

An. R. Acad. Nac. Farm., 2006, 72: 489-517

Sesiones

Receptores de feromonas de mamíferos: supervivencia y sexualidad

Recibido el 10 de julio de 2006

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL *

Catedrático de Bioquímica y Académica de Número de la RANF

RESUMEN

En 1995 Catherine Dulac y Richard Axel publicaron la existencia de una nueva familia de genes que codificaban los posibles receptores de feromonas, pertenecientes a la amplia familia de los de siete hélices transmembranares y acoplados a proteínas G. Desde entonces se han clonado nuevos genes que han sido agrupados en dos familias, los receptores vomeronasales tipo 1 y 2, V1R y V2R, con diferente estructura y situados con diferente distribución en el órgano vomeronasal. La naturaleza química de las feromonas y de las proteínas que las asocian y transportan conocidas como lipocalinas es otro de los aspectos de los que se dispone de abundante información. Los mecanismos de transducción de la señal mediada por feromonas sobre los receptores V1R y V2R implican la activación de la fosfolipasa C tipo β_2 , PLC β_2 , generando el fosfatidilinositol trifosfato y el diacilglicerol en la cara interna de la membrana neuronal. El diacilglicerol es un ligando endógeno, que permite la apertura del canal de la familia TRPC (Transient Receptor Potential Channel) denominado TRPC2 que se abre y deja pasar iones Ca^{2+} y Na^+ al interior de la neurona sensorial, iniciando la despolarización de la membrana y originando el potencial de acción. La señal eléctrica es conducida al bulbo olfativo auxiliar por axones que llegan de modo disperso y establecen conexión con las células mitrales, las cuales envían sus prolongaciones hasta el sistema límbico y otras estructuras cerebrales, donde influyen o provocan las respuestas de supervivencia de la especie, entre ellas las de apareamiento y agresividad. Un aspecto relevante desde el punto de vista evolutivo es que en primates el gen TRPC2 es un

* Conferencia impartida en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 27 de octubre de 2005.

E-mail: mtmiras@vet.ucm.es

pseudogen sin funcionalidad y por lo tanto el órgano vomeronasal es un vestigio carente de función. Recientes estudios indican que la captación de feromonas en primates se realiza a través del epitelio olfativo y el bulbo olfativo principal e incluso en otros mamíferos esta estructura parece mediar en algunas respuestas especie específicas.

Palabras clave: Bulbo olfativo accesorio.—Canales TRPC2.—Diacilglicerol.—Diacilglicerol quinasa.—Feromonas.—Lipocalinas.—Órgano vomeronasal.—Receptores vomeronasales.—V1R.—V2R.

ABSTRACT

Mammalian pheromone receptors: survival and sexuality

In 1995 Catherine Dulac and Richard Axel discovered a new gene family corresponding to the pheromone receptors. They were members of the seven transmembrane helix coupled to G proteins. Since then, new genes have been cloned and grouped according their sequence homology in two main families of vomeronasal receptors the V1R and the V2R. They exhibit different distribution pattern at the vomeronasal epithelium, where they are coupled to different G proteins. The chemical nature of the mammalian pheromones is very diverse and can associate with proteins called lipocalins to reach the vomeronasal organ. The transduction mechanisms of pheromone receptors, V1R and V2R, require respectively a Gi and a Go proteins, to further activate a phospholipase C, the PLC β_2 . This enzyme hydrolyses the phosphatidyl inositol located at the plasma membrane originating phosphatidylinositol triphosphate and diacylglycerol. Diacylglycerol is an endogenous ligand that opens the TRPC2 channel (Transient Receptor Potential Channel), allowing the entrance of cations, mostly Ca²⁺ y Na⁺. The membrane depolarisation at the vomeronasal neuron originates the action potential that is sent to the accessory olfactory bulb by the axon, which in a different way as those from the main olfactory epithelia, do not organise the axonal prolongations and reach the mitral neurones in a disperse way, without forming a glomerular structure, afterwards the mitral cells send their axons to the limbic system and other cerebral structures related to aggressive behaviour and mating. It is relevant to underline that in monkeys from the old world and primates including humans, the vomeronasal organ is only a vestigial structure without function. The reason relies on the TRPC2 gene, which is a pseudo gene, without physiological function. Recent experimental approaches have demonstrated that the sensing of some pheromonal signals in these species, and also in mammals with a functional vomeronasal organ, can be carried out by the main olfactory epithelia through the main olfactory bulb. This structure being also connected to the hypothalamus, where neurones releasing LHRH can control sexual behaviour. These data confirm the broad possibilities of signalling through pheromones and that much effort is still required to fully understand their possibilities.

Key words: Accessory olfactory bulb.—Diacylglycerol.—Diacylglycerol kinase.—Lipocalines.—Pheromones.—TRPC2 channel.—Vomeronasal organ.—Vomeronasal receptors.—V1R.—V2R.

INTRODUCCIÓN

Las feromonas son mensajeros químicos especie específicos. Algunos animales liberan sustancias químicas en su entorno para influenciar el comportamiento o fisiología de los miembros de la misma especie. Las feromonas fueron descubiertas en insectos, pero en este artículo haremos especial referencia a los mamíferos. Las feromonas juegan un importante papel en el comportamiento sexual y social, así como en la fisiología reproductiva de muchas especies de mamíferos. El descubrir la naturaleza de estas sustancias, así como la estructura de sus receptores y sus mecanismos de señalización ha supuesto un reto científico, algunos de cuyos aspectos están todavía pendientes de ser resueltos. Una gran aportación fue la de Catherine Dulac y Richard Axel, quienes publicaron en 1995 la existencia de una nueva familia de genes que codificaban los posibles receptores de feromonas, pertenecientes a los siete hélices transmembranares y acoplados a proteínas G (1).

La naturaleza química de las feromonas es muy diversa y se conoce una mínima parte, algunas son volátiles, pero todas se suelen liberar asociadas a proteínas denominadas lipocalinas, que son abundantes en la orina de mamíferos, o en otras secreciones, como el sudor y la saliva. Uno de los aspectos en pleno desarrollo es determinar qué receptor está implicado en el reconocimiento de cada una de las feromonas y las técnicas para el análisis de respuesta de las neuronas sensitivas. En muchos casos el reconocimiento de las feromonas por los receptores necesita la presencia de las lipocalinas, con lo cual la definición de feromona es más ambigua y el mecanismo de reconocimiento más complejo.

Las neuronas sensibles a feromonas están localizadas en el órgano vomeronasal con una distribución en la zona apical o basal que depende de la familia de receptor, V1R o V2R, que exprese la neurona sensitiva. El recorrido de los axones de las neuronas que contienen receptores de feromonas es diferente de las que contienen los receptores olfativos que están localizadas en el epitelio olfativo principal.

La zona de proyección de los axones vomeronasales es al bulbo olfativo auxiliar. La transducción de la señal de feromonas ha puesto de manifiesto la riqueza y complejidad de los receptores de siete hélices transmembranares para enviar información al interior de la célula, permitiendo analizar acciones mediadas fundamentalmente por las subunidades $\beta\gamma$ como activadoras de una fosfolipasa $C\beta_2$ y no por la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas. Otro hito importante es que de los segundos mensajeros formados, es el diacilglicerol, que permanece asociado a la membrana, el que media la apertura de los canales conocidos como TRPC2 (Transient Receptor Potential Channel), que son específicos del epitelio vomeronasal. La filogenia de estos canales y su funcionalidad han aportado claves esenciales para comprender las respuestas de especie, pero han generado nuevas incógnitas sobre la respuesta a feromonas en los primates.

En esta revisión trataremos de dar una panorámica de la situación actual del tema, fundamentalmente en mamíferos, y abordaremos los siguientes aspectos:

1. Naturaleza química de las feromonas y proteínas de asociación y transporte.
2. Receptores de feromonas, estructura y localización en el órgano vomeronasal. Proyección al bulbo olfativo.
3. Mecanismos de transducción de la señal de feromonas.
4. Los canales TRPC, filogenia, diferencias entre mamíferos, el caso particular de los primates.
5. Feromonas captadas por el bulbo olfativo, importancia en el comportamiento sexual, nuevos datos.

1. NATURALEZA QUÍMICA DE LAS FEROMONAS Y PROTEÍNAS DE ASOCIACIÓN Y TRANSPORTE, LIPOCALINAS

1A. Naturaleza de las feromonas

La primera feromona descubierta fue aislada del órgano sexual localizado en el extremo del abdomen de la hembra de la mariposa

de la seda, *Bombyx mori*. El descubridor fue Adolf Butenandt en el año 1956. Este científico alemán había sido galardonado con el Premio Nobel de química en 1939 por su contribución al conocimiento de la estructura de las hormonas esteroídicas. La primera feromona se denominó Bombykol, es un alcohol alifático de 16 átomos de carbono e insaturado (E,Z)-10,12-hexadecadien-1-ol (Figura 1) (2). Curiosamente el receptor de esta feromona, que está presente solamente en el macho, expresándose en las antenas, ha tardado más de diez años en ser identificado con respecto a los receptores de mamíferos (3). Este receptor es absolutamente específico de la forma alcohol, pues una modificación tan ligera como la oxidación a aldehído, el bombycal, produce una ausencia total de estimulación del receptor. Otras isomerías, como el cambio cis -trans de los dobles enlaces (10Z, 12E), produce un compuesto diez millones de veces menos activo. Otras mariposas nocturnas utilizan isómeros diversos o compuestos muy similares al bombykol.

Estructura, procedencia y función de algunas feromonas



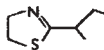
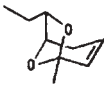
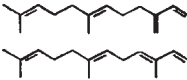
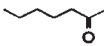
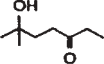
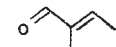
Bombykol		Mariposa de la seda- Atracción del macho
2,5-dimetilpiracina		Orina de ratón hembra- Retraso de la pubertad
2-sec-butil-4,5-dihidrotiazol		Orina y vejiga de ratón macho- sincronización del estro y aceleración de la pubertad.
2,3-dehidro-exo-brevicomín		Orina y vejiga de ratón macho- sincronización del estro y aceleración de la pubertad
α - y β -farnesenos		Glándula prepucial del ratón- Aceleración de la pubertad.
2-heptanona		Orina de ratón macho y hembra- ampliación del estro.
6-hidroxi-6-metil-3-heptanona		Orina y vejiga de ratón macho-aceleración de la pubertad
2-metilbut-2-enal		Leche de coneja- Localización del pezón materno

FIGURA 1. Estructura de algunas feromonas con función y procedencia conocida.

En general el descubrimiento y estudio de las estructuras de feromonas de mamíferos resulta mucho más complejo que en insectos, ya que estos los tienen acumulados en glándulas secretoras fácilmente identificables, mientras que en los mamíferos se encuentran en secreciones mucho más complejas, como la orina, la saliva u otras secreciones de los órganos sexuales y reproductivos. Un aspecto complejo es el modelo de análisis de la actividad feromona, una vez que se aíslan los diferentes candidatos de la secreción correspondiente, algunas veces con estructuras similares. Existen modelos diseñados para estudiar el comportamiento agresivo o dominante entre machos, o la inducción del celo o la aceleración de la pubertad en las hembras, que se encuentran entre los más empleados y todavía se depende de ellos para la caracterización de sustancias potencialmente activas. Estos modelos requieren la experimentación animal y muchas veces los resultados son de difícil interpretación. Recientemente las técnicas de electrofisiología, midiendo las respuestas generadas, o las de inducción de la señalización mediante activación de factores nucleares, entre otros el fos, que incrementan la síntesis de ARNm específicos, están resultando de gran utilidad.

Las feromonas de mamífero caracterizadas hasta el momento son de naturaleza, función y procedencia muy variada, algunas son volátiles, pero no es esencial esta cualidad. En la Figura 1 están recogidos algunos ejemplos que dejan constancia de la diversidad de las estructuras y funciones supuestas para las feromonas. Existen amplias diferencias entre las feromonas de diferentes especies de roedores, pero algunas feromonas de mamífero pueden ser muy similares a algunas de insectos, como es el caso de los farnesenos y la heptanona. Como anécdota la feromona de elefante (Z)-7-dodecen-1-il acetato es también una feromona de insectos.

1B. Proteínas de transporte de feromonas, lipocalinas

Las feromonas, sean volátiles o no, tienen que alcanzar el epitelio olfativo del órgano vomeronasal, e interactuar con los receptores específicos que se encuentran acoplados a proteínas G. Un aspecto curioso es que normalmente las feromonas se liberan asociadas con proteínas que las protegen de una rápida volatilización y que además

podrían servir para anclar la feromona de modo adecuado en el receptor. Estas proteínas se denominan lipocalinas y constituyen una amplia y extensa familia de proteínas presentes en todos los mamíferos. Son proteínas extracelulares y forman parte de una superfamilia conocida como calicinas, entre cuyos miembros se encuentran las proteínas que unen el retinol y lo transportan en el plasma sanguíneo, las que unen ácidos grasos y las avidinas que unen la biotina (4).

Las lipocalinas son proteínas de transporte que se expresan en muchas secreciones, como el mucus nasal, orina, secreciones vaginales, saliva, etc. El nombre de cada una de ellas depende del lugar y la función que se le asignó al ser descubierta, pero todas ellas tienen una estructura similar conocida como barril- β , con un bolsillo hidrofóbico en el interior (5, 6). En la Figura 2 puede observarse la estructura general de las lipocalinas. Existe una gran homología de secuencia entre las lipocalinas, aunque cada una de ellas puede presentar múltiples polimorfismos, este es el caso de la lipocalina denominada afrodisina, procedente de las secreciones vaginales de hámster, del alérgeno del caballo, de las proteínas de orina de ratón, conocidas como MUPS (Major Urinary Proteins), o las de la saliva de verraco, denominadas también SAL, que unen las hormonas sexuales androstenol y androstenona.

La estructura terciaria de las lipocalinas es muy similar, todas ellas tienen una amplia cavidad donde pueden alojar la sustancia de naturaleza hidrofóbica, generalmente lipídica. La cavidad está tapizada por los residuos de aminoácidos hidrofóbicos de las estructuras en hoja plegada- β antiparalela. Los nueve segmentos de hoja plegada están unidos por cortas secuencias en estructura al azar y un pequeño segmento en α -hélice. La cavidad interna puede variar en volumen desde unos 270 \AA^3 hasta 500 \AA^3 , según el tamaño de los residuos hidrofóbicos tapizantes, lo que permite alojar estructuras de gran tamaño, como es el caso de las hormonas esteroídicas (5, 6). En la Figura 2 están representadas las cavidades de las lipocalinas de saliva de verraco, alérgeno de caballo y urinarias de ratón.

Una cuestión importante es si de algún modo las lipocalinas son necesarias para que las feromonas interactúen con los receptores del órgano vomeronasal y se desencadene la respuesta fisiológica. Las evidencias a favor o en contra existen y es posible que en algu-

nos casos la feromona sea reconocida con su proteína transportadora asociada.

Proteínas de transporte de feromonas. Estructura de las lipocalinas

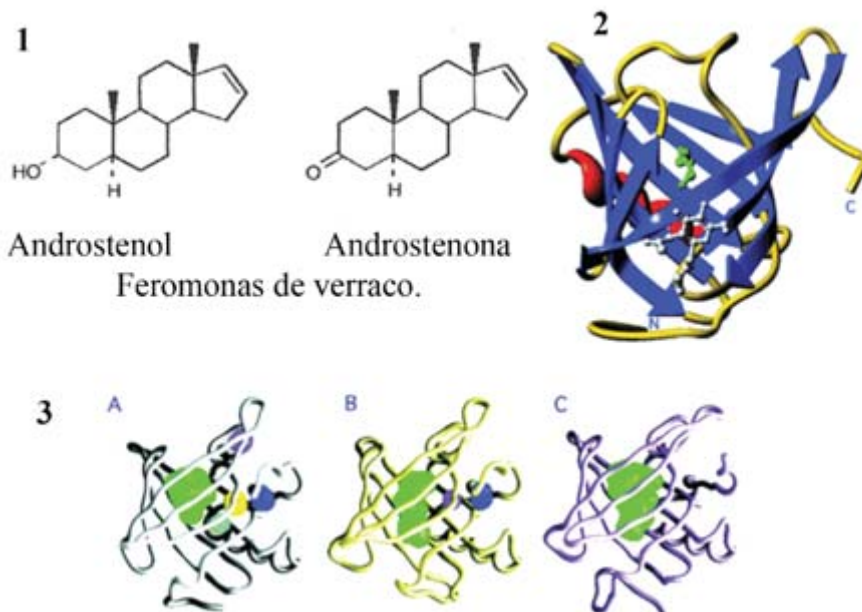


FIGURA 2. **Estructura de las lipocalinas.** La lipocalina, presente en la saliva de verraco, también denominada SAL, es una proteína que se expresa específicamente en la glándula submaxilar y une con gran afinidad las feromonas de naturaleza esteroídica androstenol y androstenona.

1. Estructura del androstenol y de la androstenona, feromonas de la saliva de verraco que inducen el celo y el apareamiento en la cerda, se liberan asociadas a la lipocalina denominada SAL.
2. Estructura de la SAL mostrando la forma en barril- β , con nueve segmentos antiparalelos en hoja plegada- β , dejando una amplia cavidad hidrofóbica.
3. Estructura comparativa de tres lipocalinas diferentes, A-SAL, B-Alergeno de caballo y C-Proteína mayoritaria de orina de ratón, conocida como MUP.

2. RECEPTORES DE FEROMONAS, ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN EN EL ÓRGANO VOMERONASAL. PROYECCIÓN AL BULBO OLFATIVO

El trabajo pionero de Catherine Dulac y Richard Axel permitió la caracterización de una nueva familia de receptores sensoriales que

podían reconocer las feromonas (1). Estos receptores fueron caracterizados mediante rastreo diferencial de librerías de cDNA construidas a partir de neuronas sensoriales individuales del órgano vomeronasal.

Desde un punto de vista comparativo, el ratón tiene unos 1.000 genes diferentes de receptores olfativos, OR, cada uno de estos genes se expresan de modo excluyente en cada una de las neuronas del epitelio olfativo principal. En el caso del epitelio sensorial del órgano vomeronasal, el número de genes que se expresan es menor y aunque todos ellos pertenecen a los receptores de siete hélices transmembranares, se pueden agrupar en dos familias muy alejadas entre sí, la familia V1R y la familia V2R, las cuales también se distribuyen de modo segregado en el epitelio vomeronasal (1, 7, 8).

2A. Familia de receptores de feromonas V1R

Los receptores de feromonas de la familia V1R, que se localizan en la zona apical del órgano vomeronasal, pueden dividirse en al menos doce subfamilias, lo que se indica con una letra, V1Ra hasta el V1Rl, el número de genes contenido en cada subfamilia varía ampliamente y depende de la especie analizada, como puede verse en la Figura 3. Estos genes carecen de intrones y presentan una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos, lo que permite el reconocimiento de sustancias muy diversas. Los ligandos de naturaleza feromona, que se asocian a cada uno de ellos, es todavía un tema pendiente, y solamente se conocen algunos, por ejemplo, la feromona que induce el celo en el ratón, la 2-heptanona, es detectada por el receptor V1Rb2 en el rango picoMolar (7). Las feromonas con estructura de farnesenos pueden ser detectadas a concentraciones entre 10^{-10} y 10^{-11} M, lo que convierte a estos receptores entre los más sensibles de todos los conocidos entre los mamíferos. Todos los genes de la familia V1R están acoplados a proteínas G del tipo $G\alpha_i$.

El ratón es el que más genes del tipo V1R tiene, e incluso el 50% de ellos podrían ser funcionales (9). Curiosamente el perro está pobremente dotado, pues tiene pocos genes y además pocos son funcionales. Lo más llamativo ocurre en los primates, en el chimpancé de los 116 genes encontrados analizando el genoma, ni siquiera uno

sería funcional, ya que todos contienen secuencias truncadas, y lo mismo en humanos, donde solamente aparecen dos genes que podrían ser funcionales (9, 10). Aunque el estudio no ha sido completo, existen evidencias de que también el cerdo, el hurón y la oveja tienen una escasa dotación de genes V1R funcionales comparados con los roedores.

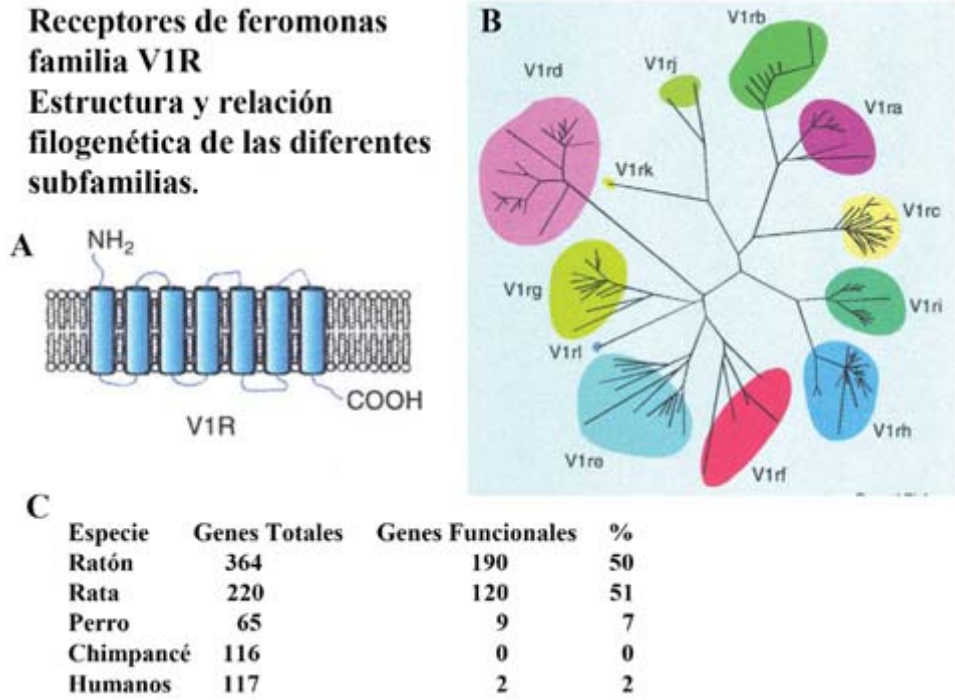


FIGURA 3. *Receptores de feromonas de la familia V1R. Los genes se expresan en la zona apical del órgano vomeronasal.*

- A. *Estructura de siete hélices transmembranares de los receptores V1R.*
- B. *A partir del genoma de ratón se han caracterizado los genes funcionales y agrupados en doce subfamilias, según su homología (modificado de Rodríguez y col., ref. 9).*
- C. *Diferencias entre especies en número de genes totales y funcionales de los receptores V1R.*

Los genes V1R están físicamente agrupados en nueve localizaciones genómicas tanto en rata como en ratón, cada uno de estos grupos contiene los miembros de una familia. Es probable que su nú-

mero se incrementara durante la evolución mediante duplicación génica. Los más antiguos parecen ser los genes V1R de la subfamilia L, que existían antes de la separación de los roedores de otras especies de mamíferos.

Un descubrimiento inesperado, pero con cierta lógica, es la presencia y función de receptores V1R en los espermatozoides de mamíferos (11).

La migración de los espermatozoides hasta alcanzar el óvulo es una etapa crítica para asegurar la fertilización. Mientras que los mecanismos moleculares y celulares de la fertilización han sido relativamente bien caracterizados, no ocurre lo mismo con los mecanismos de migración del espermatozoide. En el modelo del erizo de mar los espermatozoides responden a péptidos quimiotácticos que se liberan del óvulo e inducen el incremento de segundos mensajeros, como el AMP cíclico y el GMP cíclico. La pregunta es si en los mamíferos existe este par señal/receptor que guíe los espermatozoides y, en caso afirmativo, cuál es su naturaleza. Existen evidencias *in vitro* de que los espermatozoides humanos migran y se acumulan en el fluido folicular, la cuestión es cómo llegan hasta allí.

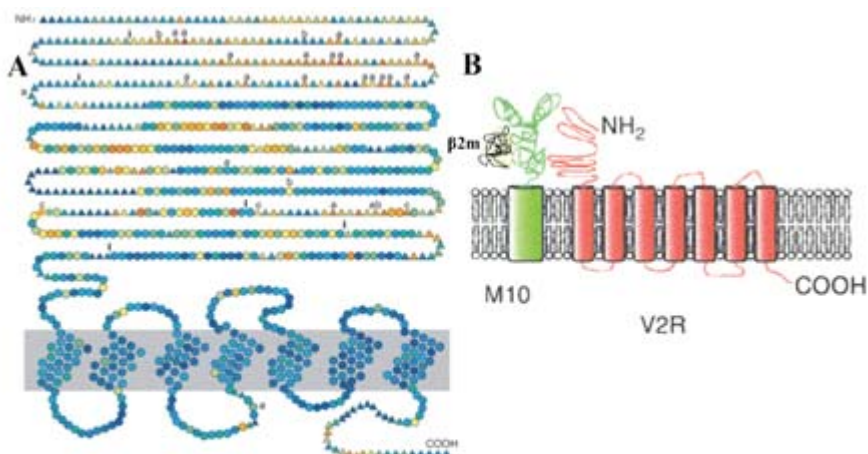
La abundancia de secreciones de naturaleza feromona en las secreciones vaginales de mamíferos y en el propio epitelio vaginal sugiere que estos compuestos puedan tener una función adicional, la de función guía para los espermatozoides. Un estudio mediante PCR de los mensajeros presentes en las células germinales en desarrollo del testículo de ratón, y la hibridación *in situ* posterior, demostró la presencia de RNA mensajeros que codifican para receptores V1R, cada subtipo en un grupo específico de espermátidas (11).

2B. Familia de receptores de feromonas V2R

Los receptores de feromonas de tipo V2R pertenecen también a los de siete hélices transmembranarias, sus genes contienen múltiples exones y se pueden agrupar en tres grandes familias, las A, B, C, según analogía de secuencia. La búsqueda de estos receptores en el genoma de roedores permitió descubrir un total de 209 y 168 secuencias completas, respectivamente, para el ratón y la rata. Como

el genoma de ratón era completo y el de la rata solamente en un 90%, es probable que existan algunos genes más en la rata. El número de genes plenamente funcionales es probable que sea más reducido. Las secuencias proteicas son muy variables y en la Figura 4 se puede ver en una escala de color las posiciones más conservadas en esta familia de receptores. Presentan una secuencia amino-terminal muy amplia, y es donde se localiza la zona de reconocimiento de la feromona, por esta razón es la más variable entre los diferentes receptores (Figura 4). La presencia de este largo dominio extracelular, localizado en el amino terminal, hace emparentar a estos receptores con los gustativos de tipo T1R y los metabotrópicos de glutamato y GABA_B. Todos estos receptores tienen el lugar de unión del ligando efector en esta zona amino-terminal, que es la más variable en la secuencia.

Receptores de feromonas de la familia V2R y proteínas asociadas



Los receptores de feromonas V2R tienen un extenso dominio amino terminal y se asocian con proteínas de la familia de los antígenos de histocompatibilidad y microglobulinas para ser funcionales.

FIGURA 4. **Receptores de feromonas de la familia V2R.**

A. Estructura de siete hélices transmembranares de los receptores V2R. Está reflejada la larga secuencia amino-terminal, donde se une la feromona, el color azul indica los residuos más conservados y hacia el rojo los más variables.

B. Interacción de los receptores V2R con otras proteínas en la membrana de la neurona sensorial. La proteína M10 pertenece a los complejos de histocompatibilidad, la $\beta 2m$ es una microglobulina.

De los receptores funcionales, aproximadamente el 84% de los receptores V2R pertenecen a la familia A, con 52 genes intactos en ratón y 48 en la rata. La familia B contiene solamente seis genes en ratón y cinco en la rata, y la familia C, que es la menos numerosa, contiene tres genes en ratón y cuatro en la rata. La homología de secuencia entre los genes de las familias A y B es un 38% de término medio, mientras que éstas con la familia C tienen solamente un 27% de homología (7, 12).

Los receptores de feromonas de tipo V2R se encuentran localizados en la zona basal del epitelio del órgano vomeronasal y están acoplados a la proteína G del tipo $G\alpha_o$. La formación de dímeros es probable en esta familia de receptores. Además, un aspecto relevante es que los V2R se coexpresan con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), justamente con las H2-Mv. Se han identificado nueve miembros de esta familia, M1, M9, M10.1 hasta M10.6 y la M11, las cuales se expresan solamente en la zona basal del órgano vomeronasal donde se encuentran los receptores V2R. La familia M10 forma complejos multimoleculares con los receptores V2R y la β 2-microglobulina, la formación del complejo es esencial para la estabilización del receptor y su localización en la superficie celular (Figura 4).

Un aspecto a destacar es que la expresión de los genes de receptores V2R no se efectúa de modo independiente a los de las proteínas H2-Mv, existiendo una combinación preferente entre los diferentes subtipos. Una hipótesis plausible es que esta asociación preferente posibilita el reconocimiento no sólo de sus propios componentes, sino también de congéneres estrechamente relacionados que liberen señales asociadas a MHC, mediando aspectos importantes del comportamiento social de los roedores, entre ellos el reconocimiento de mayor o menor proximidad parental y posiblemente el apareamiento (13). Esta hipótesis ha sido recientemente confirmada por el grupo de K. Touhara en Japón (14), el cual consiguió aislar la señal química que induce el apareamiento en ratones. La historia del descubrimiento merece la pena ser contada, lo que se hace en el próximo epígrafe.

2C. Péptidos sexo específicos

El grupo de Touhara en la Universidad de Tokio estaba investigando las señales químicas que inducían el apareamiento en ratones. Comenzó ensayando los compuestos ya descritos, como feromonas, algunos de los cuales se encuentran en la Figura 1. Comenzado el estudio descubrió que realmente no parecían ser detectados por el órgano vomeronasal con una función definida en el apareamiento. Pensó entonces que deberían de existir otros compuestos con actividad feromona de naturaleza diferente. Analizó de nuevo la orina en búsqueda de nuevos compuestos, pero no obtuvo resultados positivos. Una joven estudiante de doctorado de su grupo, H. Kimoto, comenzó a estudiar una pequeña glándula presente debajo de la oreja y obtuvo respuestas prometedoras. Esta glándula, que se encuentra específicamente en el ratón macho, es análoga a las glándulas lacrimales, a pesar de su localización. Que una feromona pudiera liberarse en las lágrimas era difícil de creer, pero a nadie se le había ocurrido antes (14).

Otra enorme sorpresa la deparó el hecho de que la sustancia secretada no era volátil, lo cual es poco frecuente en las feromonas. Esta característica hacía necesario el contacto físico previo a la detección mediante frotamientos de la zona facial. La purificación del compuesto a partir de la glándula lacrimal extraorbital demostró que tenía naturaleza peptídica, de 7-kDa de peso molecular y se le conoce como ESP1 (Exocrine Gland-Secreting Peptide 1), el 1 por ser el primero descubierto. El gen que lo codifica procede de una amplia familia, de función desconocida, agrupada en la proximidad de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC). El ESP1 es secretado en la lágrima de los ojos del macho y transferido al órgano vomeronasal de la hembra donde estimula neuronas sensoriales que expresan un subtipo específico de receptores V2R y origina una respuesta eléctrica. Estos resultados sugieren que el ratón puede responder a péptidos sexo-específicos liberados de glándulas exocrinas y transferidas al órgano vomeronasal mediante contacto directo.

Como curiosidad señalar que en medios acuáticos las ranas emplean péptidos sexo-específicos de 10-25 aminoácidos de tamaño y en las salamandras los machos envían péptidos de 10 a 22 kDa a

las narices de las hembras durante el cortejo. Cada animal parece haber desarrollado una estrategia evolutiva única para transmitir las feromonas sexo-específicas no volátiles.

2D. Localización de receptores en el órgano vomeronasal y proyecciones axónicas al bulbo olfativo

El órgano vomeronasal tiene una estructura tubular alargada, con un lumen interno estrecho y se encuentra en el septum nasal, estando conectado con la cavidad nasal por un conducto estrecho. Las neuronas sensoriales del órgano vomeronasal están situadas en forma de media luna, rodeando el lumen. Cerrando la estructura de modo longitudinal se encuentra una amplia vascularización sanguínea (Figura 5). El órgano sensorial está protegido por una cápsula ósea y cartilaginosa. Esta estructura impide la llegada directa del aire con los diferentes estímulos a las neuronas vomeronasales, al contrario de lo que ocurre con el epitelio olfativo principal. Por lo tanto, la llegada de los estímulos mediados por sustancias no volátiles a las neuronas vomeronasales requiere de un contacto directo y un mayor aporte sanguíneo, lo que no es necesario cuando se trata de sustancias volátiles.

Las dos familias de receptores de feromonas, V1R y V2R tienen diferente localización en el epitelio sensorial. Las neuronas que contienen los receptores V1R se localizan en la zona apical y las que contienen los V2R en la zona basal, ambas neuronas son bipolares (Figura 5). Mediante técnicas de hibridación *in situ* y construcciones de diversos genes aislados, los grupos de Linda Buck y Catherine Dulac demostraron que cada neurona expresa un mensajero diferente (8, 15). La prolongación sensorial que da al lumen tiene forma de borla con cilios, que es donde se encuentran los receptores específicos y la maquinaria necesaria para la transducción primaria de la señal, que de hecho pueden emplearse como marcadores celulares. La prolongación axónica transmite la señal hasta una zona específica del bulbo olfativo denominada bulbo olfativo auxiliar. Para estudiar el camino seguido por los axones fueron necesarias construcciones que permitieran visualizar el recorrido axonal y los resultados fueron diferentes a los obtenidos con las neuronas del epitelio olfativo principal, en el cual las neuronas, expresando el mismo recep-

tor, agrupan sus axones en haces hasta alcanzar un glomérulo específico donde conectan con una célula mitral que hace de colectora de múltiples neuronas sensoriales (16, 17).

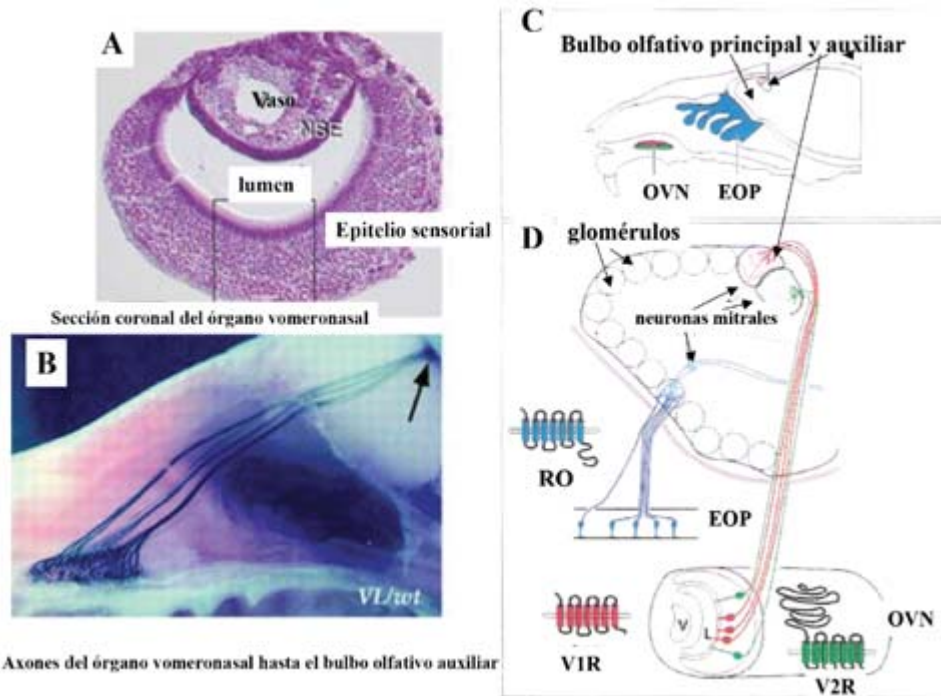


FIGURA 5. *Localización del órgano vomeronasal y morfología.*

Por el contrario, los axones procedentes del órgano vomeronasal son más largos y no se agrupan en función de la especificidad del receptor que expresan, viajando solitarios hasta alcanzar la zona específica del bulbo olfativo auxiliar. Es de destacar que al establecer las sinapsis con las células mitrales no forman glomérulos, aunque las terminales procedentes de neuronas sensoriales idénticas suelen formar sinapsis con dendritas de la misma célula mitral. Desde el bulbo olfativo auxiliar, las células mitrales envían los axones hacia el núcleo basal de la *estría terminalis* y posteriormente al núcleo basal del tracto olfativo accesorio, la amígdala medial y el núcleo posteromedial de la amígdala, que pertenecen al sistema de recompensa del cerebro, el sistema límbico (Figura 6) (18).

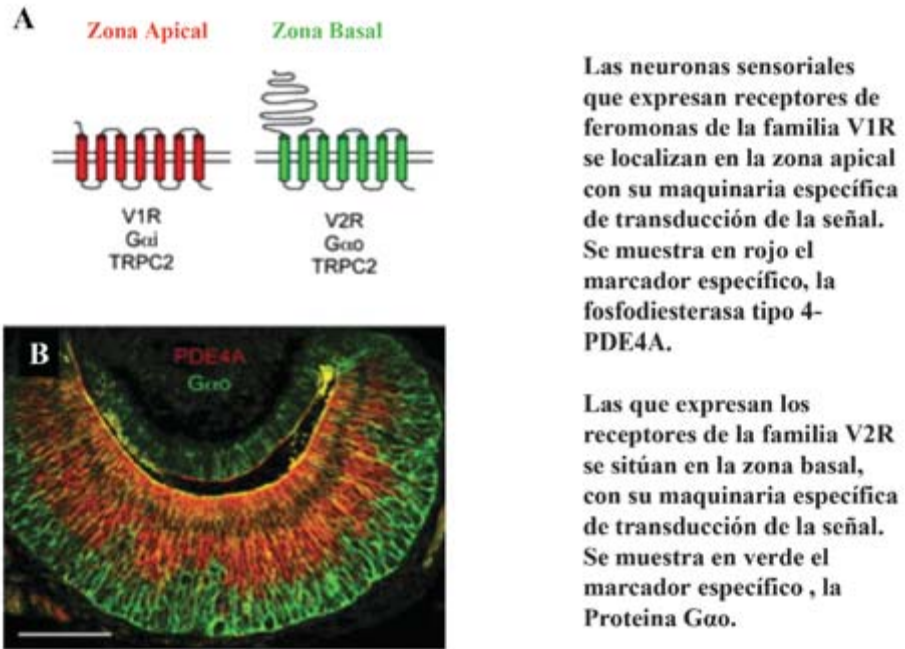


FIGURA 6. *Distribución de los dos tipos de receptores de feromonas en el órgano vomeronasal. A. Tipos de receptores y proteínas G acopladas específicamente. B. Localización de las dos familias de receptores V1R y V2R en una sección del órgano vomeronasal.*

3. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE FEROMONAS. ¿CÓMO SE GENERA EL POTENCIAL DE ACCIÓN EN LAS NEURONAS SENSORIALES?

La transducción de la señal generada por activación de los receptores de feromonas resultó ser muy diferente de la de los receptores olfativos presentes en el epitelio olfativo principal. Los receptores olfativos están acoplados a proteínas G olfativas, $G\alpha_{olf}$, que activan el enzima adenilato ciclasa, específica de este tejido, y formación de AMPc, lo que produce la apertura posterior de canales sensibles a este nucleótido, siendo este mecanismo común para todos los receptores olfativos.

En el órgano vomeronasal los diferentes receptores V1R y V2R están acoplados a diferentes proteínas G, aunque al final son coincidentes en la apertura de un canal, el TRPC2, que permite la entrada de cationes ocasionando la despolarización de la membrana y el inicio del potencial de acción (Figura 7) (19).

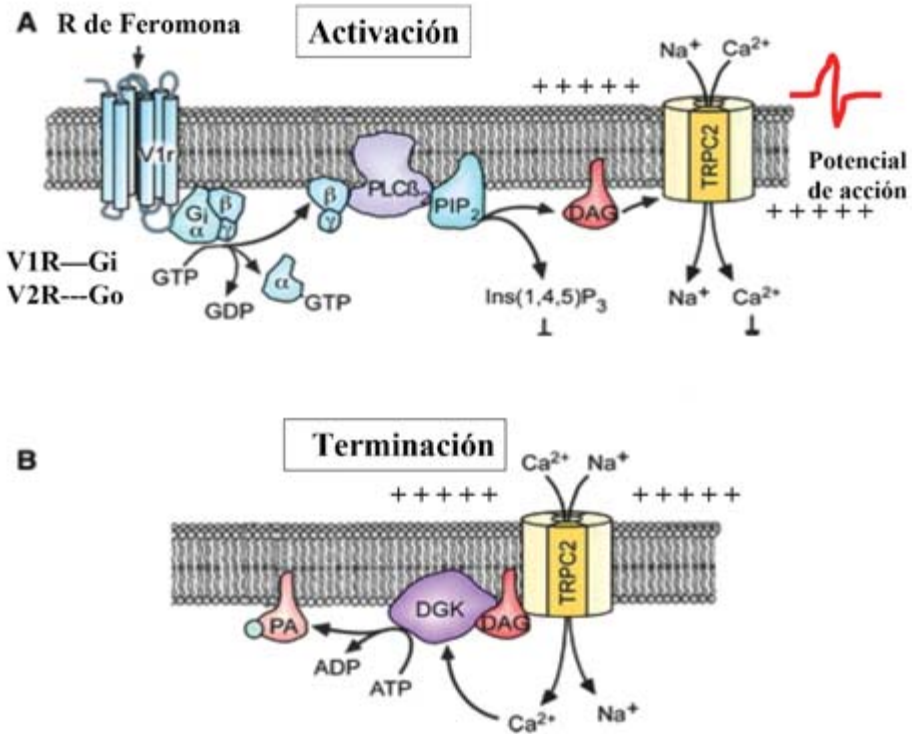


FIGURA 7. **Mecanismos de transducción de los receptores de feromonas.** **A.** Los receptores V1R y acoplados a Gi, y los V2R acoplados a Go, inducen el intercambio de nucleótidos en sus respectivas proteínas G acopladas. Se intercambia entonces el nucleótido GDP por el GTP en las subunidades α_i o α_o , respectivamente, y liberando las subunidades $\beta\gamma$ que se mueven en el plano de la membrana plasmática y activan alostéricamente la fosfolipasa C β , PLC β , el diacilglicerol (DAG), producto de este enzima es el activador alostérico del canal TRPC2, que permite el paso de cationes Ca²⁺ y Na⁺, iniciando la despolarización de la membrana y el potencial de acción. **B.** La estimulación finaliza por separación de la feromona del receptor específico y eliminación del diacilglicerol mediante un enzima, la diacilglicerol quinasa (DGK), que forma ácido fosfatídico (PA), reciclando así todos los elementos implicados en la respuesta y produciéndose el cierre del canal, el TRPC2.

Los receptores V1R, al ser activados por la unión de una feromona específica interaccionan con una proteína Gi heterotrimérica, permitiendo la interacción de ésta con GTP y la separación de las subunidades α_i de las $\beta\gamma$.

Los receptores V2R, al ser activados interaccionan con una proteína Go heterotrimérica, permitiendo el intercambio del nucleótido GDP por el GTP y la separación de las subunidades α_0 de las $\beta\gamma$.

Sea cual fuere el receptor activado y el subtipo de neurona del órgano vomeronasal, van a ser las subunidades $\beta\gamma$ las que van a mediar en la cascada de señalización, que es común para todas las células de este epitelio sensorial. Estas subunidades activan el enzima de la membrana plasmática denominada fosfolipasa C tipo β_2 , PLC β_2 . Este enzima hidroliza el fosfatidil inositol bisfosfato, PIP $_2$, sustrato localizado en la cara interna de la membrana plasmática, formándose dos productos de la hidrólisis, el diacilglicerol, DAG, y el inositol trifosfato, Ins(1,4,5)P $_3$. Estos productos son importantes segundos mensajeros en las cascadas de señalización. El inositol trifosfato induce la movilización del calcio intracelular, y salida de los reservorios del retículo endoplasmático. Por su parte, el diacilglicerol, DAG, al unirse a los canales de tipo TRPC2, localizados en la membrana plasmática de la célula sensorial, los abre facilitando el paso de los cationes Na $^+$ y Ca $^{2+}$, lo que produce la despolarización de la membrana y el inicio del potencial de acción, que se propaga por la presencia de canales de Na $^+$ y Ca $^{2+}$ sensibles a voltaje.

La señalización finaliza mediante un enzima denominada diacilglicerol quinasa, DGK, que transforma el diacilglicerol en su producto fosforilado, el ácido fosfatídico, PA, con la participación del ATP (Figura 7) (20).

4. FAMILIA DE CANALES TRP. CANALES TRPC2, SU IMPORTANCIA EN EL ÓRGANO VOMERONASAL. ASPECTOS EVOLUTIVOS

Los canales TRP, se denominan así por las siglas inglesas que definen sus propiedades (Transient Receptor Potencial). El descubrimiento de que uno de ellos, el TRPC2, estaba implicado en la trans-

ducción de la señal de feromonas en mamíferos se debe a Emily Liman, David Corey y Catherine Dulac, quienes lo postularon como candidato en una publicación de 1999 (21). Este canal pertenece a una amplia familia con múltiples funciones en el sistema nervioso y es interesante conocer algunos aspectos generales de estructura y función de esta superfamilia.

4A. Aspectos generales de los canales TRP

La captación de estímulos somatosensoriales que nos informan de situaciones peligrosas es el modo de mantener nuestra integridad física. La detección de estímulos dolorosos traumáticos, del exceso de calor, o incluso del frío, tienen en común elementos similares que son canales de la superfamilia TRP. El descubrimiento de estos canales se debe fundamentalmente al trabajo pionero del grupo de David Julius en California (22, 23). La familia de proteínas TRP fue primero descubierta en la mosca del vinagre, *Drosophila*, como tantas otras con funciones esenciales en mamíferos.

La familia de los canales TRP está formada por más de veinte productos génicos diferentes, agrupados en seis familias en base a su homología de secuencia: TRPC, TRPV, TRPP, TRPM, TRPN y mucolipinas.

El clonaje del primer receptor TRPV, conocido como TRPV1 o receptor de vanilloides, supuso un punto de inflexión en el conocimiento de los mecanismos que participan en la captación de estímulos nociceptivos, en este caso relacionados con el calor o acidificación del medio externo, y que pueden ser sensibilizados durante las situaciones inflamatorias, la existencia de estos receptores permitió explicar la sensación de calor debida al consumo de pimientos picantes, *Capsicum annuum*, ya que la capsaicina, sustancia responsable de esta sensación, se une al receptor de vanilloides en su cara interna. La familia TRPV contiene en la actualidad seis genes, todos ellos son proteínas con seis hélices transmembranares, que se asocian formando un tetrámero con un poro que permite el paso de cationes, fundamentalmente Ca^{2+} y Na^+ . Los miembros de la familia tienen umbrales de sensibilidad al calor diferentes, por ejemplo, el TRPV3 se activa con el calor nocivo, cuando se exceden los 53° C.

Por su importancia en la generación de la sensación dolorosa, los canales TRPV son una diana farmacológica importante en la actualidad (24).

Una pequeña pincelada de la familia TRPM nos permite descubrir que entre sus miembros están los canales responsables de la sensación de frío con las bajas temperaturas y también que sustancias químicas como el mentol producen sensación de frescor al actuar sobre un receptor de esta familia, el TRPM8.

La familia de canales TRPC tiene siete miembros con funciones y regulación muy diversa, actuando como canales que se abren para rellenar los reservorios de calcio intracelular, aunque otros parecen mediar respuestas como los canales operados por ligando. Tienen una amplia distribución y en muchas células están asociados a las caveolas, donde se organiza la respuesta celular a señales hormonales y locales. El canal TRPC2, por su relevancia en la transducción de la señal de feromonas, será analizado en el próximo epígrafe.

4B. Importancia del canal TRPC2 en el órgano vomeronasal de mamíferos. Aspectos evolutivos del canal TRPC2 en los primates

El TRPC2 fue clonado en primer lugar en *Drosophila* y después se clonaron los genes ortólogos de humano, ratón, rata y bovino (21, 25). Es el gen que tiene menor homología de secuencia con todos los otros TRPC. Los análisis de la secuencia indican que la proteína tiene seis hélices transmembranares y extensos dominios en el amino y carboxilo terminal de la proteína, que son zonas de regulación e interacción con el citoesqueleto. Entre las hélices 5 y 6 se encuentra la secuencia de aminoácidos que se postula como formadora del poro que permite el paso de cationes Ca^{2+} y Na^+ . El canal funcional requiere la asociación de cuatro subunidades y la activación requiere la interacción con el diacilglicerol, que se comporta como un ligando alostérico. La entrada de los cationes Ca^{2+} y Na^+ despolariza la membrana originando un potencial de acción que se propaga desde el extremo sensorial de la neurona, ya que estos canales están exclusivamente localizados en los cilios del extremo sensorial (Figura 8).

Para investigar el papel desempeñado por los canales TRPC2 en la señalización de feromonas, dos laboratorios de modo independiente generaron ratones knock-out TRPC2^{-/-} (26, 27). En estos animales, genéticamente modificados, se analizaron las respuestas electrofisiológicas a diferentes compuestos de naturaleza feromona presentes en la orina y se demostró que no eran capaces de generar respuesta alguna. La presencia de los canales TRPC2 en los espermatozoides planteaba la pregunta de si eran necesarios para la reacción acrosomal, pero no parece haber diferencias respecto a la fertilidad entre el ratón silvestre y el knock-out.

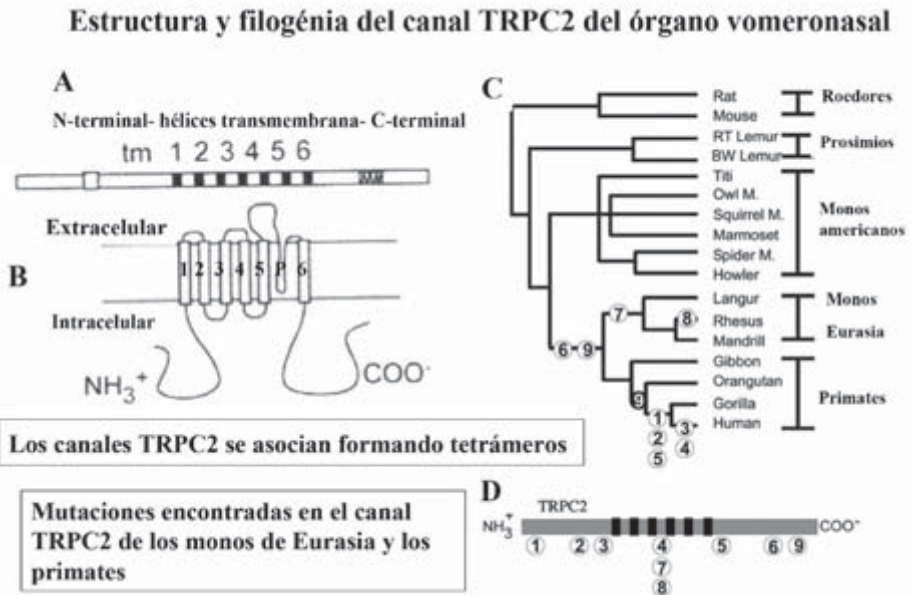


FIGURA 8. *El canal TRPC2 y proteínas análogas.* **A** y **B.** Esquema del canal TRPC2, se muestran los seis segmentos transmembranares y la porción entre las hélices 5 y 6 que forma el poro del canal. Los dominios amino y carboxi terminal de la proteína son citoplasmáticos. Se requieren cuatro subunidades para formar el canal activo. **C.** Dendrograma mostrando la filogenia del canal TRPC2 en mamíferos, según analogía de secuencia. **D.** Los números indicados en C, se corresponden con las zonas mutadas o truncadas en la secuencia proteica del canal TRPC2. Todas estas mutaciones originan proteínas carentes de función. Esta es la razón por la cual el órgano vomeronasal ha dejado de ser funcional en un antepasado común de los monos de Eurasia y los primates.

Sin embargo los ratones knock-out son un excelente modelo para comprender los efectos sociales de la captación de feromonas. Los primeros ratones TRPC2^{-/-}, mostraban una reducida respuesta electrofisiológica a la señal de feromonas. En los estudios comportamentales ligados a la supervivencia de la especie, los machos son menos vigorosos y están menos interesados en el apareamiento, son además más dóciles y no inician las peleas agresivas entre machos, que son el origen del rango dominante dentro del grupo. Las hembras TRPC2^{-/-} son menos cuidadosas de su camada, muestran menos interés maternal y menor agresividad en la defensa de su prole frente a los machos intrusos (25, 26, 27).

ASPECTOS EVOLUTIVOS DEL GEN TRPC2, EL CASO PARTICULAR DE LOS PRIMATES

El TRPC2 es el elemento esencial para la transducción de todas las señales de feromonas, pues es el elemento en donde convergen todas las señales del órgano vomeronasal y se origina el potencial eléctrico que irá al bulbo olfativo auxiliar. La pérdida de función de este canal podría servir como marcador de la pérdida de función del órgano vomeronasal. Este razonamiento sirvió de partida para un estudio sistemático de la secuencia de este gen en diferentes mamíferos y sobre todo en los primates (28, 29). Los estudios demostraron que en roedores, rata y ratón el gen TRPC2 era plenamente funcional y eran filogenéticamente próximos entre sí. En los prosimios, como los lémures de Madagascar, también existían genes plenamente funcionales, y lo mismo ocurría en los monos del nuevo mundo, titis, mono aullador, mono araña, etc. Las variaciones aparecieron en los monos del viejo mundo, África y Asia, como el mono *Rhesus*, el mandril, etc. Una situación similar ocurre en los grandes monos, el gibón, el orangután y el gorila, en los cuales tampoco existe un gen TRPC2 completo funcional.

¿Cómo se encuentra el gen TRPC2 en los humanos? Esta pregunta fue la primera y más ampliamente estudiada. El gen TRPC2 en humanos tienen una única copia, se encuentre en el cromosoma 11 (11p15.5), contiene 13 exones y muestra un 85% de homología con el de ratón. Un estudio sistemático de este gen mostró que en los

humanos este gen no es funcional y acumula un gran número de mutaciones, de las cuales seis son deletéreas, ya que dan lugar a un codón de terminación, es por lo tanto un pseudogen originando formas truncadas de la proteína. Los estudios de filogenia demostraron que la primera mutación en el antepasado común de todos los monos del viejo mundo y los grandes monos fue la mutación de parada próxima al carboxilo terminal, lo que originó una proteína más corta y carente de función (29).

El hecho de que en los monos del nuevo mundo este gen sea funcional, se relaciona con la separación de los continentes hace unos 40 millones de años. Solamente el antepasado común de monos y primates del viejo mundo sufrió las mutaciones iniciales que llevaron a una pérdida total de la función del gen. Queda por descubrir la razón evolutiva por la que esta pérdida y atrofia del órgano vomeronasal no supuso la extinción de la especie. Posibles explicaciones son, entre otras, que la aparición del tercer fotorpigmento visual en los primates y monos del viejo mundo pudo compensar la pérdida en la captación de feromonas. Otra posibilidad es la que veremos en el siguiente apartado y supone que el sistema olfativo principal podría servir para captar feromonas y señales de un modo más complejo y elaborado.

5. UNA VUELTA DE TUERCA: EL BULBO OLFATIVO Y LA CAPTACIÓN DE FEROMONAS

En los epígrafes anteriores poníamos de manifiesto la relevancia del órgano vomeronasal en la detección de feromonas por parte de algunos mamíferos, pero el hecho de que en los primates no exista esta vía y que en otros mamíferos esté muy limitada, e incluso que los conejos privados del órgano vomeronasal pudieran reconocer el olor y guiarse hasta el pezón materno para su lactancia, hacía pensar a muchos investigadores que la visión del bulbo olfativo respecto a la detección de feromonas era demasiado restrictiva.

Una primera evidencia de las posibles implicaciones de la vía olfatoria principal, en respuesta a feromonas, se descubrió estudiando respuestas a componentes de la orina de ratón (a). La mayoría de los mamíferos pueden reconocer a otros a partir del olor de las se-

creciones corporales, como el sudor. Para muchos animales, la orina es una fuente de información sobre la identidad y sexo de otro individuo. La naturaleza química de estas señales, y de cómo son procesadas y representadas en el cerebro es poco conocida. Recientemente, el análisis de la actividad de células nerviosas individuales en el bulbo olfativo del cerebro de ratón ha permitido detectar una región cuyas células responden solamente a un compuesto presente en la orina del macho. Este compuesto ha sido identificado como (metiltio)metanotiol. Este compuesto, el cual a los humanos les huele a ajo, es más volátil que otras feromonas y puede indicar si la orina es fresca (30). Este descubrimiento amplió las posibilidades de señalización de las feromonas, al poder activar receptores que se encuentran en el bulbo olfativo principal y de ahí a las células mitrales, sin activar receptores del órgano vomeronasal.

Esta función del sistema olfativo principal se ha visto confirmada y ampliada recientemente para muchas otras moléculas con función feromona y permitiría explicar la captación de feromonas por los primates, incluido el hombre, cuyo órgano vomeronasal es solamente un vestigio, y carece de conexión funcional.

La confirmación fuera de toda duda de que el sistema olfativo principal está implicado en la captación de feromonas por los primates se debe a los grupos de Linda Buck y Catherine Dulac. De nuevo haciendo uso de metodología poderosa, diseñaron modelos de estudio que permitieran analizar el papel del sistema olfativo principal en la captación de feromonas (31, 32, 33).

El punto de partida fue la zona cerebral de mamíferos donde se controla el apareamiento y el comportamiento reproductivo, que son las neuronas hipotalámicas, verdadero centro endocrino cerebral. Estas neuronas secretan la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), conocida también con el nombre de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Este sistema hipotálamo hipofisario controla la función gonadal y ovárica. Ambos grupos pensaron que las conexiones aferentes a esas neuronas hipotalámicas deberían de proceder de señales relacionadas con feromonas en su etapa más inicial y por lo tanto si seguían de modo retroactivo las conexiones podrían conocer su origen primigenio sensorial. Para demostrar esta hipótesis los abordajes experimentales fueron muy elegantes.

Circuitos cerebrales de la señalización por feromonas.

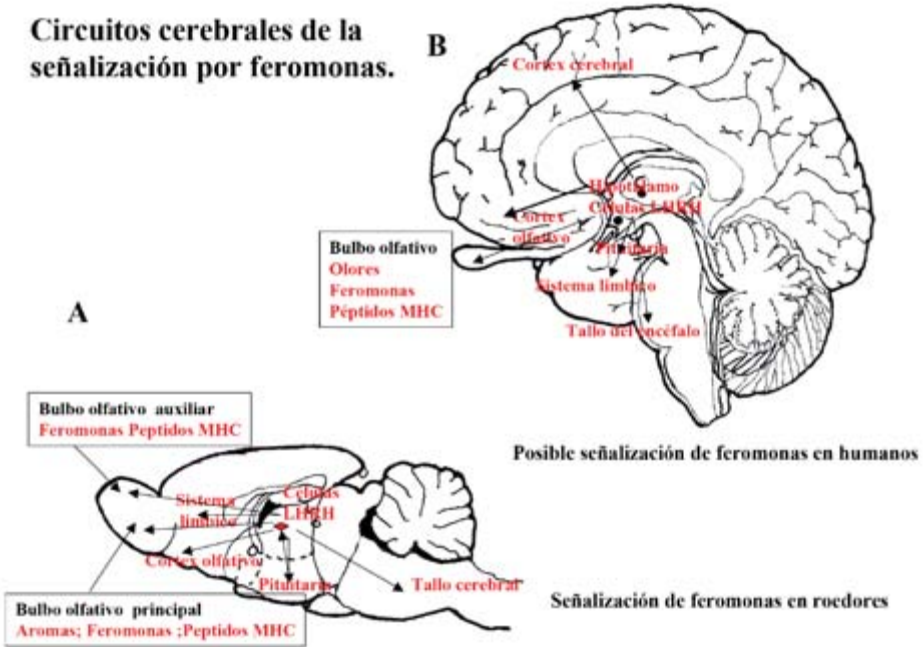


FIGURA 9. **Circuitos cerebrales para la señalización mediante feromonas.**
A. Corte sagital de cerebro de ratón mostrando las conexiones entre las neuronas hipotalámicas, que contienen LHRH y otras áreas cerebrales. **B.** Posibles conexiones del hipotálamo humano, cerebro neuroendocrino, con el córtex olfativo, bulbo olfativo y otras áreas. Recordar que en humanos y primates el órgano vomeronasal es solamente un vestigio no funcional.

El primer modelo experimental del grupo de Dulac (32) utilizó un virus fluorescente que solamente es transportado de modo retroactivo axonal en las sinapsis donde es captado y permite trazar su rastro hasta el principio de la vía sensorial si la infección viral se deja proseguir durante bastante tiempo. El virus fue inyectado en el hipotálamo de ratones, de modo que solamente fuera captado por las neuronas que contenían LH-RH. Las primeras células marcadas fueron hipotalámicas, como esperado, pero posteriormente se marcaron de modo fluorescente otras áreas cerebrales, indicando una compleja trama conteniendo las regiones olfativas principales y las somatosensoriales. En las regiones olfativas se marcaban el córtex olfativo, el bulbo olfativo principal e incluso ¡el epitelio olfativo principal!, pero no se vio ningún marcaje en el bulbo olfativo accesorio

o el órgano vomeronasal. Se demostró de este modo que es el epitelio olfativo principal el más importante en el apareamiento, mientras que el órgano vomeronasal media en comportamientos más específicos de agresividad, lucha y defensa de la prole.

El segundo modelo experimental del grupo de Buck, realizó una aproximación diferente, modificaron genéticamente un ratón para que expresara una proteína de cebada, la lectina BL (barley lectin), que puede ser captada en ambas direcciones de la hendidura sináptica. El gen se situó en la zona próxima a la región promotora de la hormona LHRH y sometido a la misma regulación. De este modo las aproximadamente 800 neuronas hipotalámicas de ratón que expresan esta hormona también expresarán la lectina de cebada, que puede ser fácilmente identificada. La distribución de esta proteína en el sistema nervioso mostró que el hipotálamo recibe conexiones, tanto del bulbo olfativo auxiliar procedente del órgano vomeronasal, como del bulbo olfativo principal procedente del epitelio olfativo principal. Las 800 neuronas hipotalámicas eran capaces de conectar con al menos 50.000 neuronas, situadas en 53 áreas cerebrales diferentes, incluyendo el córtex olfativo y mostrando en algunas áreas un acusado dimorfismo sexual (33).

Estos dos modelos ilustran claramente lo falso que resulta ajustarse a un único patrón, sin duda queda mucho por aprender sobre como las feromonas influyen la función neuroendocrina y como pueden influenciar aspectos de nuestro comportamiento, pero estos modelos sirvieron para confirmar que en los primates y humanos carentes del sistema de captación de feromonas por el órgano vomeronasal, la función podía ser realizada por el bulbo olfativo principal, existiendo amplias conexiones entre éste, el hipotálamo secretor, o cerebro endocrino, y otras áreas cognitivas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) DULAC, C. and AXEL, R. (1995): A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*. 83: 195-206.
- (2) BUTENANDT, V. A.; BECKMANN, R.; STAMM, D. and HECKER, E. (1959): *Z. Naturforsch.* 14: 283-284.
- (3) SAKURAI, T.; NAKAGAWA, T.; MITSUNO, H.; MORI, H.; ENDO, Y.; TANOUÉ, S.; YASUKOCHI, Y.; TOUHARA, K., and NISHIOKA, T. (2004): Identification and functional

- characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *PNAS*. 101: 16653-16658.
- (4) FLOWER, D. R. (1996): The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318: 1-14.
 - (5) BIANCHET, M. A.; BAINS, G.; PELOSI, P.; PEVSNER, J.; SNYDER, S. H.; MONACO, H. L. and AMZEL, L. M. (1996): The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat. Struct. Biol.* 11: 902-906.
 - (6) SPINELLI, S.; VINCENT, F.; PELOSI, P.; TEGONI, M. and CABBILLAU, C. (2002): Boar salivary lipocalin. Three-dimensional X-ray structure and androstenol/androstenone docking simulations. *Eur. J. Biochem.* 269: 2449-2456.
 - (7) BRENNAN, P. A. and KEVERNE, E. B. (2004): Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Current Biology*. 14: R81-R89.
 - (8) HERRADA, G. and DULAC, C. (1997): A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*. 90: 763-773.
 - (9) RODRÍGUEZ, I.; DEL PUNTA, K.; ROTHMAN, A.; ISHII, T. and MOMBAERTS, P. (2002): Multiple new and isolated families within the mouse superfamily of V1R vomeronasal receptors. *Nat. Neurosci.* 5: 134-140.
 - (10) YOUNG, J. M.; KAMBERE, M.; TRASK, B. J. and LANE, R. P. (2005): Divergent V1R repertoires in five species: Amplification in rodents, decimation in primates, and surprisingly small repertoire in dogs. *Genome Research*. 15: 231-240. (www.genome.org).
 - (11) TATSURA, H., NAGAO, H.; TAMADA, A.; SASAKI, S.; KOHRI, K. and MORI, K. (2001): Developing germ cells in Mouse testis Express pheromone receptors. *FEBS Letters*. 488: 139-144.
 - (12) YANG, H.; SHI, P.; ZHANG, Y. and ZHANG, J. (2005): Composition and evolution of the V2R vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. *Genomics* 86: 306-315.
 - (13) OLSON, R.; HUEY-TUBMAN, K. E.; DULAC, C. and BJORKMAN, P. J. (2005): Structure of a pheromone receptor-associated MHC molecule with an open and empty groove. *PLoS Biol* 3: 1436-1448.
 - (14) KIMOTO, H.; HAGA, S.; SATO, K. and TOUHARA, K. (2005): Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437: 898-901.
 - (15) BOEHM, U.; ZOU, Z. and BUCK, L. B. (2005): Feedback loops link odor and pheromone signalling with reproduction. *Cell*. 123: 683-695.
 - (16) RODRÍGUEZ, I.; FEINSTEIN, P. and MOMBAERTS, P. (1999): Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the Mouse vomeronasal system. *Cell*. 97: 199-208.
 - (17) MIRAS, M. T. (2005): Receptores olfativos, el perfume del éxito. *Anal. Real. Acad. Nac. Farm.* 71: 439-449.
 - (18) BELLUSCIO, L.; KOENTGES, G.; AXEL, R. and DULAC, C. (1999): A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell*. 97: 209-220.
 - (19) LEINDERS-ZUFALL, T.; BRENNAN, P.; WIDMAYER, P.; CHANDRAMANI, P. S.; MAULPAVICI, A.; JÄGER, M.; LI, X.-H.; BREE, H.; ZUFALL, F. and BOEHM, T. (2004):

- MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306: 1033-1037.
- (20) LUO, B.; REGIER, D. S.; PRESCOTT, S. M. and TOPHAM, M. K. (2004): Diacylglycerol kinases. *Cell Signal*. 16: 983-989.
 - (21) LIMAN, E. R.; COREY, D. P. and DULAC, C. (1999): TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signalling. *PNAS*. 96: 5791-5796.
 - (22) JULIUS, D. and BASBAUM, A. I. (2001): Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413: 203-210.
 - (23) CATERINA, M. J. and JULIUS, D. (2001): The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 487-517.
 - (24) FERRER-MONTIEL, A.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; MORENILLA-PALAO, C.; GARCÍA-SANZ, N.; FERNÁNDEZ-CARVAJAL, A.; FERNÁNDEZ-BALLESTER, G. and PLANELLAS-CASES, R. (2004): Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur. J. Biochem.* 271: 1820-1826.
 - (25) ZUFALL, F.; UKHANOV, K.; LUCAS, P. and LEINDERS-ZUFALL, T. (2005): Neurobiology of TRPC2: from gene to behaviour. *Eur. J. Physiol* 451: 61-71.
 - (26) LUCAS, P.; UKHANOV, K.; LEINDERS-ZUFALL, T. and ZUFALL, F. (2003): A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice. Mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40: 551-561.
 - (27) LEYPOLD, B. G.; YU, C. R.; LEINDERS-ZUFALL, T.; KIM, M. M.; ZUFALL, F. and AXEL, R. (2002): Altered sexual and social behaviours in *trp2* mutant mice. *PNAS*. 99: 6376-6381.
 - (28) FREICHEL, M.; VENNEKENS, R.; OLAUSSON, J.; STOLZ, J.; PHILIPP, S. E.; WEISSGERBER, P. and FLOCKERZI, V. (2005): Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J. Physiol.* 567: 59-66.
 - (29) LIMAN, E. and INNAN, H. (2003): Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *PNAS*. 100: 3328-3332.
 - (30) LIN, D. Y.; ZHANG, S.-H.; BLOCK, E. and KATZ, L. (2005): Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*. 434: 470-477.
 - (31) SHEPHERD, G. M. (2006): Smells, brains and hormones. *Nature*. 439: 149-151.
 - (32) YOON, H.; ENQUIST, L. W. and DULAC, C. (2005): Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell*. 123: 550-553.
 - (33) BOEHM, U.; ZOU, Z. and BUCK, L. B. (2005): Feedback loops link odor and pheromone signalling with reproduction. *Cell*. 123: 683-695.