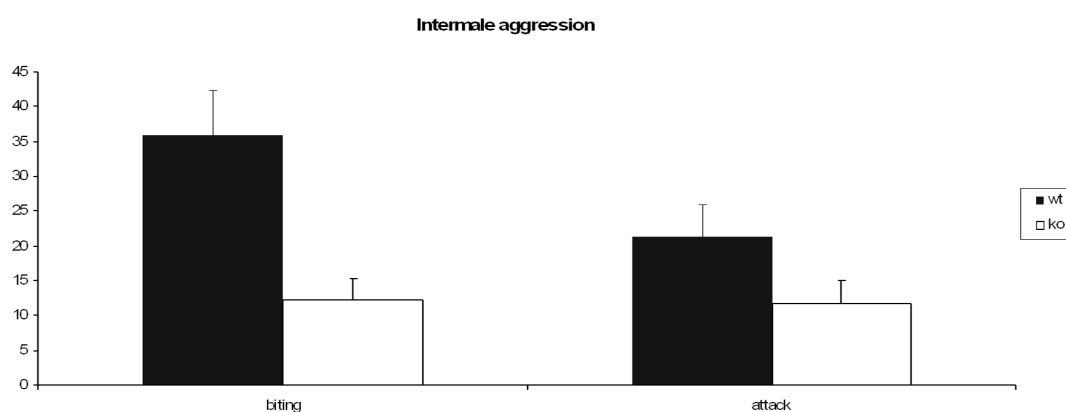


Fig. 16 Grafici che mostrano le variazioni nel numero dei morsi e degli attacchi daparte di maschi $G\gamma 8^{+/+}$ e $G\gamma 8^{-/-}$ nei confronti di un intruso di sesso maschile.

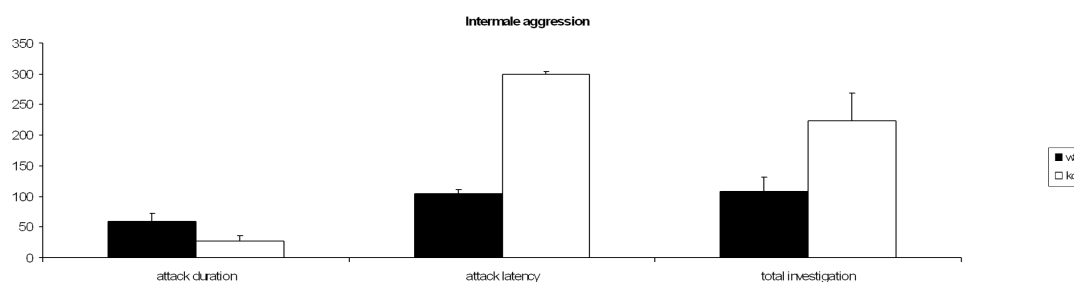


Fig. 17 Grafici che mostrano le variazioni nel tempo totale degli attacchi, nella latenza al primo attacco e nel tempo speso in investigazione sociale nei maschi $G\gamma 8^{+/+}$ e $G\gamma 8^{-/-}$ nei confronti di un intruso di sesso maschile.

La femmina del topo, generalmente, mostra comportamenti meno aggressivi: essi si manifestano, prevalentemente, qualora una femmina con prole debba difendere i propri piccoli minacciati dalla presenza di un maschio adulto. In tale situazione le femmine $G\gamma 8^{-/-}$ mostrano, rispetto ai controlli $G\gamma 8^{+/+}$, una minore aggressività nei confronti di maschi intrusi,

testimoniata da una diminuzione del numero di morsi ($p < 0,05$) (Fig.18), del numero di attacchi ($p < 0,05$) (Fig.19) e della durata complessiva degli attacchi ($p < 0,005$) (Fig.20).

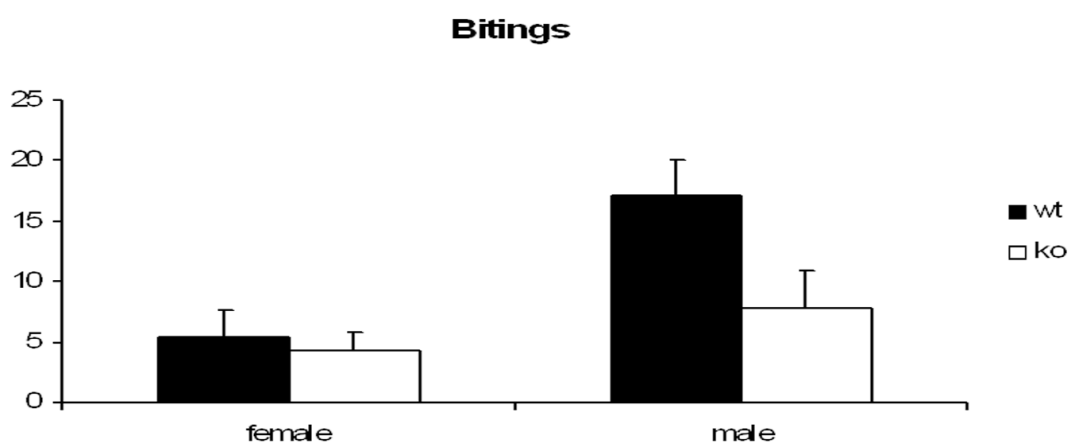


Fig. 18 Grafico che mostra la riduzione del numero di morsi da parte delle femmine con prole nei confronti di intrusi di sesso maschile, nei topi con delezione della subunità Gy8, rispetto agli animali di controllo.

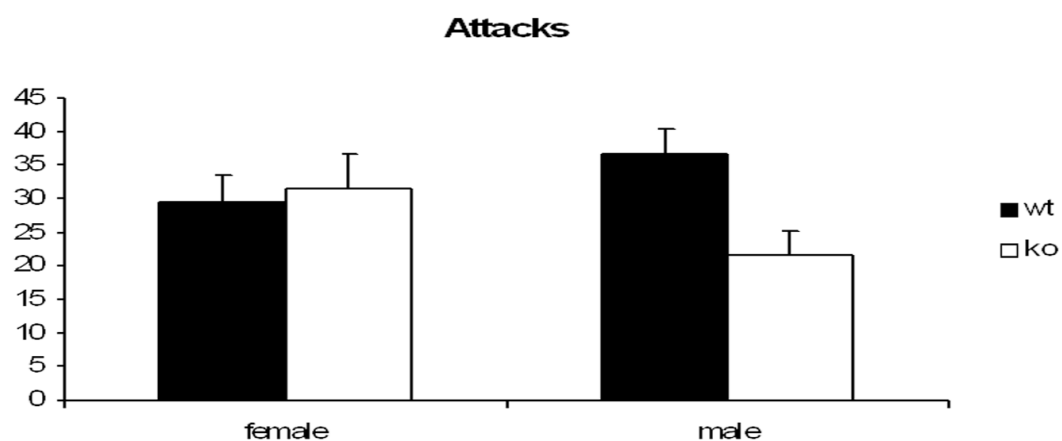


Fig. 19 Grafico che mostra la riduzione del numero di attacchi da parte delle femmine con prole nei confronti di intrusi di sesso maschile, nei topi con delezione della subunità Gy8, rispetto agli animali di controllo.

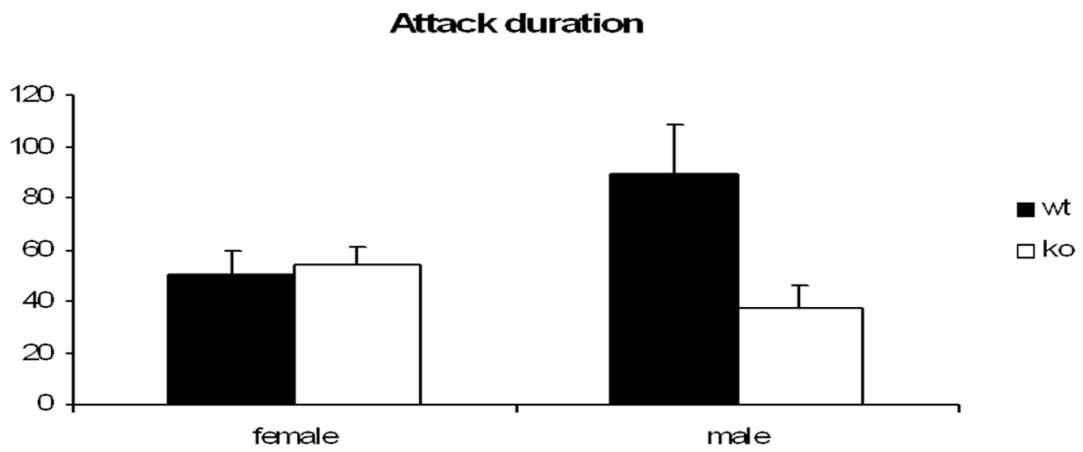


Fig. 20 Grafico che mostra la riduzione della durata totale degli attacchi da parte delle femmine con prole nei confronti di intrusi di sesso maschile, nei topi con delezione della subunità Gy8, rispetto agli animali di controllo.

Discussione.

I sensi chimici sono il risultato evolutivo della capacità, da parte della cellula, di riconoscere molecole esogene ed elaborare risposte adeguate.

Se in alcune specie, quali quella umana, la loro importanza è stata parzialmente soppiantata da sistemi sensoriali più “moderni” e più pratici, per la maggior parte del regno animale i sensi chimici, ed in particolare l'olfatto, rappresentano una funzione vitale per l'organismo e per la sopravvivenza della specie.

Tra tutte le specie animali esistenti, non vi è dubbio sul fatto che il topo sia tra quelle che più hanno sviluppato tale senso. La suddivisione in due sistemi olfattivi separati ha fornito questo animale di una capacità di discernimento senza pari, per quanto riguarda le molecole odoranti.

Il sistema olfattivo principale è costituito dall'epitelio olfattivo e dal bulbo olfattivo accessorio ed invia l'informazione sensoriale a strutture sia sottocorticali sia corticali; informazione che riguarda l'ambiente esterno e prevalentemente la presenza e l'ubicazione del cibo presente.

Il sistema olfattivo secondario, o accessorio, nonostante il nome attribuitogli non è meno importante del primo. Attraverso l'epitelio dell'organo vomeronasale esso rileva ogni possibile informazione riguardante gli altri individui della propria specie: partendo dal sesso e dalla disponibilità sessuale fino ad arrivare al grado di “parentela”, passando per il grado di minaccia che esso costituisce per l'incolumità propria e della prole.

L'informazione viene prima elaborata nel bulbo olfattivo accessorio e successivamente raggiunge strutture esclusivamente sottocorticali, ove

origina risposte neuroendocrine e comportamentali innate.

Nell'organo vomeronasale esistono due popolazioni neuronali (Dulac and Axel 1995) (Berghard and Buck 1996) (Jia and Halpern 1996) (Herrada and Dulac 1997) (Matsunami and Buck 1997) (Ryba and Tirindelli 1997) (Krieger, Schmitt et al. 1999): una apicale, in grado di riconoscere ferormoni volatili mediante i recettori della famiglia V1R accoppiati alla proteina G eterotrimerica $\alpha_2\beta_2\gamma_2$; i neuroni dello strato basale, che esprimono recettori della famiglia V2R e la proteina G eterotrimerica $\alpha\beta_2\gamma_8$, sono in grado di riconoscere i ferormoni di tipo proteico.

Lavori precedenti hanno chiarito il ruolo delle subunità $G_{\alpha 2}$ e $G_{\alpha o}$, ed investigato le modificazioni anatomiche e comportamentali che insorgono in seguito alla loro delezione (Chamero, Katsoulidou et al.; Norlin, Gussing et al. 2003).

Gli studi effettuati sulle componenti del meccanismo trasduzionale che porta alla genesi del potenziale di azione nei neuroni vomeronasali suggeriscono un possibile ruolo anche per il complesso $\beta\gamma$ (Kuang, Wu et al. 1996); tuttavia, tale ipotesi è rimasta per lungo tempo senza una risposta.

Allo scopo di rispondere a tale quesito è stato generato un modello murino privo della capacità di esprimere la subunità γ_8 : abbiamo potuto così verificare se il complesso $\beta_2\gamma_8$ abbia un ruolo attivo nel sistema vomeronasale del topo, e specificare quale esso sia.

Abbiamo dimostrato come nel topo la delezione del gene per la subunità $G\gamma_8$ causi alterazioni anatomiche del sistema olfattivo accessorio: nell'organo vomeronasale, la delezione del gene codificante per $G\gamma_8$ causa una significativa riduzione della porzione basale, causata da una costante

perdita di neuroni nello strato basale che inizia all'età dello svezzamento.

E' interessante notare come la comparsa di tali deficit collimi a perfezione con il periodo in cui l'animale, abbandonato il grembo materno, inizia la propria vita adulta ed ha bisogno del sistema olfattivo accessorio per la convivenza e la riproduzione con individui della propria specie; probabilmente, è proprio in tale fase che l'organo vomeronasale raggiunge la piena operatività in un individuo normale.

Coerentemente, come conseguenza della riduzione del numero dei neuroni basali si nota una proporzionale riduzione della porzione posteriore del bulbo olfattivo accessorio, in quanto essa è bersaglio delle proiezioni assonali provenienti da quei neuroni.

Inoltre, i topi che presentano la delezione della subunità Gy8 mostrano disfunzioni nell'attivazione del bulbo olfattivo accessorio.

Nella porzione posteriore del bulbo olfattivo accessorio delle femmine normali, sede del processamento dell'informazione proveniente dallo strato basale dell'organo vomeronasale, si notano aumenti significativi nell'espressione di c-fos in seguito all'esposizione alle urine di uno o più maschi adulti, rispetto all'esposizione ad una lettiera pulita usata come controllo.

La medesima porzione del bulbo accessorio mostra, nelle femmine Gy8^{-/-}, una sostanziale insensibilità agli stimoli ferormonali; essa è testimoniata da un'espressione di c-fos pressoché invariata in seguito all'esposizione alle urine maschili rispetto ad una lettiera pulita.

La robustezza del dato precedente è testimoniata anche dal fatto che, nella condizione "lettiera pulita", l'espressione di c-fos non risulta significativamente diversa nelle femmine Gy8^{-/-} e Gy8^{+/+}.

Tali modificazioni anatomiche e funzionali sembrano essere, in ultima analisi, la causa di modificazioni nei comportamenti legati al riconoscimento ferormonale mediato dall'organo vomeronasale, mentre si mantengono intatti i comportamenti che vengono comunemente considerati come non legati al funzionamento di tale organo, quali ad esempio quelli connessi alla cura della prole da parte della madre.

Nei topi $G\gamma 8^{-/-}$, sia nelle femmine con prole sia nei maschi dominanti, abbiamo potuto evidenziare una marcata riduzione dell'aggressività nei confronti di intrusi di sesso maschile rispetto ai topi che non presentano la delezione di $G\gamma 8$.

I dati estrapolati dalle analisi comportamentali effettuate mostrano, per quanto concerne i maschi $G\gamma 8^{-/-}$, valori medi privi di differenze significative riguardo il sesso dell'intruso; ciò porta ad ipotizzare che la mancanza di $G\gamma 8$ impedisca a questi animali di riconoscere gli individui di sesso maschile i quali, quantomeno in un primo momento e limitatamente al tempo osservato durante i nostri esperimenti, sembrerebbero indistinguibili rispetto a quelli di sesso femminile.

I risultati ottenuti collimano con i dati mostrati da precedenti autori i quali mostrano, in seguito a delezione delle subunità $G\alpha o$ e $G\alpha i 2$, deficit anatomici sia dell'organo vomeronasale sia del bulbo olfattivo, deficit funzionali e anomalie comportamentali.

I neuroni basali ed apicali riconoscono molecole ferormonali diverse ed è lecito ipotizzare che abbiano ruoli diversi; poiché è noto che la principale famiglia di proteine secrete nelle urine maschili, denominate MUPs (major urinary proteins), media comportamenti aggressivi, il presente studio rafforza l'ipotesi che la proteina $G\alpha o\beta 2\gamma 8$ medi le risposte fisiologiche e

comportamentali indotte da ferormoni proteici, attraverso il legame a recettori della famiglia V2R.

Inoltre, esso conferma il ruolo di primo piano del complesso $\beta 2\gamma 8$ nella genesi della cascata trasduzionale che porta alla genesi del potenziale d'azione, in seguito all'attivazione della proteina G ed alla sua scissione in subunità α e complesso $\beta 2\gamma 8$.

Bibliografia.

- Berghard, A. and L. B. Buck (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**(3): 909-18.
- Brennan, P. A., D. Hancock, et al. (1992). "The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice." Neuroscience **49**(2): 277-84.
- Chamero, P., V. Katsoulidou, et al. "G protein G(α)o is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(31): 12898-903.
- Chamero, P., T. F. Marton, et al. (2007). "Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour." Nature **450**(7171): 899-902.
- Dulac, C. and R. Axel (1995). "A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals." Cell **83**(2): 195-206.
- Herrada, G. and C. Dulac (1997). "A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution." Cell **90**(4): 763-73.
- Jacobson, L., D. Trotier, et al. (1998). "Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813)." Chem Senses **23**(6): 743-54.
- Jia, C. and M. Halpern (1996). "Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (G α i2 and G α o) and segregated projections to the accessory olfactory bulb." Brain Res **719**(1-2): 117-28.
- Krieger, J., A. Schmitt, et al. (1999). "Selective activation of G protein subtypes in the vomeronasal organ upon stimulation with urine-derived compounds." J Biol Chem **274**(8): 4655-62.
- Kuang, Y., Y. Wu, et al. (1996). "Identification of a phospholipase C beta2 region that interacts with G β -gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2964-8.
- Lledo, P. M., G. Gheusi, et al. (2005). "Information processing in the

- mammalian olfactory system." Physiol Rev **85**(1): 281-317.
- Martini, S., L. Silvotti, et al. (2001). "Co-expression of putative pheromone receptors in the sensory neurons of the vomeronasal organ." J Neurosci **21**(3): 843-8.
- Matsunami, H. and L. B. Buck (1997). "A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals." Cell **90**(4): 775-84.
- Ngai, J. (2004). "Science imitates art: the cloning of mice from olfactory sensory neurons." Cell **116**(5): 636-7.
- Norlin, E. M., F. Gussing, et al. (2003). "Vomeronasal phenotype and behavioral alterations in G alpha i2 mutant mice." Curr Biol **13**(14): 1214-9.
- Ryba, N. J. and R. Tirindelli (1995). "A novel GTP-binding protein gamma-subunit, G gamma 8, is expressed during neurogenesis in the olfactory and vomeronasal neuroepithelia." J Biol Chem **270**(12): 6757-67.
- Ryba, N. J. and R. Tirindelli (1997). "A new multigene family of putative pheromone receptors." Neuron **19**(2): 371-9.
- Sasaki, K., K. Okamoto, et al. (1999). "Inositol-1,4,5-trisphosphate accumulation induced by urinary pheromones in female rat vomeronasal epithelium." Brain Res **823**(1-2): 161-8.
- Silvotti, L., A. Moiani, et al. (2007). "Combinatorial co-expression of pheromone receptors, V2Rs." J Neurochem **103**(5): 1753-63.
- Tirindelli, R., M. Dibattista, et al. (2009). "From pheromones to behavior." Physiol Rev **89**(3): 921-56.
- Tirindelli, R. and N. J. Ryba (1996). "The G-protein gamma-subunit G gamma 8 is expressed in the developing axons of olfactory and vomeronasal neurons." Eur J Neurosci **8**(11): 2388-98.
- Wekesa, K. S. and R. R. Anholt (1997). "Pheromone regulated production of inositol-(1, 4, 5)-trisphosphate in the mammalian vomeronasal organ." Endocrinology **138**(8): 3497-504.
- Wu, Y., R. Tirindelli, et al. (1996). "Evidence for different chemosensory signal transduction pathways in olfactory and vomeronasal neurons." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 900-4.

Ode al suo aroma

Mia dolce, di che profumi,
di quale frutto,
di quale stella, di quale foglia?
Vicino
alla tua piccola orecchia
o sulla tua fronte
mi chino,
inchiodo
il naso tra i capelli
e il sorriso
cercando, conoscendo
l'origine del tuo aroma:
è dolce, ma non è fiore,
non è la pugnata
del garofano penetrante
o impetuoso aroma
di violenti gelsomini,
è qualcosa [...]

P. Neruda