

Ann. Mus. civ. Rovereto	Sez.: Arch., St., Sc. nat.	Vol. 24 (2008)	197-238	2009
-------------------------	----------------------------	----------------	---------	------

MATILDE ELISABETTA INGRID NICITA

ORMONI CEREBRALI E COMPORTAMENTO:
VASOPRESSINA E OSSITOCINA NELL'ARVICOLA
DELLE PRATERIE (*MICROTUS OCHROGASTER*)

Abstract - MATILDE ELISABETTA INGRID NICITA - Cerebral hormones and behaviour: vasopressin and oxytocin in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*).

This article analyses the connection between the two neurohypophysial hormones, oxytocin and vasopressin, and the behaviour in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*), monogamous and social species. It also examines the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) and the montane vole (*Microtus montanus*), non monogamous and unsocial species. It particularly analyses the contribution of vasopressin and oxytocin in regard to pair bonding, parental care, monogamy, partner preference, reproductive behaviour together with the cellular, neural and cognitive mechanisms, bearing in mind a possible sexual dimorphism.

The results of the analysed experiments suggest a significant influence of vasopressin and oxytocin on social behaviours in voles.

Key words: Rodents - Prairie vole - Parental care - Pair bonding - Neuroendocrinology.

Riassunto - MATILDE ELISABETTA INGRID NICITA - Ormoni cerebrali e comportamento: vasopressina e ossitocina nell'Arvicola delle praterie (*Microtus ochrogaster*).

Nell'articolo si prende in esame il rapporto tra i due neuroormoni ipofisari ossitocina e vasopressina e il comportamento nell'Arvicola delle praterie (*Microtus ochrogaster*), specie monogama e sociale, con alcune considerazioni anche sull'Arvicola della Pennsylvania (*Microtus pennsylvanicus*) e sull'Arvicola montana (*Microtus montanus*), specie promiscue e asociali. In particolare si analizza il contributo di vasopressina ed ossitocina sui legami di coppia, sulle cure parentali, sulla monogamia, sulla preferenza per il partner, sul comportamento riproduttivo, e i meccanismi cellulari, neurali e cognitivi che ne permettono l'espressione, tenendo conto di un possibile dimorfismo sessuale.

I risultati degli esperimenti esaminati suggeriscono che la vasopressina e l'ossitocina esercitano un'influenza significativa sui comportamenti sociali nelle arvicole.

Parole chiave: Roditori - Arvicola delle praterie - Cure parentali - Legami di coppia - Neuroendocrinologia.

1. LE ARVICOLE

Le arvicole sono dei piccoli roditori dall'aspetto simile ai topi ma con un corpo più robusto, occhi e orecchie più piccoli, zampe più corte, pelo sul ventre più folto e lungo, coda corta ricoperta da pelo. I maschi sono più grandi e più pesanti delle femmine, che sono dotate di otto mammelle. Il mantello può variare dal marrone al grigio, con caratteristiche sfumature a seconda della specie. Le arvicole sono erbivore, mangiano radici ed erbe e danneggiano facilmente prati e piante, foreste e frutteti, rosicchiando anche grossi tronchi.

Le arvicole fanno parte della famiglia dei Muridi e le specie più comuni appartengono al genere *Microtus* (il termine fa riferimento alle piccole orecchie) e sono presenti in colonie di circa 300 individui nell'America del Nord, nell'Europa settentrionale e in Asia. L'habitat tipico è costituito da zone erbose, però possono vivere anche sulle pareti di montagne rocciose, nelle paludi, nelle tundre e sugli alberi. Come altri roditori, scavano sistemi complessi di gallerie ramificate, di cunicoli e tane sotterranee e non interrompono la loro attività nemmeno d'inverno, quando la neve cade e ricopre il terreno.

La dieta delle arvicole è principalmente vegetariana e comprende erbe, trifoglio, piantaggine, carice, semi, cereali, foglie e anche bulbi, tuberi, arbusti, radici e cortecce di piccoli alberi. Occasionalmente rientrano nella loro alimentazione anche gli insetti. Le arvicole mangiano e consumano quotidianamente il corrispettivo del loro peso e, sebbene a volte accumulino ed immagazzinino cibo, in inverno non vanno in letargo.

Con qualche leggera variazione da specie a specie, le arvicole sono uno dei mammiferi con il ciclo di vita più breve: arrivano molto raramente oltre l'anno di età e spesso non vivono più di due mesi; ma l'estrema brevità della loro esistenza è controbilanciata da una vita molto concentrata. Raggiungono la maturità sessuale ad appena un mese d'età e la riproduzione avviene tutto l'anno, con le femmine che sono solite accoppiarsi nuovamente subito dopo aver partorito. Questo spiega una riproduzione così rapida ed intensa (da 5 a 10 nidiate all'anno). La gestazione ha una durata di 21 giorni. Ogni cucciolata è in genere formata da 4 a 7 piccoli, con eccezioni che vanno fino a 12. Le arvicole alla nascita pesano due grammi e sono sprovviste di pelo. Aprono gli occhi tra l'ottavo e il decimo giorno di vita e vengono svezzate a tre settimane. Il pelo e il corpo crescono molto velocemente durante le prime tre settimane e, una volta raggiunto il mese d'età, questo processo rallenta. Il peso arriva fino ai 115 grammi e la lunghezza varia dagli 8 ai 19 centimetri.

Il numero delle arvicole è altamente variabile da un anno all'altro: se le condizioni ambientali (clima, risorse alimentari) sono favorevoli, le popolazioni si ampliano in poco tempo. Il numero può fluttuare anche in maniera ciclica, raggiungendo alternativamente numeri massimi e minimi nell'arco di 3-6 anni. L'uo-

mo e le sue attività, così come altri fattori, influenzano il loro andamento riproduttivo: in condizioni normali, a un'elevata riproducibilità corrisponde un'altrettanta elevata mortalità che si riduce però quando l'uomo, coltivando campi e frutteti, offre agli animali favorevoli opportunità alimentari.

Sono state riconosciute circa 70 specie di arvicole, tra cui l'Arvicola della Pennsylvania, l'Arvicola artica, l'Arvicola delle paludi d'acqua salata della Florida (specie a rischio a causa del deterioramento del suo habitat), l'Arvicola d'acqua (molto diffusa nel Regno Unito, anche se il progressivo inquinamento delle acque ne sta riducendo il numero), l'Arvicola della California, l'Arvicola delle pinete, l'Arvicola montana e l'Arvicola delle praterie.

1.1 L' Arvicola della Pennsylvania (*Microtus pennsylvanicus*)

L'Arvicola della Pennsylvania (Fig. 1) è una delle specie più comuni ed è la più diffusa nell'America del Nord dall'Alaska centrale alla costa atlantica, ma anche più a sud, negli stati del Nuovo Messico e in Georgia. Come la maggior parte delle altre arvicole, essa è attiva prevalentemente di notte. Il dorso ed i fianchi sono ricoperti da una pelliccia color grigio-marrone, il ventre invece è più chiaro. Il nido che costruisce all'interno delle tane o in un avvallamento del terreno, al riparo sotto la fitta vegetazione o sotto le pietre, ha una forma sferica ed è costituito da pezzi di piante e di erbe. Il ciclo di vita è estremamente breve e si conclude in genere in meno di un anno. Sessualmente promiscuo, il *Microtus pennsylvanicus* tende a vivere insieme agli altri, tuttavia gli individui sono molto aggressivi tra loro, soprattutto i maschi durante il periodo riproduttivo, che dura tutto l'anno, con predilezione per la primavera.

1.2 L'Arvicola delle praterie (*Microtus ochrogaster*)

L'Arvicola delle praterie (Fig. 2) vive nelle praterie a erba alta dell'America settentrionale ed è, anch'essa, attiva principalmente di notte. L'attività diurna si svolge solo nei periodi freddi, durante i quali si insedia nelle biche di grano, da cui riceve sostentamento e protezione. È un animale molto diffidente nei confronti dei predatori e, quando è impaurito, fugge attraverso l'erba e torna a nascondersi nella sua tana sotterranea. Tra i suoi nemici ci sono, di giorno, il Falco della palude e, di notte, il Coiote e la Civetta dalle orecchie corte. Le principali stagioni riproduttive sono la primavera e l'autunno, anche se la riproduzione può avvenire sempre. Il numero dei piccoli per cucciolata è condizionato da fattori come la stagione, la disponibilità di cibo e l'età della madre. L'Arvicola delle praterie è un animale molto sociale e monogamo, con una grande devozione genitoriale. Ciò vale per gli individui di entrambi i sessi. A differenza di quello che accade comunemente negli altri animali, nel *Microtus ochrogaster* non solo le



Fig. 1 - *Microtus pennsylvanicus*
(www.voles.com).



Fig. 2 - *Microtus ochrogaster*
(www.voles.com).

femmine, ma anche i maschi contribuiscono alla cura e all'allevamento dei nuovi nati. Il legame di coppia, che si forma tra i genitori dopo l'accoppiamento, è molto solido e stabile e può essere mantenuto fedelmente anche per tutta la vita. Il maschio si occupa della difesa della propria compagna, ogni volta che ce ne sia necessità, e dimora con lei nella stessa tana. I piccoli vengono accuditi a lungo e vivono insieme a entrambi i genitori. La socialità, la cura materna e paterna dei figli e la monogamia sono le caratteristiche distintive di questa specie.

2. L'IPOTALAMO E GLI ORMONI NEUROIPOFISARI: VASOPRESSINA ED OSSITOCINA

2.1 *L'ipotalamo*

L'ipotalamo è situato nel diencefalo al di sotto del talamo lungo le pareti del terzo ventricolo, vicino all'eminenza mediana (tuber cinereum e infundibulum) e all'ipofisi (ghiandola pituitaria), cui è connesso mediante il peduncolo ipofisario. Esso rappresenta un'estensione del tronco cerebrale e viene ritenuto una struttura filogeneticamente antica. Nonostante la sua prossimità anatomica al talamo, queste due aree del sistema nervoso centrale sono funzionalmente ben distinte. Il talamo costituisce il principale nucleo di ritrasmissione delle informazioni sensoriali dirette alla corteccia cerebrale. L'unico sistema sensoriale che non ritrasmette al talamo è quello olfattivo. Anche gli input motori passano per il talamo. Lesioni talamiche determinano infatti significativi deficit sensoriali e motori. L'ipotalamo è implicato, invece, nella regolazione neuroendocrina e nel controllo delle funzioni viscerali, per le quali riceve efferenze dal sistema nervoso autonomo. Esempi delle sue funzioni sono la regolazione della temperatura corporea, dell'appetito e dell'assunzione dei cibi, della sete, delle emozioni (connessioni con il sistema limbico), la motivazione ed il comportamento riproduttivo. Per questo lesioni ipotalamiche possono sconvolgere varie funzioni corporee e psicologiche. L'ipotalamo regola l'ambiente interno dell'organismo che, al fine della sopravvivenza, deve mantenersi in un range ristretto di valori fisiologici. Tutto il sistema nervoso contribuisce a questo processo chiamato omeostasi. A questo scopo, l'ipotalamo rileva anche le più piccole variazioni e, in base a queste, organizza ed integra risposte appropriate per riportare il valore «deviato» a quello ottimale.

Esistono tre differenti tipologie di risposte ipotalamiche ai segnali sensoriali provenienti direttamente dall'ambiente interno: l'umorale, per cui i neuroni dell'ipotalamo stimolano o, al contrario, inibiscono il rilascio degli ormoni dall'ipofisi; la motoria viscerale, per cui i neuroni ipotalamici equilibrano l'attività delle divisioni simpatica e parasimpatica del sistema nervoso autonomo; la motoria somatica, che induce una vera e propria risposta comportamentale. Anatomicamente l'ipotalamo si divide in tre distinte regioni: la zona laterale, la mediale (queste due sono connesse al tronco encefalico e al telencefalo) e la periventricolare. La zona periventricolare affianca il terzo ventricolo ed è formata anche da un fascio di neuroni posizionato lateralmente rispetto al tratto ottico, denominato nucleo sopraottico (SON). Inoltre essa contiene altri due nuclei neuronali: il nucleo soprachiasmatico, situato sopra il chiasma ottico e direttamente innervato dalla retina, che si occupa di sincronizzare i ritmi circadiani con il ciclo di luce-buio quotidiano; il cluster dei neuroni neurosecretori, che proiettano al peduncolo ipofisario e all'ipofisi stessa. Nell'ipotalamo giacciono anche altri nuclei

di neuroni denominati a seconda della posizione che occupano: paraventricolare (PVN), ventromediale (VMN), dorsomediale (DMN), arcuato (ARC), anteriore, posteriore e l'area preottica mediale (MPOA). In essi sono localizzati i corpi cellulari di neuroni che proiettano i loro assoni all'infundibulum e da qui poi alcuni di essi, provenienti soprattutto dal PVN, proiettano anche all'ipofisi anteriore o posteriore.

La corteccia cerebrale si connette all'ipotalamo attraverso il sistema limbico, implicato nella regolazione emozionale, che forma una sorta di anello intorno al tronco encefalico. Tale anello comprende la corteccia intorno al corpo calloso, il giro del cingolo, la corteccia mediale del lobo temporale (corteccia entorinale) e l'ippocampo. Nel circuito l'ipotalamo viene raggiunto dalla corteccia del cingolo mediante l'ippocampo e il fornice (fascio assonale che diparte dall'ippocampo) e l'ipotalamo raggiunge la corteccia del cingolo attraverso i nuclei talamici anteriori. Dalla corteccia cingolata l'informazione va infine alla neocorteccia (lobo frontale).

2.2 Vasopressina ed ossitocina

L'ipofisi è una ghiandola endocrina che media la comunicazione tra l'ipotalamo e il resto del corpo. Si trova al di sotto della base del cervello ed è supportata da uno spazio osseo concavo del cranio. Presenta due suddivisioni neuroanatomiche: i lobi anteriore e posteriore. L'anteriore viene detto anche adenoipofisi e rilascia vari ormoni (detti ipofisotropici), alcuni dei quali regolano, a loro volta, altre ghiandole endocrine, ad esempio le surrenali (asse ipotalamo-ipofisario-surrene), le mammarie, le gonadi (testicoli ed ovaie) e la tiroide. L'ipofisi anteriore viene ripartita in tre divisioni: la distale, in cui sono collocate le cellule produttrici di ormoni; l'intermedia, molto piccola e rudimentale negli uomini; la tubolare, che si attacca al peduncolo ipofisario (CACIOPPO *et alii*, 2000). L'ipotalamo, grazie ai neuroni neurosecretori parvocellulari della zona periventricolare, secreta ormoni nella circolazione ematica che controllano il rilascio e l'inibizione degli ormoni adenoipofisari. Questi neuroni comunicano con l'ipofisi anteriore attraverso il flusso sanguigno, dato che le loro terminazioni nervose non raggiungono l'interno del lobo. Il sistema ematico in questione è chiamato circolazione portale ipotalamo-ipofisaria.

Per fare un esempio, in condizioni di stress i neuroni parvocellulari secernono l'ormone rilasciante la corticotropina (CRH) nel sangue della circolazione portale. Una volta raggiunti i recettori per esso nell'adenoipofisi, il CRH stimola il rilascio pulsatile di corticotropina (od ormone adrenocorticotropico, ACTH), il quale, attraverso la circolazione sanguigna, raggiunge la corticale del surrene, che è la porzione periferica della ghiandola target. Qui l'ormone ipofisotropico esercita il suo effetto che si conclude, in questo caso, determinando il rilascio di cortisolo, l'ormone dello stress (BEAR *et alii*, 2002). Altri ormoni sintetizzati e secreti dall'ade-

noipofisi sono: l'ormone della crescita (GH), la prolattina (PRL), l'ormone stimolante la tiroide (TSH), l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone stimolante i follicoli (FSH). Il continuo feedback, inviato all'ipofisi e all'ipotalamo da recettori specializzati, sulla situazione attuale, nonché sui cambiamenti delle concentrazioni corporee delle sostanze, consente monitoraggio e regolazione nervosa costanti della produzione ormonale da parte delle ghiandole endocrine.

Il lobo posteriore (o neuroipofisi) riceve, attraverso il chiasma ottico ed il peduncolo ipofisario, le terminazioni nervose dei neuroni neurosecretori magnocellulari dell'ipotalamo (nuclei sopraottico e paraventricolare) che agiscono come una ghiandola e rilasciano direttamente nei capillari neuroipofisari sostanze chimiche, i neuroormoni. La vasopressina e l'ossitocina sono neuroormoni peptidici, costituiti da una catena di nove aminoacidi, molto simili tra loro dal punto di vista strutturale; si differenziano solamente per due aminoacidi.

La vasopressina (AVP), od ormone antidiuretico (ADH), controlla il volume e la concentrazione salina del sangue e quindi il contenuto corporeo di acqua. Variazioni come una deprivazione d'acqua, che provoca una diminuzione del volume sanguigno (ipovolemia) e, allo stesso tempo, un'aumentata concentrazione di sali nel sangue, sono percepite da barorecettori del sistema cardiovascolare, ma anche da cellule ipotalamiche sensibili a volume e concentrazione salina. Queste ultime, rilevata l'informazione, rilasciano la vasopressina che contengono. Essa esercita un'azione diretta sui reni, determinando ritenzione idrica e riducendo la produzione d'urina. Anche l'organo subfornicale, un'area cerebrale priva della barriera ematoencefalica, proietta all'ipotalamo e attiva non solo i neuroni neurosecretori contenenti vasopressina, ma anche i neuroni ipotalamici della zona laterale che, attivati, stimolano una gran sete. Questo avviene quando il volume sanguigno è diminuito e i reni immettono nel sangue l'enzima renina che converte la proteina epatica angiotensinogeno in angiotensina I, la quale si scinde e dà origine all'angiotensina II, che agisce direttamente sui reni e sui vasi sanguigni, aumentando volume e pressione arteriosa. È proprio l'angiotensina II ad essere rilevata nel sangue dall'organo subfornicale.

Sono state identificate tre classi di recettori per la vasopressina: V_1 , V_2 e V_3 , che a loro volta si suddividono in sottoclassi. Sono i V_2 a mediare principalmente gli effetti fisiologici della vasopressina sui reni. I recettori V_1 provocano la contrazione dei muscoli lisci e quindi anche vasocostrizione. Per questo effetto sono comunque necessarie dosi più elevate di AVP, rispetto alla dose sufficiente per attivare i V_2 , i quali presentano maggiore affinità per l'ormone.

I neuroni neurosecretori magnocellulari rilasciano anche l'ossitocina. Da essa dipendono le contrazioni dell'utero che, al termine della gravidanza, aiutano a partorire, ma anche le contrazioni delle cellule mioepiteliali delle ghiandole mammarie, che provocano l'eiezione del latte materno. Input sensoriali (ad esempio le sensazioni somatiche causate dal bambino mentre succhia il latte o la sola vista

di un bimbo, anche non il proprio, o la percezione di un pianto infantile da parte di una madre) possono stimolare il rilascio del latte e la secrezione di ossitocina. Lo stimolo sensoriale giunge alla corteccia, attraverso il talamo, ed è proprio la corteccia ad attivare l'ipotalamo per secernere il neuroormone. La corteccia può inviare all'ipotalamo, però, anche segnali di tipo inibitorio (sistema a feedback negativo), bloccando così il rilascio di ossitocina e latte, ad esempio quando in gioco ci sono componenti ansiogene.

I recettori dell'ossitocina si trovano nel cervello (specialmente nel sistema limbico), ma anche nell'utero. L'utero dà risposte fisiologiche e farmacologiche diverse a seconda delle specie animali, delle fasi del ciclo mestruale e della gestazione. Le contrazioni ritmiche che lo caratterizzano derivano dal muscolo stesso, cioè da potenziali d'azione generati da cellule del miometrio, che ne costituisce le pareti muscolari lisce, e sono regolate dagli ormoni sessuali. All'inizio della gravidanza l'utero si muove poco, dato che gli estrogeni, potenziati dal progesterone, determinano un'iperpolarizzazione cellulare del miometrio. Nel nono mese le contrazioni aumentano gradualmente e durante il parto diventano coordinate. L'utero è costituito anche da uno strato mucoso, l'endometrio, che ogni mese diventa più spesso per accogliere un'eventuale gravidanza. È proprio questo strato che viene perso, nella mestruazione, se la gravidanza non ha luogo. L'attività del miometrio è posta sotto il controllo dell'ossitocina che ne stimola la contrazione dal fundus alla cervice (parte inferiore). Gli estrogeni stimolano la sintesi dei recettori ossitocinergici e pertanto l'utero, nella fase finale della gravidanza, presenta sensibilità massima all'ossitocina. Questa, liberata durante la suzione del latte da parte del bambino, induce l'utero alle contrazioni ed al ripristino delle sue normali dimensioni dopo il parto. L'ossitocina utilizzata clinicamente per via endovenosa per indurre il parto è la pitocina. L'Atosiban, un antagonista dell'ossitocina, viene somministrato clinicamente per evitare il travaglio prematuro. L'ossitocina presenta anche effetti vasodilatatori.

In conclusione l'ipotalamo controlla il sistema endocrino direttamente attraverso l'ipofisi posteriore e indirettamente attraverso l'ipofisi anteriore. I neuroni neurosecretori ricevono e inviano messaggi elettrici (sono cellule nervose), ma liberano anche ormoni nel torrente circolatorio (sono anche cellule endocrine): possono essere considerati dei trasduttori neuroendocrini che convertono informazioni nervose in informazioni ormonali (KANDEL *et al.*, 2003).

3. REGOLAZIONE NEUROCHIMICA DEL COMPORTAMENTO AFFILIATIVO E RIPRODUTTIVO

Con il termine affiliazione si intende il processo tramite il quale iniziano ad instaurarsi, fino a consolidarsi, i legami sociali. Esso fa riferimento a comportamenti quali il rannicchiarsi insieme e pulirsi, ma può venire esteso anche ad altri,

come interazioni sociali non aggressive di vario genere: legami di coppia, atti sessuali, mutua difesa, monogamia e cure parentali per gli individui adulti e il gioco per i giovani (SCHULKIN, 1993). L'affiliazione è un presupposto da cui la riproduzione non può prescindere.

I vertebrati si servono di strategie riproduttive di tipo sessuale: così facendo, ottengono il vantaggio di non dare alla luce un individuo identico ai genitori, ma diversificato dal punto di vista genetico e quindi anche comportamentale (fenotipico), il che si traduce in possibilità di sopravvivenza più ampie. Ciò infatti consente una maggiore adattabilità a condizioni ambientali mutevoli, dato che alcuni nati potranno essere più deboli ed altri invece più forti della coppia che li ha generati. In una prospettiva evuzionistica, il fine di ogni strategia riproduttiva è la fitness, cioè la massimizzazione del successo riproduttivo e quindi della sopravvivenza e della riproduzione dei piccoli stessi e del patrimonio genetico di cui i cuccioli sono portatori, che altro non è se non il materiale ereditato dai genitori.

3.1 Gli ormoni sessuali

Gli ormoni sessuali sono steroidi cioè sostanze chimiche che vengono sintetizzate a partire dal colesterolo e che presentano una struttura molecolare con quattro anelli di carbonio. Essi vengono rilasciati dagli organi riproduttivi (ovaie e testicoli) che sono regolati dall'ipofisi: è il cervello a controllare organi esterni a se stesso! Gli steroidi sessuali comprendono gli androgeni, gli estrogeni e i progestinici.

Gli androgeni sono i cosiddetti «ormoni maschili», presenti comunque in piccola quantità anche nelle femmine, che vengono secreti dai testicoli e in minore concentrazione anche da altre sedi, ad esempio i surreni. A questa categoria appartiene il testosterone che permette, ad alti livelli, lo sviluppo dell'apparato riproduttivo maschile nella fase prenatale e dei caratteri sessuali secondari nella pubertà (sviluppo muscolare, crescita ossea, villosità facciale e corporea, criniera nel leone). L'aumento del testosterone si associa anche alla rabbia, all'aggressività e a condizioni di anticipazione del rapporto sessuale.

Gli estrogeni e i progestinici sono «ormoni femminili» prodotti dalle ovaie e dalla placenta. Alla prima categoria appartengono l'estradiolo (il più potente), l'estrone e l'estriolo; alla seconda il progesterone. La concentrazione di ormoni femminili rimane piuttosto bassa durante l'infanzia ed aumenta nella pubertà, quando si sviluppano il sistema riproduttivo femminile ed il seno. Anche la sintesi dell'estradiolo inizia dal colesterolo, ma l'estradiolo in realtà è testosterone modificato nella reazione chimica dall'enzima aromatasi. Mentre i livelli sanguigni del testosterone variano, anche rapidamente, durante il giorno a causa di diversi fattori tra cui lo stress, i livelli degli ormoni femminili fluttuano più lenta-

mente. Seguono infatti un ciclo di 28 giorni. Due sono i recettori per gli estrogeni attualmente identificati: ER α ed ER β . Gli estrogeni promuovono la sintesi dei recettori del progesterone, mentre il progesterone inibisce la sintesi dei recettori degli estrogeni (RANG *et al.*, 2004).

Gli steroidi, proprio per la loro struttura, presentano un diverso meccanismo d'azione rispetto ad altri ormoni, quali i peptidi vasopressina ed ossitocina, che sono proteine. Infatti gli steroidi sono lipidici e per questa ragione attraversano liberamente il doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari e si legano a recettori intracellulari, localizzati nel citoplasma, con accesso diretto al nucleo e quindi all'espressione genica. I peptidi invece, non potendo attraversare le membrane, agiscono su recettori extracellulari.

Gli steroidi sessuali giocano un ruolo molto importante nella regolazione strutturale e funzionale del sistema nervoso centrale. Durante le fasi precoci della vita essi modellano la struttura di alcune aree cerebrali, in particolare di quelle coinvolte nel controllo del comportamento riproduttivo e della funzione ovarica (KEEFE, 2002), esercitando effetti organizzativi che riguardano la differenziazione sessuale del cervello maschile e femminile (dimorfismo sessuale). Quando l'individuo non ha ancora raggiunto l'età adulta, l'ormone sessuale organizza in maniera permanente i tessuti, modificando i genitali e i circuiti cerebrali, in modo che essi, una volta raggiunta la maturità sessuale, svolgano funzioni tipicamente maschili o femminili. Altri effetti degli steroidi sessuali avvengono durante tutta la vita e sono di tipo attivatorio: dopo che il cervello si è sviluppato completamente, gli ormoni sessuali possono influenzare e modificare temporaneamente il comportamento sessuale, attivando il sistema nervoso. Ad esempio, in alcune specie di uccelli i livelli di testosterone aumentano in primavera, dando origine a cambiamenti in alcune aree cerebrali fondamentali per un comportamento riproduttivo normale, che comprende l'esibizione di vasti e complessi repertori canori che hanno lo scopo di attirare, corteggiare e conquistare la compagna con cui poi si verifica l'accoppiamento. Nei roditori è stato dimostrato che, in fase prenatale, gli steroidi sessuali modellano irreversibilmente strutture cerebrali, tra cui il sistema limbico, responsabile del controllo del comportamento sessuale e della secrezione di gonadotropine (KEEFE, 2002). Le gonadotropine sono l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone follicolo-stimolante (FSH), rilasciati da cellule specializzate dell'ipofisi anteriore, il cui rilascio dipende dall'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH) secreto dall'ipotalamo. Nell'uomo la produzione di testosterone da parte dei testicoli dipende dall'LH e la maturazione degli spermatozoi nei testicoli dall'FSH. Nella donna le ovaie sono attive e producono estrogeni solo in presenza di LH ed FSH, i cui livelli variano ciclicamente (ciclo mestruale).

Molti animali hanno un unico ciclo estrale all'anno, in primavera, quando il clima e le risorse alimentari sono migliori. Altri, ad esempio i ratti, sono polie-

strali e possono riprodursi tutto l'anno durante brevi e frequenti periodi di calore. L'estro dei roditori è influenzato dagli steroidi sessuali: il cervello della femmina è programmato per rispondere a livelli crescenti di estrogeni, manifestando un caratteristico comportamento recettivo. Nella fase estrale periovulatoria del ciclo ovarico, il roditore femmina si sistema in una postura recettiva con il bacino sollevato (lordosi), quando le viene presentato un maschio. Dopo l'estro, invece, la femmina non agisce più recettivamente verso il maschio, ma gli è ostile. Anche gli umani, come i roditori, vengono influenzati dall'attività del sistema limbico per quanto riguarda il comportamento sessuale, anche se le componenti comportamentali primarie sono mediate da funzioni superiori, quali quelle di lobi frontali, neocorteccia e corteccia (KEEFE, 2002).

3.2 Meccanismi cellulari, neurali e cognitivi della regolazione neuropeptidergica

Relazioni forti e durature tra partner sessuali sono diffuse in molte società e soprattutto in quelle in cui la monogamia domina l'organizzazione sociale. In esse ogni membro di una coppia riproduttiva esibisce affiliazione e copulazione così come condivisione del nido selettivamente, ma non esclusivamente, con il partner. Ciò implica tipicamente anche un accudimento biparentale dei piccoli (YOUNG & WANG, 2004). Tuttavia, i mammiferi con una simile struttura sociale monogamica sono veramente pochi, appena il 3-5%. Perché si possa costituire un legame di coppia, deve sorgere una netta preferenza dell'uno per quello che sarà il proprio partner rispetto ad altri. Il che implica passare più tempo in vicinanza fisica con chi, essendo diventato il partner, è l'individuo familiare, che con l'estraneo.

Nell'Arvicola delle praterie l'accoppiamento facilita la formazione della preferenza per il partner, anche se, in certe circostanze, è sufficiente la coabitazione (senza accoppiamento) con un individuo per formare la preferenza. La formazione della preferenza, che è uno dei primi stadi per l'istituzione di un legame sociale, è mediata nel *Microtus ochrogaster* da ossitocina (soprattutto nelle interazioni madre-figlio) e da vasopressina (specialmente nei maschi per quanto concerne la marcatura odorosa, l'aggressività ed il corteggiamento). Pur essendo le densità recettoriali cerebrali simili e pur influenzando gli ormoni entrambi i sessi, l'ossitocina sembra essere più critica per il genere femminile e la vasopressina per quello maschile. Infatti anche una sola iniezione intracerebroventricolare di ossitocina accorcia i tempi, nelle femmine, per l'instaurarsi dei legami di coppia e, prima ancora, esercita un effetto facilitatorio sulla preferenza per il partner ed incrementa il contatto sociale. Inoltre, con l'iniezione, basta una coabitazione, anche breve e senza accoppiamento, con un maschio, per formare la preferenza per il partner. Analogamente la somministrazione centrale di vasopressina nei maschi facilita la formazione delle coppie anche senza accoppiamento. Al con-

trario i rispettivi antagonisti recettoriali selettivi prevengono tali legami e preferenze, addirittura anche quando tra i due individui ci sono stati molti incontri ed altrettanti accoppiamenti. Sul comportamento sociale adulto incidono, comunque, anche l'esperienza sociale precoce (BALES *et al.*, 2007) e fattori di stress quali modulatori della preferenza.

Sono stati condotti numerosi studi comparativi, sia sul campo che in laboratorio, ed esperimenti farmacologici sul ruolo dei neuropeptidi neuroipofisari nella formazione della preferenza per il partner e dei legami di coppia. Sono stati messi a confronto, relativamente alla distribuzione dei recettori dell'ossitocina (OTR) e dei recettori della vasopressina (AVPR) di sottotipo V_{1a} ($V_{1a}R$), cervelli di arvicole monogame (*Microtus ochrogaster* e *Microtus pinetorum*, altamente sociali e biparentali) e di arvicole promiscue (*Microtus pennsylvanicus* e *Microtus montanus*, solitarie ed uniparentali). I risultati indicano che le monogame presentano una più elevata densità di OTR nel nucleo accumbens (NAcc), nel nucleo caudato (C) e nel putamen (P) e una maggiore densità di $V_{1a}R$ nel pallido ventrale (VP), nell'amigdala mediale (MeA), nel talamo mediodorsale (MdThal) e nella corteccia prefrontale (PLC) rispetto alle arvicole promiscue. Nella corteccia prefrontale (PFC), invece, non ci sono differenze nella densità dei due sistemi recettoriali.

È stato dimostrato anche che l'iniezione sito-specifica di un antagonista per gli OTR nel NAcc e nella PFC delle femmine blocca la preferenza per il partner indotta da accoppiamento (YOUNG *et al.*, 2001), così come un antagonista per i $V_{1a}R$ nel VP nei maschi, somministrato prima dell'accoppiamento, inibisce la formazione della preferenza (LIM & YOUNG, 2006). Inoltre un antagonista, sempre per i $V_{1a}R$, iniettato nel setto laterale (LS) di maschi e femmine di arvicola previene il legame di coppia indotto dall'accoppiamento (LIU *et al.*, 2001).

Il NAcc ed il VP sono nuclei di ritrasmissione dei sistemi dopaminergico mesocorticolimbico di rinforzo (reward) ed oppioide. Il fatto che i recettori ossitocinergici e quelli vasopressinergici siano espressi in aree cerebrali come quelle sopra menzionate suggerisce che la formazione dei legami di coppia possa essere ricondotta allo stesso circuito neurale utilizzato, nel bene e nel male (sostanze d'abuso), dai processi di rinforzo e condizionamento. Questo circuito è un sistema modulatorio diffuso, costituito da almeno un nucleo di molte migliaia di neuroni, che si originano per lo più dal tronco encefalico ed influenzano molti altri neuroni in tutto il cervello (da qui il nome di sistema «diffuso»), grazie a neurotrasmettitori che viaggiano su lunghe distanze. Il sistema dopaminergico mesocorticolimbico si compone dell'area tegmentale ventrale (VTA), sita nel mesencefalo, che proietta al NAcc, alla PFC e a parti del sistema limbico, quali l'amigdala, l'ippocampo ed i nuclei caudato, striato e putamen. I neuroni di queste strutture, quando si attivano, agiscono liberando la dopamina in qualità di neurotrasmettitore. La funzione del circuito è quella di rinforzare i comportamenti

adattativi, utili per la sopravvivenza, tra cui l'assunzione dei cibi e l'accoppiamento e a volte anche quelli maladattivi (dipendenza da droghe). Ad esempio, l'assunzione di psicostimolanti, come la cocaina e l'amfetamina, intensifica la trasmissione all'interno del sistema. Queste sostanze impediscono che la ricaptazione della dopamina abbia luogo e ciò permette, in condizioni normali, la conclusione della neurotrasmissione. In questo modo l'azione dopaminergica negli spazi sinaptici viene prolungata e il risultato è il rinforzo del desiderio di riassumere la sostanza e quindi del comportamento di ricerca della droga.

L'accoppiamento è di rinforzo nei roditori e semplifica, nelle arvicole, la formazione delle preferenze sessuali. Si può così pensare che i legami di coppia derivino da un apprendimento condizionato, in cui si stabilisce un'associazione tra le proprietà rinforzanti del sesso (stimolo incondizionato) e lo specifico marchio odoroso del partner, che funge da stimolo condizionato (INSEL & YOUNG, 2001), e cioè tra l'attivazione del NAcc durante il rapporto sessuale e il maschio con cui la femmina si accoppia. Invece le Arvicole montane non monogame virtualmente non possiedono recettori nel NAcc e, coerentemente, non formano questa associazione né la preferenza per il partner (YOUNG *et al.*, 2001).

Il condizionamento sessuale che si crea nelle arvicole monogame dipende dai recettori dopaminergici D_1 e D_2 che si attivano nel NAcc. Il NAcc contiene terminazioni nervose e recettori dopaminergici e, con l'accoppiamento, la concentrazione extracellulare di dopamina in tale area aumenta considerevolmente nelle femmine, così come nei maschi aumenta il suo turnover (ARAGONA *et al.*, 2003). Sono i recettori D_2 e non D_1 ad attivarsi nel NAcc delle femmine e a mediare la facilitata preferenza per il partner senza che ci sia accoppiamento. Se i D_2 vengono bloccati, non è possibile che ci sia questo effetto. Ciò vale anche per i maschi in cui inoltre i D_1 , una volta resi attivi, inibiscono la preferenza indotta dall'attivazione dei D_2 o dall'accoppiamento stesso. Nei maschi che si sono accoppiati e hanno formato un legame di coppia con una femmina per due settimane aumenta nel NAcc la densità recettoriale per i D_1 , i quali impediscono l'instaurarsi dei legami di coppia. Questo può servire proprio per evitare che si formino nuovi legami e quindi per mantenere e consolidare l'attuale coppia e per stabilizzare, in ultima analisi, un'organizzazione sociale orientata alla monogamia. Queste modalità sono peculiari delle arvicole. Infatti nei ratti, ad esempio, l'aumento dell'attività dopaminergica nel NAcc non dà origine a legami di coppia.

Nell'Arvicola delle praterie il circuito di reward è modulato da ossitocina e vasopressina (Fig. 3). Nelle femmine un antagonista recettoriale dell'ossitocina nel NAcc blocca la preferenza indotta dai D_2 attivati e, specularmente, il blocco dei D_2 nel NAcc preclude la preferenza indotta dall'ossitocina. Pertanto la dopamina e l'ossitocina non agiscono sequenzialmente (in serie), ma, perché si formi nelle femmine il legame di coppia, esse devono agire, e i rispettivi recettori D_2 e OTR attivarsi, simultaneamente (in parallelo). Così nel NAcc interagiscono due

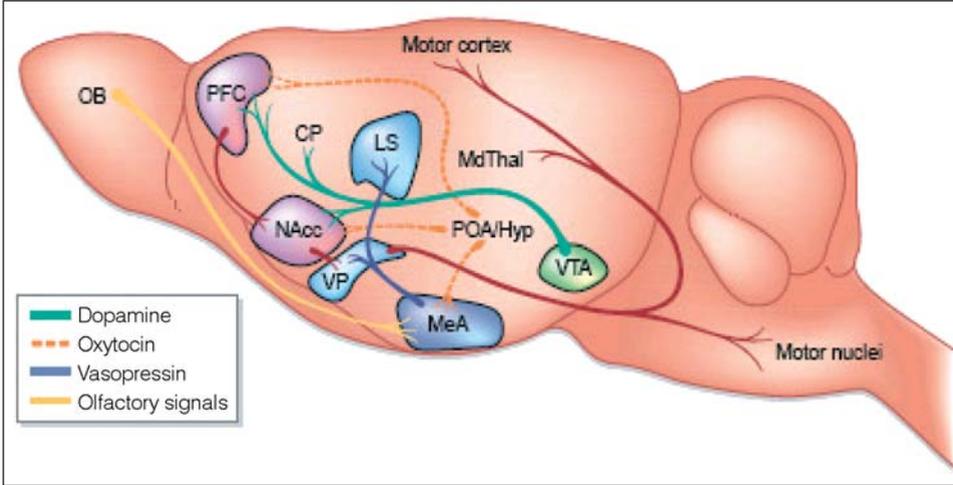


Fig. 3 - Modello neurale per la formazione della preferenza per il partner e del legame di coppia nell'Arvicola delle praterie. OB: bulbo olfattivo, NAcc: nucleo accumbens, PFC: corteccia prefrontale, CP: nuclei caudato e putamen, LS: setto laterale, VP: pallido ventrale, VTA: area tegmentale ventrale, MeA: amigdala mediale, POA/Hyp: area preottica dell'ipotalamo, MdThal: talamo mediodorsale (YOUNG & WANG, 2004).

sistemi: quello ossitocinergico e quello dopaminergico (D_2). Nei maschi interazioni analoghe avvengono tra i D_2 nel NAcc e i $V_{1a}R$ nel VP, regioni cerebrali strettamente interconnesse. Le interazioni dirette che hanno luogo nelle femmine sono dimostrate dal fatto che, nei ratti, se si somministra dopamina, essa determina il rilascio centrale di ossitocina e, viceversa, se si somministra ossitocina, questa aumenta la liberazione centrale di dopamina.

Entrambi i neuropeptidi dell'ipofisi posteriore partecipano ai processi che permettono di identificare e riconoscere marchi odorosi di conspecifici (riconoscimento sociale). Topi transgenici knockout per l'ossitocina sono stati testati ed hanno dimostrato di non riconoscere individui a cui erano stati esposti precedentemente, cioè individui noti, familiari. La somministrazione di ossitocina nella MeA è in grado di reinstaurare interamente in essi il riconoscimento sociale. Il fatto di non essere capaci di effettuare tale riconoscimento non sembra essere attribuibile a difficoltà generali nei processi olfattivi, nell'apprendimento o nella memoria, dato che essi possono comunque abituarsi ad odori nuovi, non sociali. Il riconoscimento sociale è bloccato anche da un antagonista dell'ossitocina che genera un'amnesia per il compagno. Nei topi knockout per i $V_{1a}R$ il riconoscimento sociale è del tutto assente. Essi mantengono però, come del resto i knockout per l'ossitocina, prestazioni nella norma in altri compiti cognitivi ed olfattivi.

Il legame di coppia può, quindi, essere dato dalla convergenza dei circuiti neurali dopaminergico di rinforzo e della discriminazione sociale (YOUNG & WANG, 2004) e dal rilascio locale, e conseguente neuromodulazione, dei due neuropeptidi. Infatti i neuroni della VTA, della MeA, dell'area preottica (POA) e dell'ipotalamo scaricano durante l'accoppiamento. Dalla VTA le terminazioni dopaminergiche liberano dopamina nel NAcc e nella PFC che riproietta (connessioni glutammatergiche) al NAcc. Allo stesso tempo gli stimoli sensoriali olfattivi del compagno vengono elaborati dal bulbo olfattivo (OB) e, in un secondo momento, dalla MeA e dal LS, perché ci sia riconoscimento sociale. Le fibre vasopressinergiche che raggiungono il VP ed il LS provengono per lo più dall'amigdala mediale e dal nucleo basale della stria terminale. Invece la maggior parte delle fibre ossitocinergiche presenti nel NAcc derivano dalla POA e dall'ipotalamo.

Perciò alla fine l'accoppiamento risulta dall'attivazione simultanea dei recettori D_2 nel NAcc di entrambi i sessi, di OTR nella PFC e nel NAcc nelle femmine e dei $V_{1a}R$ nel VP nei maschi. Le proprietà rinforzanti dell'accoppiamento si combinano con le tracce odorose del potenziale compagno sessuale e da tale combinazione consegue la preferenza condizionata per il partner. I meccanismi di base nei maschi e nelle femmine sono simili: i due neuropeptidi modulano due nodi diversi dello stesso circuito neurale (YOUNG & WANG, 2004). Infatti la vasopressina agisce nel *Microtus ochrogaster* maschio similmente all'ossitocina nella femmina, suggerendo che i meccanismi che regolano i legami di coppia siano simili, ma sesso-specifici.

I maschi di Arvicola delle praterie hanno densità elevata di $V_{1a}R$ in una regione del proencefalo ventrale, localizzata ventromedialmente al NAcc, mentre i maschi di Arvicola montana presentano pochi recettori in quest'area chiamata banda diagonale. La densità di tali recettori è alta anche lateralmente ad essa, nel VP e nella parte più ventrale del LS e della sostanza innominata (YOUNG *et al.*, 2001). Differenze specie-specifiche nei pattern di distribuzione recettoriale riflettono differenze specie-specifiche nel comportamento sociale dei maschi (CUSHING *et al.*, 2003). Anche qui è valido il principio secondo cui nel cervello la struttura correla con la funzione e cambiamenti morfologici sono associati a variazioni funzionali. Ad esempio, la somministrazione di AVP incrementa nel *Microtus ochrogaster*, ma non nel *Microtus montanus*, l'affiliazione e le interazioni sociali. Questo dimostra che specie diverse di arvicole danno risposte comportamentali diverse all'AVP. Inoltre anche l'aumento sperimentale dell'espressione dei recettori V_{1a} nel VP aumenta l'affiliazione, misurata sulla base di analisi olfattive e del tempo speso dal roditore a rannicchiarsi insieme all'animale di stimolo. Questo approccio sperimentale consente di indurre anche nel *Microtus pennsylvanicus* preferenze per il partner (switch comportamentale). È anche vero che, comunque, il rilascio di ossitocina o vasopressina potrebbe andare a stimo-

lare diversi circuiti neurali nelle specie monogame rispetto a quelle promiscue a seconda di quali siano i circuiti cerebrali che esprimono gli OTR e i $V_{1a}R$ (YOUNG & WANG, 2004). I differenti pattern di distribuzione recettoriale possono essere ricondotti a differenze nella sequenza promotrice del gene in questione (LIM & YOUNG, 2006) con inoltre variazioni individuali.

Il VP è la principale stazione di output della parte esterna del NAcc e, come quest'ultimo, riceve dalla VTA input dopaminergici. Anche il VP fa parte del circuito di reward. È stato riportato da numerosi studi farmacologici che l'assunzione di psicostimolanti determina un aumento considerevole della concentrazione extracellulare di dopamina anche nel VP, ovvero è il rilascio stesso di dopamina a venire intensificato ed il reuptake inibito. Da ciò dipenderebbe l'instaurarsi di una preferenza condizionata per l'ambiente in cui l'assunzione è avvenuta. Analogamente nel *Microtus ochrogaster* l'accoppiamento causa la liberazione di AVP nel VP che attiva i $V_{1a}R$. Questo può condurre allo sviluppo di una preferenza condizionata per la partner e portare così alla creazione del legame di coppia, effetti non possibili per i maschi delle arvicole promiscue che mancano di $V_{1a}R$ nel VP.

La formazione ed il mantenimento di relazioni sociali è un processo complesso e gerarchico che implica diversi livelli di elaborazione delle informazioni nel cervello. Innanzitutto un individuo deve essere motivato ad avvicinarsi ed attrarre un altro individuo. Inoltre l'animale deve essere capace di identificare poi l'altro sulla base di cues sociali (indizi) attraverso la formazione di memorie sociali a lungo termine. Solo così, infine, può formarsi il legame che porta ad un'interazione preferenziale con quel determinato individuo. Ognuno di questi livelli concettuali impegna diverse regioni cerebrali e diversi circuiti neurali e la neuropatologia può colpire ogni livello di questa rete, con il risultato di danneggiare globalmente lo sviluppo di relazioni sociali. Sia l'ossitocina che la vasopressina influenzano la motivazione a cercare contatto e ad avvicinarsi socialmente un altro individuo. La cura dei piccoli da parte della madre o del padre è uno dei modelli di queste due componenti alla base del risultato finale e consiste in alcune operazioni, quali la costruzione del nido, il leccamento e la pulizia dei cuccioli e l'accucciarsi sopra di essi.

I comportamenti materni di allevamento hanno un inizio coincidente con il travaglio ed il parto. Ad esempio le femmine di ratto vergini percepiscono i piccoli come ostili e li evitano. Dopo la nascita dei figli, però, li prendono in considerazione invece di ignorarli e i piccoli possiedono proprietà di rinforzo del comportamento materno. L'ossitocina, rilasciata dal nucleo paraventricolare e dal nucleo sopraottico dell'ipotalamo, si lega ai suoi recettori e favorisce la sensibilità materna che, nei ratti, compare in ritardo se sono state inflitte lesioni del PVN che determinano la perdita del sistema ossitocinergico. Iniezioni intracerebroventricolari di ossitocina innescano il comportamento materno, mentre iniezioni di antagonisti lo inibiscono. Sono gli estrogeni a regolare l'ossitocina e i suoi

recettori: nella gravidanza l'espressione recettoriale aumenta nell'ipotalamo e nell'area preottica mediale, perché i livelli di estrogeni si alzano. L'ossitocina, promuovendo le cure materne, riduce significativamente le tendenze all'infanticidio nei topi, comportamento ritenuto adattativo, in quanto massimizza le risorse della femmina per quando essa avrà la propria prole. Nelle Arvicole delle praterie femmine, sia adulte che giovani, il comportamento materno spontaneo dipende dall'ossitocina. Olazabal e Young, nel 2006, hanno dimostrato che, nelle giovani, esiste una correlazione positiva tra la densità di OTR nel NAcc ed il tempo speso accucciandosi sopra i piccoli. Ovvero, più elevata è tale densità recettoriale, maggiore sarà anche il tempo per cui l'arvicola madre rimarrà accovacciata sopra i cuccioli.

Nelle Arvicole delle praterie i padri possono occuparsi dei piccoli al pari delle madri, leccandoli e pulendoli e stringendosi insieme a loro nel nido. Ciò può essere indotto sperimentalmente con iniezioni di vasopressina nel LS ed inibito da antagonisti dei $V_{1a}R$.

Un approccio e una motivazione sociali intatti includono anche che il piccolo ricerchi la madre, si diriga verso di essa, soprattutto quando ne è separato, e per questo provi angoscia e stress ed emetta vocalizzazioni ultrasoniche di richiamo. Nei topi knockout per l'ossitocina il piccolo si muove alla ricerca della madre dopo molto più tempo. Inoltre è meno stressato e le sue vocalizzazioni sono scarse. Lo stesso vale per i cuccioli knockout per il recettore oppioide μ , nei quali anche la preferenza per l'odore materno è attenuata.

Per quanto riguarda il riconoscimento sociale (secondo livello), i roditori generalmente esplorano gli stimoli nuovi, individui sconosciuti compresi, per un tempo più lungo rispetto a quelli familiari. E, quando un roditore riconosce un individuo, lo esamina per molto meno tempo, anche quando successivamente sarà di nuovo esposto allo stesso animale. Il riconoscimento sociale prevede l'elaborazione di cues sociali e si basa, negli uomini, su informazioni prettamente visive. Nei roditori, invece, è la modalità olfattiva ad essere la più importante. Le cellule del sistema visivo proiettano al giro fusiforme che, se leso, determina prosopagnosia (mancato riconoscimento di volti noti sulla base dei cues visivi) e al solco temporale superiore. Nel sistema olfattivo le proiezioni sono destinate alla corteccia piriforme e all'amigdala, partendo dal bulbo olfattivo. L'amigdala, dall'aspetto di una mandorla, è situata nel lobo temporale e consta dei nuclei basolaterali, corticomediale e centrale. La neocorteccia, il giro ippocampale ed il giro del cingolo proiettano ad essa. Tutti i sistemi sensoriali le trasmettono informazioni, la maggior parte delle quali è inviata ai nuclei basolaterali. L'amigdala è coinvolta negli aspetti emozionali dei processi cognitivi.

Topi transgenici, privi del gene per l'ossitocina e che quindi né la sintetizzano né la rilasciano, falliscono nel riconoscimento di individui familiari. In mancanza di ossitocina le informazioni sociali sono elaborate da altri circuiti neurali

corticali ed ippocampali, ma il riconoscimento sociale non ha luogo. Iniezioni di ossitocina nel bulbo olfattivo di ratto allungano il tempo per cui l'animale ricorda un altro individuo e le sue caratteristiche. La norepinefrina modula questo effetto (DLUZEN *et al.*, 1998).

Anche la vasopressina è necessaria per il riconoscimento sociale nei roditori: il ratto Brattelboro, che si presenta in natura come mutante con una deficienza di vasopressina, non opera il riconoscimento sociale, se non superando la mancanza del neuroormone con iniezioni nel LS. È probabile che non solo i $V_{1a}R$, ma anche i recettori di sottotipo V_{1b} , siano coinvolti nei processi di memoria sociale. Le relazioni sociali si fondano sulla motivazione ad avvicinare un altro individuo e sulla formazione di una memoria. I legami di coppia, selettivi e duraturi, sono facilitati dall'accoppiamento: nell'Arvicola delle praterie l'ossitocina viene rilasciata durante il rapporto sessuale con la funzione di consolidare il legame (LIM & YOUNG, 2006).

4. L'OSSITOCINA E IL COMPORTAMENTO SESSUALE NELL'ARVICOLA DELLE PRATERIE (*Microtus ochrogaster*)

4.1 *Comportamento e successo riproduttivo*

Le femmine di Arvicola delle praterie non sono soggette ad un ciclo estrale spontaneo e necessitano di un'esposizione prolungata (24 ore o più) ad un maschio nuovo per indurlo (KRAMER *et al.*, 2006). Il maschio, attraverso cues tattili e chimici, innesca una cascata endocrina che porta alla formazione del legame ed alla recettività sessuale della femmina. Questo implica che l'interazione sociale ed il legame di coppia, stimolati dall'ossitocina nella femmina, precedono l'attività sessuale. La prima fase del contatto prevede solitamente che i roditori si annusino anogenitalmente ed è seguita dall'elaborazione delle informazioni, così ottenute, da parte del bulbo olfattivo accessorio che è connesso con la MeA ed il nucleo basale della stria terminale (BNST), i quali proiettano alla MPOA e al VMN dell'ipotalamo, dando origine al riconoscimento sociale.

B. Cushing, Levine e N. Cushing (2005), hanno condotto nel 2003 un esperimento utilizzando gruppi di 10-13 piccoli di Arvicola delle praterie femmina, di terza o quarta generazione nate in laboratorio, derivanti da arvicole catturate nell'Illinois. Ad ogni gruppo è stato somministrato, il giorno stesso della nascita, un trattamento consistente in un'iniezione intraperitoneale di 50 μ l di soluzione salina isotonica (SAL) oppure di 3 μ g di ossitocina (OT)/50 μ l di soluzione salina o di 0,3 μ g di un antagonista dell'ossitocina (OTA)/50 μ l di soluzione salina. Un gruppo non ha ricevuto nessuna iniezione, ma è stato solamente manipolato. Gli animali sono stati assegnati casualmente ai gruppi di trattamento. Per esami-

nare gli effetti della manipolazione neonatale di ossitocina sulla riproduzione, quando le femmine hanno raggiunto l'età di 75 giorni, sono state sottoposte ad un test per l'accoppiamento della durata di 72 ore. La lunga durata del test è strettamente collegata con la necessità di un'esposizione prolungata ad un maschio, perché la femmina sessualmente vergine diventi recettiva. Tra l'altro anche l'accoppiamento stesso ha tempi lunghi e, forse proprio per questo, consente la formazione di un legame di coppia duraturo. Ogni femmina è stata posta in una gabbia con un maschio sessualmente esperto, precedentemente esposto ad una femmina di stimolo sessualmente recettiva per verificare che esso fosse in grado di accoppiarsi. Le femmine di stimolo sono ovariectomizzate e ricevono un'iniezione di 10 µg di estradiolo benzoato una volta al giorno per due giorni prima del test, in cui vengono impiegate solo quelle che mostrano lordosi in risposta alla monta del maschio.

Sono stati valutati la comparsa dell'accoppiamento, il tempo di latenza per iniziare l'accoppiamento (inizio specificato dalla prima volta che la femmina risponde con lordosi al tentativo di monta da parte del maschio), numero degli incontri di accoppiamento (cioè lordosi mentre il maschio la monta) e durata totale dell'accoppiamento. Il maschio può montare e penetrare la femmina più volte in un incontro, alla fine del quale esso pulisce i suoi genitali e, prima che ci sia un altro tentativo di monta, passano più di 5 minuti. Finito il test, il maschio e la femmina sono stati separati. Il successo riproduttivo è stato definito come mettere alla luce una nidiata. La separazione dal maschio, dopo l'accoppiamento, influisce negativamente sul successo riproduttivo della femmina, riducendone la probabilità rispetto alle femmine che rimangono insieme al partner. La presenza del maschio può essere, in questo senso, un meccanismo utilizzato dalla femmina, perché la monogamia sia garantita.

I risultati hanno indicato che la manipolazione neonatale di ossitocina non modifica la probabilità di accoppiamento: infatti più del 70% delle femmine di tutti i gruppi di trattamento si sono accoppiate. Differenze significative, evidenziate con un ANOVA a disegno misto, sono state trovate nel tempo di latenza per l'inizio dell'accoppiamento: la latenza è significativamente minore per tutte le arvicole a cui è stata somministrata un'iniezione (di OT, OTA, SAL) rispetto a quelle che sono state solamente manipolate (gruppo di controllo), senza differenze statisticamente significative tra i singoli gruppi sperimentali (le tre iniezioni). La durata dell'accoppiamento non ha risentito di un effetto di trattamento, cosa che invece è avvenuta per la frequenza degli incontri di accoppiamento, calcolati come numero di incontri all'ora. Le femmine iniettate con SAL e quelle di controllo presentano una frequenza significativamente maggiore di incontri (senza differenziarsi significativamente però tra loro, come risulta da confronti post hoc), rispetto alle femmine iniettate con OT ed OTA. L'iniezione di OTA incrementa significativamente la probabilità di generare una cucciolata (succes-

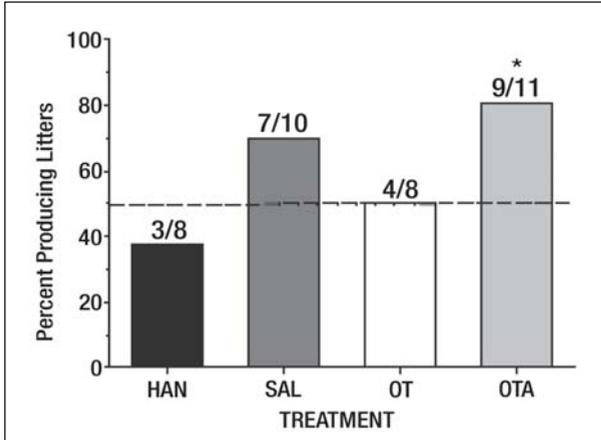


Fig. 4 - Percentuale di femmine di *Microtus ochrogaster* per trattamento che ha generato una nidiata. La femmina in assenza del maschio ha generalmente una probabilità inferiore al 50% di produrre una cucciolata. * = differenza significativa ($p < 0.05$) rispetto al 50% di successo riproduttivo predetto (linea tratteggiata) (CUSHING B. *et al.*, 2005).

so riproduttivo): 9 su 11 ne partoriscono una (Fig. 4). Quindi la somministrazione precoce di OTA riduce significativamente, o addirittura elimina, l'impatto del maschio sulla generazione dei piccoli per più di due mesi dopo il trattamento. L'effetto può consistere in cambiamenti del sistema nervoso centrale che alterano la risposta fisiologica della femmina alla separazione dal maschio. Similmente l'OTA può modificare la sensibilità dell'utero, che contiene OTR, allo stress associato alla separazione, aumentando la probabilità di successo riproduttivo, anche in assenza del partner. Partorire una nidiata può dipendere da entrambi i cambiamenti. Variazioni nel tempo di latenza per l'accoppiamento possono essere dovute ad una riduzione del tempo necessario perché il maschio provochi l'inizio dell'estro nella femmina o a cambiamenti nei fattori motivazionali che portano ad una più precoce propensione all'accoppiamento. Il fatto che tutte e tre le iniezioni riducano la latenza suggerisce che la soluzione salina possa mimare l'effetto di OT e di OTA o che all'iniezione si associ un effetto di stress.

L'esperimento dimostra un effetto organizzativo complesso dell'ossitocina, manipolata neonatalmente, sul sistema nervoso centrale e quindi, poi, sull'espressione del comportamento adulto, con differenze significative a seconda del trattamento e della componente comportamentale indagata. I risultati sorprendono, in quanto ci si aspetterebbero effetti opposti, o almeno diversi, dall'OT e dall'OTA. È possibile che le due sostanze esercitino lo stesso effetto attraverso meccanismi distinti: ad esempio, nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, l'ossitocina regola la produzione di ossitocina stessa e l'OTA può inibire gli effetti dell'ossitocina endogena, aumentandone la produzione come effetto compensatorio.

Su piccoli di Arvicola delle praterie maschi Bales, Abdelnabi, B. Cushing, Ottinger e Carter, nel 2004, hanno testato gli effetti a lungo termine dell'esposizione neonatale all'ossitocina sul comportamento e sul potenziale riproduttivo.

L'ossitocina esercita infatti anche effetti locali, ad esempio sul sistema testicolare/epididimale. I piccoli, assegnati casualmente ad uno dei quattro gruppi di trattamento previsti (10-13 maschi per gruppo), sono stati trattati, entro 24 ore dalla nascita, con le stesse sostanze, dosi e manipolazioni dell'esperimento precedente. I maschi sono stati testati per il comportamento sessuale a 75-90 giorni di vita, facendoli coabitare per 24 ore con una femmina di stimolo in una gabbia. Trascorse le 24 ore, il maschio è stato ricollocato nella sua gabbia e la femmina è stata sottoposta a lavaggio vaginale con acqua distillata. Il prodotto è stato analizzato per vedere se contenesse sperma. Durante i 30 minuti iniziali, sono stati valutati le monte, le penetrazioni e le eiaculazioni. Se non è stato trovato dello sperma nel tratto vaginale della femmina né osservata eiaculazione nei primi 30 minuti, viene verificato se il maschio eiacula nelle successive 23 ore e mezzo di coabitazione con la femmina. Un sottogruppo di maschi per gruppo, di 6-8 mesi di età, è stato anestetizzato con Ketamina o Xylazina e sacrificato. Un campione di sangue è stato prelevato loro dal seno sopraorbitale per analizzare i livelli di androgeni. Testicoli, epididimi, prostata e vescicole seminali sono stati recisi e pesati. È stato raccolto anche un campione di liquido epididimale contenente spermatozoi ed è stata stimata la percentuale di sperma motile.

Per quanto riguarda il comportamento sessuale, il totale dei maschi in ogni gruppo che si accoppia nei primi 30 minuti di test e nelle rimanenti 23 ore e mezzo non differisce significativamente. Tuttavia i maschi trattati con OT che non si sono accoppiati nei primi 30 minuti non hanno mostrato accoppiamento neanche dopo (0 su 4), mentre 4 su 7 dei controlli, 6 su 8 dei trattati con SAL e 7 su 8 dei trattati con OTA si sono accoppiati nelle successive 23 ore e mezzo. Tali differenze sono risultate significative. Il 90% dei controlli ed il 100% degli iniettati con SAL, mentre solo il 50% degli iniettati con OT ed il 50% degli iniettati con OTA, che si sono accoppiati, hanno depositato lo sperma, differenziandosi significativamente. Non ci sono differenze complessivamente significative tra i gruppi nella motilità dello sperma, nel peso dei testicoli, della prostata, degli epididimi e delle vescicole seminali né nei livelli di androgeni. Le concentrazioni spermatiche testicolari ed epididimali, invece, variano a seconda del trattamento: le concentrazioni testicolari del gruppo OTA sono significativamente più alte (analisi effettuate con contrasti pianificati) di quelle dei controlli e, viceversa, il gruppo OTA presenta concentrazioni epididimali significativamente più basse rispetto ai controlli, il che sottolinea come per gli OTA ci sia minore immagazzinamento e maturazione spermatica negli epididimi.

Sebbene non siano state evidenziate grosse differenze tra i trattamenti neonatali con OT ed OTA, emergono differenze più sottili. Ad esempio, il 60% degli iniettati con OT inizia il comportamento sessuale entro 30 minuti, mentre ciò accade per meno del 30% degli OTA. Oltre il 90% degli OTA alla fine si accoppia. Invece gli OT che non si accoppiano entro i primi 30 minuti, non si

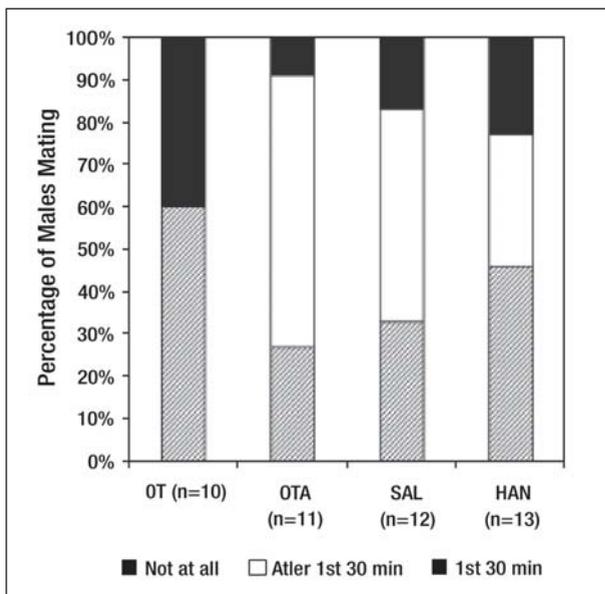


Fig. 5 - Percentuale di maschi di *Microtus ochrogaster* per gruppo che si accoppiano nei primi 30 minuti, nelle successive 23 ore e mezzo di coabitazione o che non si accoppiano proprio (BALES *et al.*, 2004).

accoppiano proprio (Fig. 5). Circa metà degli OT e degli OTA non distribuisce sperma nel tratto vaginale della femmina. I SAL ed i controlli presentano pattern di accoppiamento intermedi rispetto agli altri due gruppi di trattamento: il 30-40% di essi si accoppia entro i primi 30 minuti e circa l'80% presenta accoppiamento per tutta la prova. In pratica, solo il 30% degli OT ed il 45% degli OTA possono fecondare la femmina in confronto al 76% dei SAL e dei controlli.

La manipolazione dell'ossitocina, in termini di aggiunta (OT) o rimozione dell'azione (OTA) durante lo sviluppo neonatale, ha effetti sul comportamento sessuale nei maschi adulti e sulla loro abilità di riprodursi con successo. Il risultato dei trattamenti con OT ed OTA è simile. Proprio per questo i processi evolutivi sottostanti alla deposizione dello sperma possono essere influenzabili in modo non specifico da manipolazioni del sistema ossitocinergico. La riduzione del comportamento sessuale, verificatasi nei maschi trattati neonatalmente con OT, è coerente con i risultati di altri studi nel *Microtus ochrogaster* maschio adulto in cui l'ossitocina inibisce tale comportamento, modulando probabilmente la sazietà sessuale (MAHALATI *et al.*, 1991). Sia l'OT che l'OTA danneggiano alcuni aspetti della riproduzione maschile. Il pattern temporale dell'accoppiamento viene espresso come più invariato dagli OTA che dagli OT, ma gli OTA depongono meno sperma nella femmina rispetto ai controlli.

Anche in questo esperimento è stata impiegata, come generalmente avviene, una dose di OTA inferiore a quella di OT in quanto, nei ratti, l'OTA presenta un'affinità per i recettori dell'ossitocina da 10 a 100 volte maggiore di quella del

ligando endogeno. Probabilmente iniezioni periferiche, come le intraperitoneali, agiscono centralmente. Infatti l'ossitocina ed il suo antagonista attraversano in piccole quantità la barriera ematoencefalica anche negli animali adulti, la cui barriera è completamente sviluppata rispetto ai giovani.

4.2 *Preferenza per il partner*

Le ipotesi che, nei maschi adulti di *Arvicola* delle praterie, l'esposizione neonatale all'ossitocina faciliterebbe la formazione di una preferenza per la partner, e quindi poi di un legame di coppia, e che, invece, essere manipolati precocemente con un antagonista dell'ossitocina determinerebbe un effetto inibitorio opposto, sono state formulate e verificate da Bales e Carter nel 2003. Entro 24 ore dalla nascita i piccoli, assegnati casualmente alle condizioni sperimentali, sono stati trattati con un'unica iniezione di OT (3 µg) o di OTA (0,3 µg) o di una soluzione salina allo 0.9% oppure manipolati senza iniezioni. Una volta adulti, tra i 60 ed i 90 giorni d'età, sono stati singolarmente posti in una gabbia neutra, per un'ora, con una femmina non familiare, scelta a caso. Subito dopo la coabitazione, i maschi sono stati posizionati in uno specifico apparato e testati per la preferenza. L'apparato, di forma simile ad una Y, è costituito da tre gabbie di policarbonato uguali, collegate l'una all'altra attraverso tubi di plexiglas, in cui l'arvicola sperimentale è libera di muoversi. Sono invece blandamente legate in due gabbie distinte le due femmine di stimolo: una è la femmina a cui il maschio è stato precedentemente esposto, che ora gli è familiare; l'altra è una femmina mai incontrata prima, interamente paragonabile alla partner eccetto che per la sua estraneità, è «l'intrusa». Esse, essendo legate, non possono interagire tra loro. Il maschio deve scegliere se trascorrere il tempo del test (3 ore) con la partner, con l'intrusa oppure nella terza gabbia, vuota e neutra, dove inizialmente viene collocato. Le variabili dipendenti considerate sono il tempo speso con la partner, quello speso con l'intrusa ed il contatto sociale complessivo (somma delle altre due variabili dipendenti).

Per quanto riguarda il contatto sociale, l'ANOVA ha evidenziato che tutti i gruppi differiscono significativamente da quello SAL che presenta contatto sociale complessivamente ridotto, non differenziandosi però i gruppi significativamente tra loro. Il contatto con la partner ha mostrato effetti significativi di trattamento. Infatti solo gli OT mostrano una preferenza statisticamente significativa per la partner dopo l'ora di coabitazione (Fig. 6), a differenza di studi condotti precedentemente con metodi analoghi, nei quali, dopo una o sei ore di coabitazione, non è stata riscontrata nessuna preferenza significativa (DE VRIES & CARTER, 1999). Invece i controlli mostrano solo una tendenza a preferire la partner e gli OTA e i SAL scelgono la partner o l'intrusa quasi con la stessa frequenza. L'esperimento dimostra che la manipolazione di ossitocina nelle fasi precoci del-

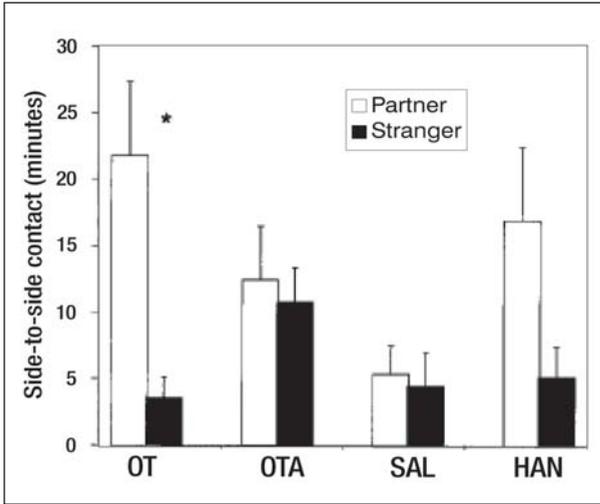


Fig. 6 - Preferenze per la partner in funzione del trattamento neonatale in maschi adulti di *Arvicola delle praterie*. * = differenza significativa ($p < 0.05$) entro i gruppi tra tempo passato con la partner e con l'intrusa (minuti + SEM) (BALES & CARTER, 2003).

la vita ha effetti comportamentali a lungo termine. Sebbene gli OT e gli OTA siano stati più propensi dei SAL al contatto sociale, solo gli OT mostrano una preferenza selettiva significativa per la partner.

4.3 Cure parentali

Le cure parentali non sono un comportamento sessuale vero e proprio. Tuttavia esse influiscono sulla fitness della coppia, essendo praticate con la finalità di promuovere la sopravvivenza ed il successo riproduttivo dei piccoli stessi. Per questo ho deciso di non trattarle separatamente dalle altre componenti del comportamento sessuale.

Le cure parentali includono protezione, nutrizione ed allevamento dei piccoli e assumono una forma esclusiva nei mammiferi, in cui la femmina produce il latte per i cuccioli. Il comportamento materno è vitale ed indispensabile, mentre quello paterno, molto più raro, è meno determinante. Quanto un maschio investe nelle cure parentali è strettamente associato al sistema di appaiamento della specie: infatti nelle specie monogame non solo la femmina, ma anche il maschio si dedica alla cura dei figli; in quelle promiscue, invece, l'investimento paterno non c'è oppure è minimo. L'investimento parentale può essere diretto o indiretto. Nel primo caso è previsto il contatto con i piccoli: il genitore si accuccia con loro, li ripulisce, recupera e trasporta in giro. Nel secondo l'adulto si concentra sull'acquisizione, sul mantenimento e sulla difesa delle risorse, sulla costruzione e protezione del rifugio e sulla difesa dai predatori. Inoltre un genitore può aumentare il suo diretto investimento o facilitare indirettamente quello del suo compagno. Ad esempio, mentre la femmina nutre i piccoli, il maschio può occuparsi

di essa, portarle del cibo e proteggerla (LIBHABER & EILAM, 2002). I piccoli di molti mammiferi, quando nascono, sono senza pelo e ciechi e dipendono per la crescita e la sopravvivenza dai genitori, i quali forniscono loro cure intense e prolungate. Il più delle volte è la madre a prestare tutta la cura necessaria, ma in alcuni casi contribuiscono all'allevamento anche il padre ed i fratelli di nidiate precedenti, ormai adulti, quando non manifestano comportamenti di indifferenza, evitamento o infanticidio verso i più giovani, e conspecifici anche non consanguinei (cure alloparentali). Nell'Arvicola delle praterie il maschio e la femmina di una coppia riproduttiva esibiscono cure parentali identiche, ad eccezione dell'allattamento. Entrambi mostrano cifosi, ovvero una caratteristica postura di rannicchiamento/allattamento, con un'inarcatura della spina dorsale opposta a quella della lordosi. I maschi e le femmine ricevono comunque input somatosensoriali diversi dai piccoli (ad esempio, il succhiare per le femmine e la vicinanza dei piccoli, senza il succhiare, per i maschi, i quali possono ricevere anche stimoli chimici dalle femmine stesse, affinché il comportamento paterno venga mantenuto.). Durante la gestazione ed il parto avvengono fluttuazioni ormonali (LONSTEIN & DE VRIES, 2000) che modificano il comportamento delle femmine: esse da infanticide all'inizio della gravidanza, diventano materne nelle ultime fasi. Per agire parentalmente, infatti, l'infanticidio deve essere soppresso appena l'animale diventa genitore. Questo vale anche per i maschi, pur non andando incontro al parto, a nuova ovulazione dopo il parto, all'allattamento ed alle fluttuazioni ormonali tipiche delle femmine (WYNNE-EDWARDS & TIMONIN, 2007).

L'ossitocina viene rilasciata durante il comportamento sessuale, il parto e l'allattamento e si associa all'inizio del comportamento materno, ai legami di coppia e ad altri comportamenti sociali positivi. Essa regola anche la reattività emozionale, l'ansia e le risposte a nuovi stimoli, componenti che possono avere effetti sulle reazioni ai piccoli. Bales, Pfeifer e Carter (2004) hanno esaminato eventuali effetti a lungo termine della manipolazione neonatale di ossitocina e di un suo antagonista sul comportamento parentale. Nell'esperimento, piccoli maschi e femmine di Arvicola delle praterie di un giorno di vita hanno ricevuto, con assegnazione casuale, un'iniezione di 3 µg di OT o di 0,3 µg di OTA o sono stati inclusi in uno dei due gruppi di controllo (iniezione di SAL o manipolazione senza iniezione). L'antagonista utilizzato agisce bloccando i recettori per l'ossitocina, ma anche un certo grado di recettori per la vasopressina. Perciò si è rivelato utile, considerando che, pur essendo sia i maschi che le femmine di Arvicola delle praterie parentali, i meccanismi fisiologici sottostanti tale comportamento differiscono a seconda del sesso. Le femmine infatti sono più sensibili all'ossitocina ed i maschi alla vasopressina.

La risposta ai piccoli è stata testata due volte, a 21 e a 60 giorni di età. Le Arvicole delle praterie vivono, in natura, in comunità e sono esposte alla nascita di nuove nidiate dei loro stessi genitori a 21 giorni di età. A circa 60 giorni di vita

i piccoli più vecchi, ormai adulti, possono dare alla luce proprie cucciolate, ma anche rimanere nel nido natale e contribuire all'accudimento dei nuovi nati, se non si sono accoppiati. È stata condotta anche un'analisi emozionale degli animali a 67 giorni di età, utilizzando un labirinto costituito da quattro bracci, due aperti e due chiusi. Ogni arvicola è stata posta al centro del labirinto (zona neutra) ed il comportamento è stato registrato per 5 minuti. La permanenza nei bracci chiusi per un tempo più lungo rispetto alla permanenza nei bracci aperti viene considerata indice di ansia elevata. Sono stati valutati l'attività totale (numero delle entrate in ogni braccio) ed il tempo speso nei bracci aperti diviso il tempo totale speso nei bracci aperti e chiusi.

Gli autori hanno ipotizzato che l'esposizione neonatale all'ossitocina avrebbe aumentato le cure per i piccoli e, allo stesso tempo, il comportamento esplorativo nel labirinto e che l'OTA avrebbe dato effetti opposti, inibendo i meccanismi cellulari su cui l'OT, in parte l'AVP o entrambe agiscono. I piccoli sono sempre stati rimossi dalla gabbia che li conteneva con i genitori prima della nascita di una nuova nidata, per evitare effetti di esposizione precoce ai nuovi nati che potessero condizionare i risultati del test.

Per il test del comportamento parentale gli animali sono stati collocati in un'arena vuota formata da due piccole gabbie comunicanti attraverso un tubo corto e trasparente. È stato concesso agli animali di adattarsi per 45 minuti al nuovo ambiente, dal quale poi sono stati prelevati. A questo punto sono stati introdotti nell'arena due piccoli di 1-3 giorni d'età non imparentati con i soggetti. L'adulto è stato poi nuovamente inserito nell'arena ed il suo comportamento registrato per 10 minuti. I soggetti sono stati valutati come parentali se recuperavano i piccoli e si accucciavano su di essi senza successivo attacco.

I due gruppi di controllo non hanno mostrato differenze significative tra loro per nessuna delle variabili e perciò sono stati accorpati in unico gruppo. Nel gruppo di controllo, al ventunesimo giorno di età, non ci sono state differenze di genere significative né nel comportamento parentale né nel comportamento aggressivo: le femmine ed i maschi di controllo rispondevano parentalmente ai piccoli. Al sessantesimo giorno di età, invece, i maschi di controllo erano più parentali delle femmine, le quali attaccavano di più rispetto ai maschi, con differenze statisticamente significative. Per quanto riguarda il comportamento esplorativo, le femmine di controllo erano significativamente più ansiose e trascorrevano meno tempo nei bracci aperti rispetto ai maschi che passavano lo stesso tempo nei bracci aperti e chiusi. Ci sono quindi effetti sessualmente dimorfici e di età nel gruppo di controllo. A 21 giorni di età, i maschi trattati con OTA erano meno parentali dei maschi di controllo, con differenza significativa, e tendevano ad essere meno parentali dei maschi OT. I maschi OTA hanno inoltre attaccato i piccoli significativamente di più rispetto agli OT (nessun attacco) e ai controlli. Le femmine non hanno espresso differenze significative di trattamento per le

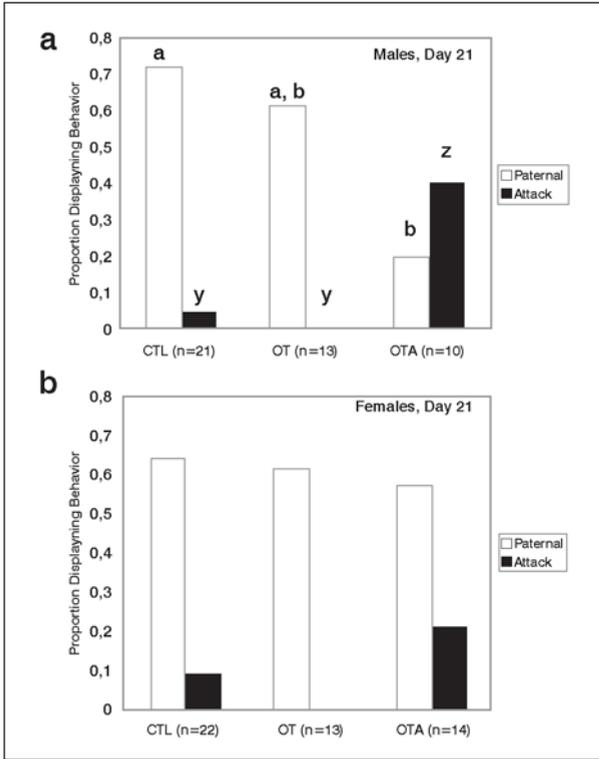


Fig. 7 - Comportamento parentale ed aggressivo in maschi e femmine di *Microtus ochrogaster* a 21 giorni d'età in funzione del trattamento. Differenti lettere indicano differenze significative tra gruppi per $p < 0.05$. (BALES *et al.*, 2004).

cure parentali e l'aggressività a 21 giorni di età, età in cui le femmine OT agivano solo parentalmente (Fig. 7). A 60 giorni di età le differenze tra i gruppi di trattamento non sono risultate significative né per i maschi né per le femmine. L'effetto di trattamento neonatale sul comportamento esplorativo non è stato significativo né per i maschi né per le femmine. La manipolazione neonatale di ossitocina ha effetti sessualmente dimorfici significativi sul comportamento parentale. Si nota ad esempio che i maschi OTA di 21 giorni di età attaccano significativamente di più i piccoli e sono significativamente meno parentali dei controlli. Il comportamento delle femmine cambia con l'età: a 60 giorni di vita le risposte parentali si riducono e aumenta la tendenza all'attacco in tutti i gruppi di trattamento. Questo è tipico delle femmine sessualmente vergini come quelle utilizzate in questo studio. Esse esplorano anche meno il labirinto. I maschi invece rimangono più alloparentali ed esplorativi. È anche vero che l'esposizione ai piccoli a 60 giorni di età è una seconda esposizione e che esposizioni ripetute possono influenzare il comportamento. L'ansia e la paura provate nei confronti di stimoli nuovi, piccoli inclusi, può influenzare la regolazione del comportamento parentale, soprattutto nelle femmine che esitano a rimanere nei bracci aperti del labi-

rinto. Gli steroidi sessuali ed i neuropeptidi regolano l'ansia ed il comportamento parentale in modo sessualmente dimorfico, con meccanismi d'azione diversi e a diversi stadi del ciclo di vita. Nel *Microtus ochrogaster* maschio, in fase puberale, i livelli di androgeni si alzano e stimolano il rilascio di AVP, la quale favorisce il comportamento parentale nelle arvicole (WANG *et al.*, 2000). Iniezioni di OT aumentano invece il comportamento parentale nelle femmine. Ci sono comunque anche interazioni neuropeptidergiche, dato che sia l'OT che l'AVP possono legarsi ai recettori dell'uno e dell'altro.

Il test del labirinto complesso è stato effettuato dopo i due test per le cure parentali e non ha evidenziato effetti di trattamento neonatale, pur avendo rilevato risposte sessualmente dimorfiche. È comunque possibile che l'esperienza acquisita nel tempo intercorso prima di svolgere quest'ultima prova, così come cambiamenti maturativi, abbiano mascherato gli effetti di manipolazioni ossitocinergiche neonatali sul comportamento adulto nel labirinto e quindi riducano l'utilità del test stesso come indice di paura ed ansietà.

5. LA VASOPRESSINA E IL COMPORTAMENTO SESSUALE NELL'ARVICOLA DELLE PRATERIE (*Microtus ochrogaster*)

5.1 Legami di coppia

Il legame di coppia si basa su processi sensoriali, memoria, motivazione ed altre sottili componenti comportamentali e viene definito come la relazione sociale stabile che si crea in una coppia riproduttiva di animali che condividono un territorio e i compiti genitoriali (WANG & ARAGONA, 2004). Esso rappresenta una forma di attaccamento sociale, è comune nelle specie monogame e presuppone lo sviluppo di una preferenza per il partner rispetto ad un individuo estraneo, quantificabile con il test dell'apparato a tre camere. È stato dimostrato che 18-24 ore di accoppiamento sono necessarie per la formazione di una preferenza nei maschi di Arvicola delle praterie. Questa preferenza è il cambiamento comportamentale indice del legame di coppia, per cui il maschio e la femmina rimangono insieme finché uno dei due non muore e, prima di accoppiarsi, manifestano l'uno verso l'altro un comportamento affiliativo non ancora selettivo. L'aggressività contro conspecifici estranei aumenta, così, nei maschi per difendere la compagna ed il territorio. Nelle femmine, invece, è sufficiente una lunga coabitazione anche senza accoppiamento per indurre il legame (INSEL *et al.*, 1995). Comunque, una volta che il legame è stato creato, esso è duraturo e permane per almeno una settimana anche se non c'è un'esposizione continua al partner.

Liu, Curtis e Wang nel 2001 hanno verificato l'ipotesi che, nei maschi di Arvicola delle praterie, il rilascio di vasopressina all'interno del setto laterale

durante l'accoppiamento regoli la formazione del legame di coppia, definito in base alla presenza di un'evidente preferenza per la partner. Nello studio sono stati utilizzati maschi e femmine di Arvicola delle praterie sessualmente vergini di 70-90 giorni di età: gli uni in qualità di soggetti sperimentali, le altre come animali di stimolo. I maschi sono stati anestetizzati con pentobarbitale sodico ed è stata impiantata loro bilateralmente nel LS o nella corteccia cingolata (CC) una cannula di acciaio inossidabile. Dopo una settimana di recupero, ad ogni gruppo, a seconda del trattamento, è stata somministrata nel LS bilateralmente, attraverso la cannula, un'iniezione di liquido cerebrospinale (CSF) artificiale (200 nl per lato) o di CSF contenente diverse concentrazioni di un antagonista dei $V_{1a}R$ (AVPA) pari a 0,005 ng, 0,05 ng, 0,5 ng, 5 ng, 50 ng.

Per testare se la somministrazione di un AVPA, che blocca i $V_{1a}R$, nel LS inibisce la preferenza indotta dall'accoppiamento, e quindi il legame di coppia stesso, i maschi, subito dopo l'iniezione, sono stati esposti ad una femmina sessualmente recettiva per 24 ore di accoppiamento. terminate le 24 ore, sono stati sottoposti al test per la preferenza, utilizzando apparato, modalità e tempi identici a quelli descritti per gli esperimenti passati in rassegna precedentemente. La frequenza e la durata dei contatti fisici con la partner (femmina con cui è avvenuto l'accoppiamento) e l'estranea (un'altra femmina, mai incontrata prima) sono state calcolate insieme a tempo speso e frequenza di entrata in ogni gabbia.

Di solito i maschi di *Microtus ochrogaster* che si accoppiano montano la femmina entro 3 ore e continuano a montarla ogni 40-60 minuti per tutte le restanti ore (INSEL *et al.*, 1995). I maschi che nelle 24 ore di coabitazione non si sono accoppiati sono stati esclusi dal test. Per vedere inoltre se il blocco dei $V_{1a}R$, anche nella CC, inibisce la preferenza indotta dall'accoppiamento o se, invece, l'effetto inibitorio sia specifico per il LS, alcuni altri maschi, ai quali la cannula era stata inserita bilateralmente nella CC, hanno ricevuto un'iniezione di CSF (200 nl per lato) o di CSF contenente 0,05 ng di AVPA che è la dose sufficiente per bloccare la preferenza nel LS. Sono stati eseguiti anche con essi la coabitazione ed il test. Nell'Arvicola delle praterie la CC è coinvolta nei processi di apprendimento e di memoria e contiene AVPR.

I risultati sono stati i seguenti. I maschi iniettati con CSF (gruppo di controllo) nel LS hanno trascorso, dopo 24 ore di accoppiamento, significativamente più tempo con la partner che con l'estranea, effetto che dimostra la presenza di una preferenza. Un effetto simile è stato ottenuto anche nei maschi iniettati nel LS con 0,005 ng (bassa dose) o 5 ng (alta dose) dell'AVPA. Invece chi ha ricevuto iniezioni di 0,05 ng o 0,5 ng di AVPA ha presentato inibizione della formazione della preferenza stimolata dall'accoppiamento. Questi maschi infatti hanno trascorso all'incirca lo stesso tempo con la partner e l'estranea. Non ci sono state differenze significative tra i gruppi nel tempo speso né per la frequenza di entrata in ogni gabbia né l'AVPA ha influito significativamente sulla frequenza di

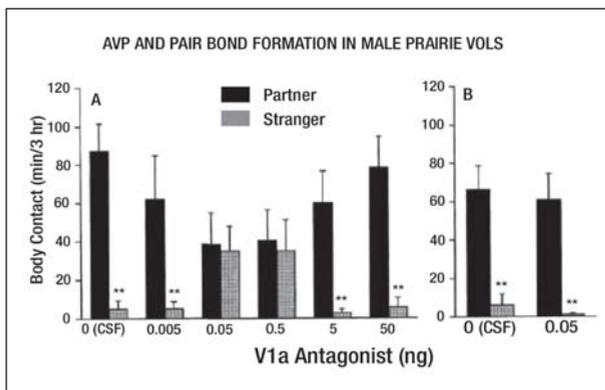


Fig. 8 - Effetti dell'AVPA sulla preferenza per la partner in maschi di *Microtus ochrogaster*. A: nel setto laterale. B: nella corteccia cingolata. ** = differenza significativa ($p < 0.01$) entro i gruppi tra tempo speso con la partner e tempo speso con l'estranea. Barre d'errore = SEM (Liu *et al.*, 2001).

accoppiamento o sulla durata del contatto sociale con la femmina nelle prime 6 ore di coabitazione. I soggetti di controllo (CSF), ma anche quelli sottoposti ad iniezione di 0,05 ng di AVPA nella CC, hanno entrambi dimostrato una preferenza significativa per la partner dopo le 24 ore di accoppiamento (Fig. 8).

Per testare se la somministrazione di AVP nel LS produca la preferenza anche in assenza di accoppiamento, alcuni altri maschi hanno ricevuto iniezioni di 200 nl per lato di CSF o di 0,5 ng, 5 ng, 50 ng di AVP nel LS e poi sono stati esposti per 6 ore ad una femmina sessualmente non recettiva, con la quale quindi non si sono potuti accoppiare. In questo caso il test per la preferenza ha portato alla luce la non formazione di una preferenza significativa per la partner nei maschi trattati con AVP, pur presentando essi una tendenza a passare meno tempo con l'estranea e più tempo con la partner. Tuttavia l'assenza di un effetto di trattamento può essere dipeso da una rapida eliminazione dell'AVP. Infatti ripetendo l'esperimento con infusione continua di CSF o di AVP (0,08 ng/1µl di CSF o 0,8 ng/1µl di CSF), dopo le 6 ore di coabitazione è stata trovata una preferenza significativa nei maschi infusi continuamente con 0,8 ng di AVP (alta concentrazione). Per gli altri due gruppi non c'è stata comunque una preferenza significativa.

Il LS, nel *Microtus ochrogaster*, non contiene recettori solo per l'AVP, ma anche OTR. Per questo è stato testato se anche il blocco degli OTR in esso inibisca la preferenza indotta dall'accoppiamento, similmente al blocco dei V_{1a}R setali. Alcuni maschi, a questo proposito, hanno ricevuto un'iniezione bilaterale di CSF o di CSF contenente 0,05 ng o 0,5 ng di un OTA attraverso la cannula impiantata nel LS. Dopo 24 ore di accoppiamento è stata valutata la preferenza. I controlli (CSF) hanno mostrato una preferenza significativa. Invece nei maschi che hanno ricevuto iniezioni di OTA, qualsiasi fosse la dose, la formazione della preferenza per la partner non si è verificata.

È stato infine testato l'effetto di AVPA e di OTA sull'AVP somministrata sperimentalmente nel LS. I ricercatori si sono chiesti se entrambi gli antagonisti

impedissero la formazione della preferenza stimolata dall'AVP esogena. In questo caso i maschi hanno ricevuto un'infusione continua, per tutte le 6 ore di coabitazione senza accoppiamento, di 0,8 ng di AVP/1 µl di CSF nel gruppo di controllo o infusione continua di AVP insieme alla stessa dose di AVPA o di AVP con uguale concentrazione di OTA (gruppi sperimentali). Al test per la preferenza i controlli hanno risposto con una preferenza significativa, coerentemente con i risultati del secondo esperimento. Invece la preferenza è stata inibita, come previsto, quando l'AVP viene somministrata in concomitanza sia con l'AVPA che con l'OTA.

I risultati confermano il ruolo della vasopressina nella regolazione dei legami di coppia nei maschi di Arvicola delle praterie indicato da studi precedenti (CHO *et al.*, 1999). Il LS è un'area cerebrale implicata nella regolazione dei legami di coppia nei maschi di *Microtus ochrogaster* e la vasopressina agisce su quest'area. I risultati suggeriscono anche che nel LS di questi animali avvenga, per la formazione del legame e quindi, prima ancora, della preferenza, l'attivazione contemporanea sia degli AVPR che degli OTR, sui quali l'AVP agisce. Così, nel LS, l'AVP è fondamentale, ma l'attivazione simultanea dei recettori per l'AVP e per l'OT è altrettanto indispensabile.

5.2 Monogamia

I sistemi di appaiamento possono essere classificati sulla base del numero dei partner per individuo con cui avviene la copulazione nella stagione riproduttiva, ma anche considerando se il maschio e la femmina formino un legame di coppia (e quanto eventualmente esso duri) e siano cooperativi nella riproduzione e nel conseguente allevamento dei piccoli. In generale, i maschi investono molto nell'accoppiamento e, prima, nel corteggiamento, le femmine invece nella cura della prole. L'abilità dei maschi di monopolizzare le femmine e quella delle femmine di scegliere tra i pretendenti il o i partner, e quindi la strategia di accoppiamento stessa, dipendono comunque anche da fattori ecologici, quali la distribuzione e la qualità delle risorse, la pressione predatoria e la disponibilità di compagni recettivi. Ad esempio, se le femmine recettive sono scarse o distribuite su vasti territori, i maschi non riescono a monopolizzarne più di una in una stagione riproduttiva e quindi può essere per loro vantaggioso rimanere con un'unica femmina, adottando una strategia monogamica, piuttosto che continuare a cercarne altre. Oppure, nel caso in cui le femmine di una popolazione siano recettive in modo sincronizzato, le possibilità di accoppiamento sequenziale del maschio con altre sono notevolmente ridotte, il che può portare ad una monogamia «forzata». Non è sempre facile osservare, in natura, gli animali che copulano, soprattutto quando si tratta di animali attivi di notte o che si accoppiano in luoghi nascosti come tane sotterranee. In questi casi la strategia di accoppiamento

adottata viene dedotta da altri comportamenti maschili e femminili: coabitazione nel nido, sovrapposizione del territorio, cure parentali e il non perdere mai di vista il compagno (GOODENOUGH *et al.*, 1993).

Nella monogamia l'individuo (maschio o femmina) si accoppia solamente con un partner. La poliginia avviene quando un individuo maschio si accoppia con più femmine, mentre la poliandria prevede che una femmina si accoppi con più maschi. La promiscuità può essere poliginica o poliandrica e può essere detta anche poligamia, dato che consiste in molte unioni contrapponendosi, perciò, alla monogamia in cui la relazione di accoppiamento è esclusiva tra i partner, i quali rimangono legati l'uno all'altro per lungo tempo. Nella promiscuità avvengono, invece, accoppiamenti multipli, anche tra individui dello stesso sesso, e le unioni tra partner non sono durature.

Sono state dimostrate considerevoli differenze specie-specifiche nei pattern di distribuzione dei $V_{1a}R$ nel cervello tra le Arvicole delle praterie, monogame, e le Arvicole montane, promiscue. Inoltre la somministrazione centrale di AVP nel *Microtus montanus* non ha implicazioni sul comportamento sociale, a differenza di ciò che accade nel *Microtus ochrogaster*. La formazione del legame di coppia risulta così essere modulata anche dalla specifica distribuzione dei $V_{1a}R$ in certe aree cerebrali e non solo dalla vasopressina stessa, il cui rilascio durante la coabitazione e l'accoppiamento, tra l'altro, attiva nelle specie monogame di arvicole circuiti neurali diversi da quelli che vengono attivati nelle promiscue. Questo è stato concluso da Lim, Hammock e Young, nel 2004, identificando le regioni cerebrali che si attivano durante l'accoppiamento e la formazione dei legami di coppia nell'Arvicola delle praterie, utilizzando come marcatore dell'attività neuronale l'oncoproteina Fos. L'attivazione neuronale è risultata significativa in regioni limbiche, quali VP, NAcc, BNST, MPOA, MeA e MdThal, aree che esprimono tutte, a parte il NAcc, i recettori $V_{1a}R$, agendo sui quali l'AVP può dare luogo ai legami di coppia. Il VP del *Microtus ochrogaster* maschio esprime molti $V_{1a}R$, il VP del *Microtus montanus*, invece, ne esprime pochi. Il VP contiene anche fibre vasopressinergiche che rilasciano direttamente in esso l'AVP, attivando i $V_{1a}R$.

Anche tra le monogame Arvicole delle pinete e le promiscue Arvicole della Pennsylvania esistono differenze specie-specifiche analoghe nel pattern di distribuzione dei $V_{1a}R$ nel VP. Il blocco farmacologico dei $V_{1a}R$ nel VP di maschi di Arvicola delle praterie, indotto da iniezioni bilaterali sito-specifiche di un antagonista recettoriale (0,05 ng per lato), inibisce la formazione del legame, sottolineando la necessità dell'attivazione di questi recettori per esso. L'iniezione intracerebroventricolare della stessa dose di antagonista si è rivelata inefficace ad inibire il legame, così come l'iniezione di CSF artificiale (gruppo di controllo). L'inefficacia di iniezioni intracerebroventricolari dell'antagonista si contrappone, similmente, all'efficacia di iniezioni sito-specifiche nella MeA e nel MdThal. Esi-

stono differenze specie-specifiche tra arvicole monogame e promiscue anche nella densità degli OTR nel NAcc. Le Arvicole delle praterie esprimono più OTR nel NAcc rispetto alle Arvicole montane. Analogamente a ciò che succede con il blocco dei $V_{1a}R$ nel VP, il blocco degli OTR, con iniezione sito-specifica nel NAcc di un antagonista, inibisce la preferenza nelle femmine di *Microtus ochrogaster*, mentre l'iniezione intracerebroventricolare di OT facilita in esse la preferenza. Il VP fa parte del circuito dopaminergico di reward ed è strettamente connesso con il NAcc, il quale appartiene allo stesso circuito. Gli OTR nel NAcc ed i $V_{1a}R$ nel VP sono anatomicamente vicini tra loro (LIM *et al.*, 2004). Benché i sistemi ossitocinergico e vasopressinergico appaiano sessualmente dimorfici, influenzando maggiormente l'OT le femmine e l'AVP i maschi, è possibile che essi convergano su un comune circuito a livello del proencefalo ventrale, incrociandosi tra il NAcc ed il VP per produrre uno stesso risultato: il legame di coppia (LIM *et al.*, 2004).

5.3 Cure parentali: il caso del *Microtus pennsylvanicus* facoltativamente paterno

Molti studi hanno riportato che le monogame Arvicole delle praterie e le promiscue Arvicole montane presentano differenze notevoli nei sistemi ossitocinergico e vasopressinergico e, più precisamente, nei pattern di distribuzione recettoriale dei due neuropeptidi nella cosiddetta «amigdala estesa» (INSEL *et al.*, 1994). Essa è un circuito neurale composto dal nucleo olfattivo accessorio (AON), l'amigdala stessa, BNST, LS e MPOA ed è coinvolta, nei roditori, nei comportamenti affiliativi, copulatori e parentali. È possibile, come ipotizzato da vari ricercatori, che differenze specie-specifiche nei pattern di distribuzione recettoriale nell'amigdala estesa possano determinare differenze altrettanto specie-specifiche nel comportamento parentale. Il circuito in questione presenta infatti recettori per l'AVP, con densità maggiore nel maschio di *Microtus ochrogaster* rispetto al maschio di *Microtus montanus* e di *Microtus pennsylvanicus*. Nei primi, infatti, il comportamento paterno si associa ad un aumento nella sintesi e nel rilascio di AVP e dipende quindi dall'attivazione dei recettori per l'AVP. Tuttavia anche roditori tipicamente non parentali, come il *Microtus pennsylvanicus*, possono investire nella cura dei piccoli manifestando, all'occorrenza, di essere facoltativamente parentali. Lo scopo di tale cambiamento comportamentale sarebbe di controbilanciare i costi per la fitness associati a variazioni sociali o stagionali imprevedibili, tra le quali spiccano il diminuito accesso ai potenziali compagni e la compromissione della sopravvivenza della prole a causa di risorse irregolarmente disponibili e di elevati rischi di predazione.

Solitamente, tra le promiscue, sono le Arvicole montane a comportarsi maternamente, anche se solo per breve tempo. Dopo due settimane al massimo i cuccioli si trovano a doversela cavare da soli. Recentemente è stato osservato in

laboratorio che anche i maschi di Arvicola della Pennsylvania esibiscono comportamento parentale e sociale apprezzabili, soprattutto in inverno, quando i giorni sono più corti. In queste condizioni, essi condividono il nido con la compagna invece di vivere separati, rifiutano e scanzano dalla tana i maschi intrusi e si occupano dei piccoli anche quando si accoppiano con una nuova femmina.

Parker, Kinney, Phillips e Lee, nel 2001, hanno esaminato se i pattern recettoriali regionali di AVP fossero gli stessi in maschi di Arvicola della Pennsylvania e, precisamente, in un gruppo di maschi inesperti e paterni, in un altro gruppo di esperti e paterni, in un altro di inesperti ed aggressivi e infine in un gruppo di inesperti ed insensibili ai piccoli. In un secondo esperimento sono stati analizzati i pattern recettoriali di OT in maschi inesperti ed insensibili ed in maschi esperti e paterni. I maschi inesperti sono stati testati per il comportamento paterno a 11-13 settimane di età, esponendoli ad un piccolo sconosciuto. Gli esperti, invece, sono stati testati ad 11 settimane di vita con un loro piccolo, dopo che vi erano stati esposti per 72 ore dopo la nascita e dopo essersi accoppiati con una femmina e aver coabitato con essa per tutta la gestazione ed il parto della nidiatea. I maschi sono stati singolarmente collocati in una gabbia e sono stati lasciati loro 5 minuti per abituarsi al nuovo ambiente, dopo i quali un piccolo di 2-5 giorni di età è stato introdotto all'angolo della gabbia opposto rispetto a dove si trovava il maschio, il cui comportamento è stato registrato per 10 minuti. I comportamenti manifestati sono stati classificati come: parentale (pulizia, recupero del piccolo e accucciamento su di esso), insensibile (breve investigazione olfattiva del cucciolo o nessun contatto fisico né interazione di alcun genere con esso) ed aggressivo (manipolazioni violente o attacco del piccolo, seguiti da vocalizzazioni e/o ferite del cucciolo). Dopo i test comportamentali, i soggetti, anestetizzati con alotano, sono stati uccisi per eseguire l'autoradiografia recettoriale.

È stata condotta un'analisi statistica, con *t* test indipendenti, per vedere se i due tipi di maschi paterni (inesperti ed esperti) ed i due tipi di maschi non paterni (aggressivi ed insensibili) differivano significativamente l'uno dall'altro. Visto che non sono state rilevate differenze significative nei pattern di distribuzione recettoriale per l'AVP in entrambi i gruppi, i gruppi sono stati uniti per semplificare la successiva analisi statistica. La densità recettoriale per AVP è significativamente maggiore nell'AON e significativamente minore nel LS e nel setto mediale e centrale nei maschi paterni rispetto ai non paterni (Fig. 9). Non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi nella banda diagonale, nel BNST, nella MeA e nell'amigdala centrale (CeA). Per quanto riguarda gli OTR, i maschi esperti e paterni mostrano densità recettoriale significativamente più elevata rispetto ai maschi inesperti ed insensibili nell'AON, nel LS, nel BNST e nella amigdala laterale (LatA). La densità degli OTR risulta elevata anche nella CeA dei maschi esperti, anche se non statisticamente significativa.

In questo esperimento il comportamento paterno è caratterizzato da bassa

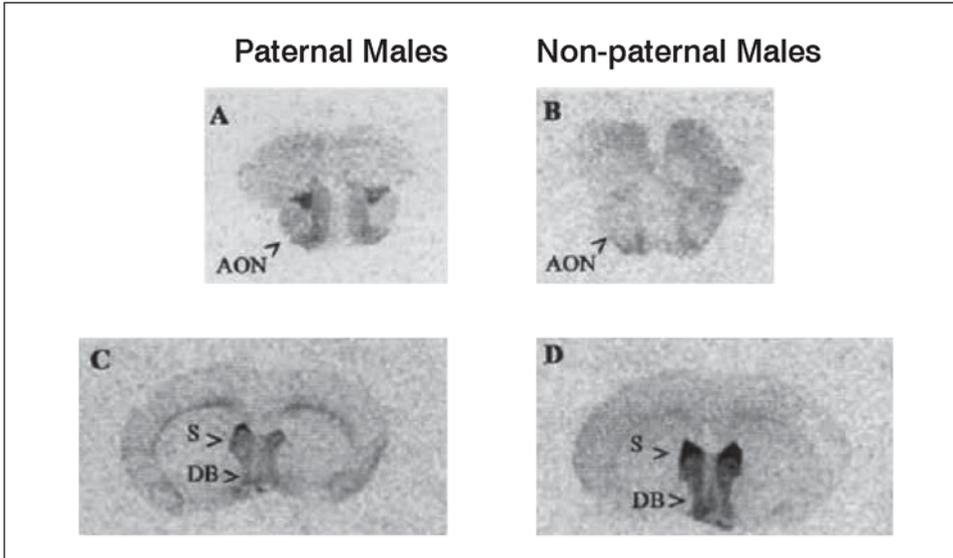


Fig. 9 - Fotomicrografie della densità recettoriale per AVP in strutture dell'amigdala estesa in maschi paterni (A e C) e non (B e D) di *Microtus pennsylvanicus*. AON = nucleo olfattivo accessorio, S = setto laterale anteriore, DB = banda diagonale (PARKER *et al.*, 2001).

densità recettoriale per AVP nel LS nei maschi di Arvicola della Pennsylvania paterni rispetto ai non paterni. Tale risultato concorda con studi precedenti in cui le paterne Arvicole delle praterie presentavano una simile densità recettoriale nel LS in confronto ad Arvicole montane non paterne e questo era valido per i maschi sessualmente e parentalmente inesperti ed esperti (WANG *et al.*, 2000). La vasopressina nel LS media inoltre l'acquisizione e l'immagazzinamento di informazioni che innescano comportamenti di paura ed ansia. Infatti l'AVP correla positivamente con l'aggressività: livelli più alti di AVP si associano ad un aumento del comportamento aggressivo. È per questo probabile che la bassa densità recettoriale per AVP nel LS dei maschi paterni rifletta una minore abilità dell'AVP di determinare comportamenti aggressivi e paurosi, anche nei confronti dei neonati. Al contrario, un'alta densità di AVPR in quest'area potrebbe inibire il comportamento paterno. Ciò sottolinea che è la sottoregolazione recettoriale per AVP a permettere l'inizio del comportamento paterno nei maschi. La densità di AVPR è invece significativamente più elevata nell'AON nei maschi paterni rispetto ai non paterni. La vasopressina, agendo in tale sede, può essere coinvolta nel riconoscimento degli odori dei piccoli, processo fondamentale per il comportamento paterno, dato che, nei ratti, iniezioni di AVP nell'AON inducono l'aumento del riconoscimento sociale (DLUZEN *et al.*, 1998). Inoltre una significativamente più elevata densità di OTR nelle strutture appartenenti al circuito

dell'amigdala estesa nei maschi paterni rispetto ai non paterni può facilitare l'inizio del comportamento paterno nei maschi, così come le stesse aree cerebrali regolano l'inizio del comportamento materno. Esperimenti svolti da Parker e Lee nel 2001 su maschi di *Microtus pennsylvanicus* inesperti hanno rivelato un effetto dose-dipendente e stato comportamentale-dipendente dell'AVP somministrata sul comportamento paterno ed aggressivo. Per i maschi aggressivi in partenza 1 ng, ma non 3 ng di AVP, sopprime l'aggressività verso i piccoli, ma non induce il comportamento paterno. In maschi di base insensibili invece 3 ng, ma non 1 ng, di AVP favoriscono il comportamento paterno. Comunque, somministrare AVP non aumenta il comportamento paterno in maschi di arvicole già paterni. Dosi di AVP inferiori ad 1 ng sono comportamentalmente inefficaci: i maschi insensibili ai piccoli continuano ad esserlo. E dosi di AVP di 5 ng o più determinano locomozione e pulizia eccessive, senza avvicinamento ai piccoli. Maschi diversi in partenza dal punto di vista comportamentale avrebbero quindi sistemi recettoriali differenziati e per questo risponderebbero diversamente ad iniezioni di AVP. L'AVP e gli AVPR regolano quindi, anche nel *Microtus pennsylvanicus*, il comportamento paterno, in questa specie «facoltativo».

6. CONCLUSIONI

Dagli esperimenti descritti emerge l'indubbio ruolo regolatorio dell'ossitocina e della vasopressina sul comportamento sessuale e parentale nell'Arvicola delle praterie. In generale, se un trattamento farmacologico previene la formazione della preferenza indotta normalmente dall'accoppiamento, questo indica che la formazione del legame di coppia fa affidamento sul sistema neurochimico su cui il trattamento agisce. E trattamenti farmacologici che inducono la preferenza dopo una coabitazione senza accoppiamento suggeriscono che l'attivazione di determinati recettori è sufficiente per formare il legame (WANG & ARAGONA, 2004).

In particolare il LS regola i legami di coppia nei maschi di *Microtus ochrogaster*. Esso contiene AVPR e, durante l'accoppiamento, presenta un aumentato rilascio di AVP. Liu, Curtis e Wang (2001) hanno dimostrato che somministrazioni nel LS di un antagonista dell'AVP che blocca i V_{1a} R inibiscono la preferenza ed il successivo legame indotti dall'accoppiamento e che l'iniezione di AVPA nella CC non ha invece questo effetto. Un'unica somministrazione di AVP nel LS in assenza di accoppiamento determina una tendenza a preferire la partner rispetto all'estranea. La preferenza significativa si ottiene solo in seguito ad infusione continua di AVP nel LS. Il LS contiene anche OTR ed iniezioni di OTA nel LS inibiscono la preferenza indotta dall'accoppiamento, al pari di iniezioni di AVPA. L'infusione continua di AVP contenente la stessa dose di AVPA o di OTA inibisce la preferenza indotta dall'AVP esogena. I legami di coppia nei

maschi di Arvicola delle praterie sono regolati dall'AVP nel LS, in cui si attivano sia gli AVPR che gli OTR, probabilmente simultaneamente. Nelle femmine di Arvicola delle praterie i legami di coppia sono regolati dall'OT e non dall'AVP. La regolazione neuropeptidergica del comportamento affiliativo è perciò sessualmente dimorfica, anche se è stato dimostrato recentemente che entrambi i neurormoni possono regolare i legami di coppia in tutti e due i sessi e interagire. L'esperimento di Bales e Carter (2003), condotto su maschi di Arvicola delle praterie, rivela che i manipolati neonatalmente con OT manifestano una significativa preferenza per la partner dopo un'ora di coabitazione senza accoppiamento, cosa che non accade per gli OTA (inibizione della formazione della preferenza) né per i SAL (tendenza alla preferenza). Inoltre sia gli OT che gli OTA presentano contatto sociale complessivo significativamente maggiore rispetto ai SAL. Quindi un'unica iniezione di OT in età neonatale incrementa significativamente nei maschi il contatto sociale selettivo, ma anche totale, e facilita la formazione della preferenza e del legame. L'antagonista impiegato si lega ai recettori per l'ossitocina, ma è in grado di legarsi anche a quelli per la vasopressina. Da ciò deriva che anche l'AVP, unitamente all'attivazione dei suoi recettori, può contribuire alle differenze esibite. Spesso composti in grado di influenzare un sistema possono avere effetti anche sull'altro, suggerendo una comunicazione trasversale tra AVP ed OT. Inoltre il legame agli OTR e quello agli AVPR sembrano entrambi necessari per indurre la preferenza, mentre per favorire il contatto sociale non selettivo sembra essere sufficiente l'attivazione di uno o dell'altro sistema recettoriale.

I pattern di distribuzione dei recettori per l'AVP e l'OT e la loro densità regionale presentano alcune differenze specie-specifiche tra arvicole, le quali suggeriscono una diversa sensibilità cerebrale all'AVP e all'OT. Infatti l'AVP rilasciata durante la coabitazione e l'accoppiamento attiva circuiti neurali differenti nelle arvicole monogame e promiscue. Nei maschi di *Microtus ochrogaster* e *Microtus pinetorum*, ma non di *Microtus montanus* né di *Microtus pennsylvanicus*, l'AVP influenza il comportamento sociale. Durante l'accoppiamento e la formazione del legame di coppia l'attivazione neuronale coinvolge significativamente nel *Microtus ochrogaster* il VP, il NAcc, il BNST, la MPOA, la MeA e il MdThal. Il VP presenta nell'Arvicola delle praterie molti $V_{1a}R$ e fibre vasopressinergiche che rilasciano AVP, diversamente dalle arvicole promiscue, ed il blocco sito-specifico di tali recettori inibisce il legame nei maschi, così come iniezioni sito-specifiche nella MeA e nel MdThal. Il NAcc è l'unica di queste strutture che non esprime i $V_{1a}R$, ma contiene molti OTR (pochi invece nelle promiscue). Il blocco recettoriale sito-specifico inibisce, in questo caso, la preferenza nelle femmine di *Microtus ochrogaster*. Pur essendoci un certo dimorfismo sessuale nei recettori, nei neurormoni e nelle strutture che modulano la formazione del legame nel *Microtus ochrogaster*, è comunque possibile che circuiti neurali distinti

convergono a livello del proencefalo ventrale, incrociandosi tra NAcc e VP (LIM *et al.*, 2004). Differenze specie-specifiche tra arvicole nei pattern di distribuzione recettoriale per OT ed AVP si trovano anche nell'amigdala estesa. Qui i maschi di *Microtus ochrogaster* esprimono un maggior numero di AVPR rispetto a quelli di *Microtus montanus* e *Microtus pennsylvanicus*. Nei primi le cure parentali sono associate ad un aumento nel rilascio di AVP. Il *Microtus pennsylvanicus* solitamente non è paterno, ma può esserlo facoltativamente.

È stato dimostrato che la densità di AVPR è significativamente maggiore nell'AON e significativamente minore nel LS nei maschi facoltativamente paterni rispetto ai non paterni. La bassa densità di AVPR nel LS del *Microtus pennsylvanicus* facoltativamente paterno coincide con quella del *Microtus ochrogaster* sempre paterno. Invece la densità degli OTR è significativamente maggiore nell'AON, nel LS, nel BNST e nella LatA nei maschi paterni ed esperti rispetto agli inesperti ed insensibili di Arvicola della Pennsylvania. L'AVP correla con l'aggressività: una densità elevata di AVPR nel LS si associa ad elevato comportamento aggressivo che può condurre all'inibizione del comportamento paterno nei maschi. L'AON è una struttura chiave per l'elaborazione dell'odore dei piccoli e quindi per il loro riconoscimento. Il comportamento paterno facoltativo nel *Microtus pennsylvanicus* risulta essere regolato da AVP ed AVPR, analogamente al comportamento paterno del *Microtus ochrogaster*.

Nelle femmine gli OTR variano a seconda della fase riproduttiva e vengono sintetizzati attraverso l'azione dell'estrogeno sui recettori ER $_{\alpha}$ nell'amigdala (effetto steroide-dipendente). L'estro e la gestazione forniscono il contesto endocrino per la sintesi dell'OT e degli OTR. Sia i recettori per l'estrogeno che l'ossitocina sono essenziali per il riconoscimento sociale, ad esempio quello dei piccoli da parte della madre dopo il parto (KEVERNE & CURLEY, 2004). Gli OTR proliferano nella LatA delle femmine di Arvicola montana e nel VMN di quelle montane e delle praterie entro 24 ore dalla nascita dei piccoli. Le femmine di *Microtus ochrogaster* mostrano tendenzialmente una diminuzione del comportamento materno ed un aumento dell'attacco ai piccoli con l'avanzare dell'età in natura e in laboratorio, qualsiasi sia il trattamento ricevuto. I maschi invece rimangono tendenzialmente più parentali (BALES *et al.*, 2004). Questi effetti sessualmente dimorfici si associano a fluttuazioni ormonali, a cui le femmine sono soggette, soprattutto nelle ultime fasi della gestazione e al parto, che agiscono stimolando l'inizio del comportamento materno durante e subito dopo la nascita dei piccoli, eliminando la propensione infanticida e mantenendo la cura per i cuccioli per il tempo opportuno, oltre il quale le femmine tornano ad essere aggressive verso i piccoli. L'ossitocina è inoltre ansiolitica. I piccoli che succhiano il latte stimolano nella madre il rilascio di OT che può contribuire a modulare il comportamento tipicamente materno, sopprimendo risposte irruente verso i cuccioli che denoterebbero ansia e paura, reazioni giustificate nel caso in cui, ad esempio, la

madre non riconoscesse i propri figli. L'OTA manipolato neonatalmente può influire negativamente sull'aloparenting nei maschi adulti: come dimostrato da BALES *et alii*, essi sono significativamente più aggressivi nei confronti dei piccoli rispetto ai controlli e agli OT a 21 giorni d'età e a 60 mostrano una tendenza simile. È importante sottolineare che l'AVP e l'OT esercitano un'azione regolatoria su componenti del comportamento sessuale e sociale nell'Arvicola delle praterie attraverso manipolazioni sia neonatali che in età adulta.

Anche il sistema dopaminergico partecipa alla regolazione dei legami di coppia. Il NAcc appartiene al circuito di reward e contiene terminazioni e recettori per la dopamina (DA) nell'Arvicola delle praterie. L'accoppiamento stimola il rilascio di DA nel NAcc e facilita la formazione del legame. Aree cerebrali come il VP ed il LS fanno parte dello stesso circuito di reward del NAcc. L'espressione dei recettori D_1 nel NAcc dei maschi è inalterata dopo 24 ore di accoppiamento, ma aumenta significativamente due settimane dopo che essi hanno formato il legame con la femmina. Il cambiamento è specifico per il NAcc. L'attivazione significativa dei recettori D_1 previene la formazione di preferenza e legame e può funzionalmente impedire l'istituzione della preferenza per una nuova femmina e consentire così il mantenimento di un'organizzazione sociale monogamica (WANG & ARAGONA, 2004).

L'accoppiamento favorisce il rilascio di DA nel NAcc anche in specie di roditori che non costituiscono legami di coppia e nei nuclei caudato e putamen in arvicole monogame e promiscue. Per questo la DA rilasciata non può essere totalmente responsabile del legame osservato nelle arvicole monogame, ma interagisce probabilmente con quei sistemi neurochimici specie-specificamente diversi nelle arvicole. Nelle femmine di Arvicola delle praterie la DA e l'OT interagiscono nel NAcc: qui la somministrazione di un OTA inibisce la preferenza indotta dall'attivazione dei D_2 e, viceversa, il blocco dei D_2 inibisce la preferenza indotta dall'OT. Per la formazione del legame sono necessari l'attivazione simultanea degli OTR e dei D_2 ed interazioni tra i due sistemi nel NAcc. Nei maschi di Arvicola delle praterie il NAcc è strettamente connesso con il VP, sua principale stazione di output, che contiene molti V_{1a} R. La DA e l'AVP interagiscono nel VP per regolare i legami nei maschi. La formazione del legame di coppia è quindi un comportamento sociale complesso regolato da aree cerebrali (NAcc, LS, VP) e sistemi neurochimici multipli (AVP, OT, DA) che, invece di agire indipendentemente, interagiscono e contribuiscono al mantenimento della strategia riproduttiva monogamica dell'Arvicola delle praterie.

Sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire i dimorfismi sessuali tra AVP ed OT nella regolazione dei legami di coppia, utilizzando gli stessi paradigmi sperimentali e, ad esempio, antagonisti recettoriali selettivi per elucidare precisamente il contributo dei singoli neuropeptidi, con attenzione inoltre al fatto che diverse somministrazioni (intracerebroventricolare, sito-specifica) possono por-

tare a concentrazioni differenti del farmaco in determinate aree implicate nella regolazione di tali comportamenti.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Corso di Laurea in Scienze e Tecniche Psicologiche dell'Università degli Studi di Trieste e, in particolare, il professor Enrico Ferrero, prodigo di consigli e suggerimenti.

BIBLIOGRAFIA

- ARAGONA B.J., LIU Y., CURTIS T.J., STEPHAN F.K. & WANG Z., 2003 - A critical role for nucleus accumbens dopamine in partner preference formation of male prairie voles. *Journal of Neuroscience*, 23: 3483-3490.
- BALES K.L., ABDELNABI M., CUSHING B.S., OTTINGER M.A. & CARTER C.S., 2004 - Effects of neonatal oxytocin manipulations on male reproductive potential in prairie voles. *Physiology & Behavior*, 81: 519-526.
- BALES K.L. & CARTER C. S., 2003 - Developmental exposure to oxytocin facilitates partner preferences in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioral Neuroscience*, 117: 854-859.
- BALES K.L., LEWIS-REESE A.D., PFEIFER L.A., KRAMER K.M. & CARTER C.S., 2007 - Early experience affects the traits of monogamy in a sexually dimorphic manner. *Developmental Psychobiology*, 49: 335-342.
- BALES K.L., PFEIFER L.A. & CARTER C.S., 2004. Sex differences and developmental effects of manipulations of oxytocin on alloparenting and anxiety in prairie voles. *Developmental Psychobiology*, 44: 123-131.
- BEAR M.F., CONNORS B.W. & PARADISO M.A., *Neuroscienze - Esplorando il cervello*, Masson Editore, Milano, 2002.
- CACIOPPO J.T., TASSINARY L.G. & BERNTSON G.G., 2000 - *Handbook of Psychophysiology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- CHO M.M., DE VRIES A.C., WILLIAMS J.R. & CARTER C. S., 1999 - The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioral Neuroscience*, 113: 1071-1079.
- CUSHING B.S., LEVINE K. & CUSHING N.L., 2005 - Neonatal manipulation of oxytocin influences female reproductive behavior and success. *Hormones and Behavior*, 47: 22-28.
- CUSHING B.S., OKORIE U. & YOUNG L.J., 2003 - The effects of neonatal castration on the subsequent behavioural response to centrally administered arginine vasopressin and the expression of V_{1a} receptors in adult male prairie voles. *Journal of Neuroendocrinology*, 15: 1021-1026.

- DE VRIES A. C. & CARTER C. S., 1999 - Sex differences in temporal parameters of partner preference in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Canadian Journal of Zoology*, 77: 885-889.
- DLUZEN D.E., MURAOKA S., ENGELMANN M. & LANDGRAF R., 1998 - The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. *Peptides*, 19: 999-1005.
- GOODENOUGH J., MCGUIRE B. & WALLACE R.A., 1993 - *Perspectives on animal behavior*, John Wiley & sons, New York.
- INSEL T.R., PRESTON S. & WINSLOW J.T., 1995 - Mating in the monogamous male: Behavioral consequences. *Physiology & Behavior*, 57: 615-627.
- INSEL T.R., WANG Z. & FERRIS C.F., 1994 - Patterns of brain vasopressin receptor distribution associated with social organisation in microtine rodents. *Journal of Neuroscience*, 14: 5381-5392.
- INSEL T.R. & YOUNG L.J., 2001 - Neurobiology of social attachment. *Nature Neuroscience*, 2: 129-136.
- KANDEL E.R., SCHWARTZ J.H. & JESSEL T.M., 2003 - *Principi di neuroscienze*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- KEEFE D.L., 2002 - Sex hormones and neural mechanisms. *Archives of Sexual Behavior*, 31: 401-403.
- KEVERNE E.B. & CURLEY J. P., 2004 - Vasopressin, oxytocin and social behaviour. *Current Opinion in Neurobiology*, 14: 777-783.
- KRAMER K.M., CHOE C., CARTER C.S. & CUSHING B.S., 2006 - Developmental effects of oxytocin on neural activation and neuropeptide release in response to social stimuli. *Hormones and Behavior*, 49: 206-214.
- LIBHABER N. & EILAM D., 2002 - Social vole parents force their mates to baby-sit. *Developmental Psychobiology*, 41: 236-240.
- LIM M.M., HAMMOCK E.A.D. & YOUNG L. J., 2004 - The role of vasopressin in the genetic and neural regulation of monogamy. *Journal of Neuroendocrinology*, 16: 325-332.
- LIM M. M., MURPHY A. Z. & YOUNG L. J., 2004. Ventral striatopallidal oxytocin and vasopressin V_{1a} receptors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Comparative Neurology*, 468: 555-570.
- LIM M. M. & YOUNG L.J., 2006 - Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Hormones and Behavior*, 50: 506-517.
- LIU Y., CURTIS J.T. & WANG Z., 2001 - Vasopressin in the lateral septum regulates pair bond formation in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioral Neuroscience*, 115: 910-919.
- LONSTEIN J.S. & DE VRIES G.J., 2000 - Influence of gonadal hormones on the development of parental behavior in adult virgin prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioural Brain Research*, 114: 79-87.

- LONSTEIN J.S. & DE VRIES G.J., 2000 - Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24: 669-686.
- MAHALATI K., OKANOYA K., WITT D.M. & CARTER C.S., 1991 - Oxytocin inhibits male sexual behavior in prairie voles. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 39: 219-222.
- OLAZABAL D.E. & YOUNG L. J., 2006 - Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate «spontaneous» maternal behavior in adult female prairie voles. *Neuroscience*, 141: 559-568.
- PARKER K.J., KINNEY L.F., PHILLIPS K.M. & LEE T.M., 2001 - Paternal behavior is associated with central neurohormone receptor binding patterns in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Behavioral Neuroscience*, 115: 1341-1348.
- PARKER K.J. & LEE T.M., 2001 - Central vasopressin administration regulates the onset of facultative paternal behavior in *Microtus pennsylvanicus* (meadow voles). *Hormones and Behavior*, 39: 285-294.
- RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M. & MOORE P.K. 2004 - *Farmacologia*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- SCHULKIN J. 1993 - *Hormonally induced changes in mind and brain*, Academic Press, San Diego.
- WANG Z. & ARAGONA B.J., 2004 - Neurochemical regulation of pair bonding in male prairie voles. *Physiology & Behavior*, 83: 319-328.
- WANG Z., LIU Y., YOUNG L.J. & INSEL T.R., 2000 - Hypothalamic vasopressin gene expression increases in both males and females postpartum in a biparental rodent. *Journal of Neuroendocrinology*, 12: 111-120.
- WYNNE-EDWARDS K.E. & TIMONIN M.E., 2007 - Paternal care in rodents: Weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care. *Hormones and Behavior*, 52: 114-121.
- YOUNG L.J., LIM M.M., GINGRICH B. & INSEL T.R., 2001 - Cellular mechanisms of social attachment. *Hormones and Behavior*, 40: 133-138.
- YOUNG L.J. & WANG Z., 2004 - The neurobiology of pair bonding. *Nature Neuroscience*, 7: 1048-1054.

Indirizzo dell'autore
 Matilde Elisabetta Ingrid Nicita - via Noriglio, 44 - I-38068 Rovereto (TN)
 ichbrauchnenkorn@libero.it
