



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA NEUROSCIENZE

Ciclo XXI

Settore/i scientifico-disciplinari di afferenza:

BIO/14 –FARMACOLOGIA

INTERAZIONE DOPAMINA-OSSITOCINA NEL CONTROLLO CENTRALE DELLA RISPOSTA ERETTILE

Presentata da: Dr. FABRIZIO SANNA

Coordinatore Dottorato: Prof. WALTER FRATTA

Relatore: Prof. ANTONIO ARGIOLAS

.....

Esame finale A.A. 2007/2008

INTRODUZIONE

Il comportamento sessuale è costituito da un insieme di attività messe in atto da tutti gli animali, incluso l'uomo (Meisel & Sachs, 1994; Argiolas & Melis, 1995; Hull *et al.*, 2002), ed ha come scopo ultimo la riproduzione della specie. Nel contesto dell'ampia gamma di aspetti che caratterizzano la varie fasi del comportamento sessuale, l'erezione peniena svolge un ruolo determinante per quanto riguarda il comportamento sessuale maschile. E' comunemente accettato che l'erezione peniena è il risultato di una complessa interazione fra il Sistema Nervoso Centrale e Periferico che induce modificazioni muscolari, vascolari ed emodinamiche a livello dei tessuti erettili dell'apparato genitale maschile. Queste modificazioni, generalmente, avvengono quando stimoli sessuali di varia natura (visivi, olfattivi, tattili, nell'uomo anche solo immaginativi) giungono al Sistema Nervoso Centrale attivando una serie di vie neuronali che dal cervello proiettano attraverso il midollo allungato, il midollo spinale e il Sistema Nervoso Autonomo sino ai tessuti erettili penieni. Episodi di erezione peniena possono verificarsi in diversi contesti, anche non direttamente relati all'attività sessuale o riproduttiva, per esempio durante il sonno REM, durante la manipolazione dei genitali, dopo la somministrazione di farmaci specifici. L'erezione peniena è determinata dal rilasciamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi, che consente un maggiore afflusso di sangue dalle arterie peniene all'interno dei corpi cavernosi inducendo così la tumescenza. Questo, insieme a contrazioni riflesse dei muscoli ischiocavernoso e bulbospongioso localizzati alla base del pene, comprime le vene attraverso cui il sangue fuoriesce contro la tunica albuginea, attivando il cosiddetto meccanismo veno-occlusivo dell'erezione (vedi Meisel & Sachs, 1994; Argiolas & Melis, 1995; Mc Kenna, 2000; Giuliano & Rampin, 2000; Andersson, 2001; Argiolas, 2005 e bibliografia inclusa). Negli ultimi decenni lo studio della funzione erettile a livello centrale ha consentito l'identificazione di diverse aree cerebrali coinvolte nel controllo di quest'importante funzione riproduttiva. Queste includono: l'area preottica mediale, l'ipotalamo ed i suoi nuclei, in particolare il nucleo paraventricolare (PVN), l'ippocampo, il midollo allungato ed il midollo spinale (Meisel & Sachs, 1994; Argiolas & Melis, 1995; Mc Kenna, 2000; Giuliano & Rampin, 2000). In queste aree sono stati identificati diversi neurotransmettori e neuropeptidi che agiscono influenzando l'erezione peniena. Tra questi, i più conosciuti sono la dopamina, gli aminoacidi eccitatori, l'ossido nitrico (NO), l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) ed i peptidi ad esso relati, e l'ossitocina, che facilitano la risposta erettile; i peptidi oppioidi, il GABA e la serotonina che invece inibiscono questa

risposta sessuale (Andersson, 2001; Melis & Argiolas, 2003; Argiolas & Melis, 2005). In particolare, a livello dell'ipotalamo, il PVN contiene i corpi cellulari di un gruppo di neuroni ossitocinergici che proiettano in diverse aree extra-ipotalamiche e nel midollo spinale, e diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che questi neuroni ossitocinergici, quando attivati, liberano ossitocina e facilitano la funzione erettile ed il comportamento copulatorio, mentre la loro inibizione determina una riduzione della funzione erettile e del comportamento sessuale (Argiolas & Melis, 1995, 2004, 2005; Melis & Argiolas, 2003).

La dopamina è, tra i neurotrasmettitori che attivano i neuroni ossitocinergici del PVN, uno dei più studiati per il suo ruolo nel comportamento sessuale e nella funzione erettile (Melis & Argiolas, 1995, 2003). Nell'ipotalamo, la dopamina è localizzata in terminazioni nervose di neuroni che appartengono a quello che viene definito sistema dopaminergico incerto-ipotalamico. Questi neuroni originano nei gruppi A13 ed A14 di cellule dopaminergiche di Dahlstrom & Fuxe (1964), arborizzano estesamente ed innervano diversi nuclei ipotalamici, quali l'area preottica mediale ed il PVN (vedi Lindvall *et al.*, 1984; Buijs *et al.*, 1984).

Gli studi sul ruolo della dopamina nel comportamento sessuale maschile sono iniziati già a partire dagli anni '70. Infatti, nel Dipartimento di Neuroscienze di Cagliari, allora Istituto di Farmacologia, fu dimostrato che la somministrazione di L-DOPA, precursore della dopamina, a ratti maschi adulti sessualmente potenti diminuiva sia la latenza alla prima monta, che il numero di monte e di intromissioni che precedono l'eiaculazione. La somministrazione di L-DOPA si è dimostrata efficace anche in quei ratti che mostravano scarsa attività sessuale, quando confrontata con quella dei maschi selezionati come potenti. Sempre nel Dipartimento di Neuroscienze, è stato dimostrato che la dopamina esercita il suo effetto facilitatorio sull'erezione peniena e sul comportamento sessuale agendo direttamente a livello del PVN. Infatti, studi di microiniezione hanno mostrato che agonisti dopaminergici della famiglia dei recettori D2, e in particolare del sottotipo D4, facilitano l'erezione peniena ed il comportamento sessuale quando iniettati in questa area cerebrale (Melis *et al.*, 1987, 1996, 2005; Eaton *et al.*, 1992; Brioni *et al.*, 2004; Bitner *et al.*, 2005), mentre studi di microdialisi intracerebrale hanno mostrato che la concentrazione di dopamina aumenta nel dializzato extracellulare ottenuto da quest'area cerebrale durante l'attività sessuale (erezioni senza-contatto; attività copulatoria) (Melis *et al.*, 1996; Melis & Argiolas, 1995, 2003; Hull *et al.*, 1995; Argiolas & Melis, 2005).

E' stato inoltre dimostrato che i farmaci dopamino-agonisti iniettati nel PVN facilitano l'erezione peniena ed il comportamento sessuale attivando la neurotrasmissione ossitocinergica centrale (Melis & Argiolas 1995, 2003; Argiolas & Melis 2004, 2005; Melis *et al.*, 2006). Il meccanismo responsabile dell'attivazione della trasmissione ossitocinergica è il seguente: nel PVN, la stimolazione dei recettori dopaminergici di tipo D2, e del sottotipo D4, situati con molta probabilità sul corpo cellulare dei neuroni ossitocinergici, causa un aumento dell'entrata di ioni Ca^{2+} nei corpi cellulari di questi neuroni. Gli ioni Ca^{2+} che entrano nel corpo cellulare dei neuroni ossitocinergici sono una condizione necessaria per l'attivazione della sintetasi dell'Ossido Nitrico (NOS), enzima Ca^{2+} -calmodulina dipendente, responsabile della produzione dell'Ossido Nitrico (NO), che a sua volta, con un meccanismo ancora sconosciuto, eccita i neuroni ossitocinergici, portando alla liberazione di ossitocina in aree extra-ipotalamiche e nel midollo spinale, inducendo così l'erezione peniena (Argiolas & Melis, 1995, 2004, 2005; Melis & Argiolas, 2003; Melis *et al.*, 2006).

Come ricordato prima, i meccanismi succitati coinvolti nel controllo centrale della funzione erettile a livello del PVN, risultano essere attivati sia in condizioni di stimolazione farmacologica che in contesti fisiologici, come ad esempio durante le erezioni senza-contatto feromone-indotte, che vengono osservate quando un ratto maschio sessualmente potente viene messo in presenza di una femmina recettiva ma inaccessibile (Sachs *et al.*, 1994; Melis *et al.*, 1998, 1999, 2003). Dal momento che le erezioni senza-contatto sono considerate una misura di attivazione (arousal) sessuale (un'importante componente della fase appetitiva del comportamento sessuale) (Sachs, 2000), i risultati succitati suggeriscono che la dopamina nel PVN potrebbe giocare un ruolo non solo nel controllo della funzione erettile (un'importante componente della fase consumatoria del comportamento sessuale), ma anche nella motivazione sessuale e nei meccanismi di rinforzo legati all'attività sessuale (Melis *et al.*, 2003), come ad esempio suggerito per la dopamina nell'area preottica mediale (Hull *et al.*, 1995).

Un'altra area nella quale studi di microdialisi hanno mostrato un aumento della neurotrasmissione dopaminergica durante l'attività sessuale è il nucleo accumbens (Pfaus & Everitt, 1995). Nella parte di questo nucleo denominata "shell" si trovano i terminali dei neuroni dopaminergici mesolimbici, i cui corpi cellulari si trovano in prevalenza nelle parti più caudali dell'area ventrale tegmentale (VTA). Questi neuroni sono ritenuti mediare gli effetti piacevoli e motivazionali dei rinforzi naturali, quali cibo e sesso, quindi potrebbero giocare un ruolo chiave nella motivazione sessuale e nel

rinforzo legato all'attività sessuale (Fibiger & Phillips, 1988; Everitt, 1990; Pfaus & Everitt, 1995; Liu *et al.*, 1998). L'attività dei neuroni dopaminergici mesolimbici è influenzata dall'attività della VTA, dell'ippocampo e/o dell'amigdala, e tutte queste aree ricevono proiezioni ossitocinergiche provenienti dal PVN (Sofroniew, 1983; Roeling *et al.*, 1993). Quindi, l'attivazione dei recettori dopaminergici nel PVN potrebbe causare non solo l'erezione peniena attraverso l'attivazione dei neuroni ossitocinergici che proiettano al midollo spinale, ma influenzare anche l'attività del sistema dopaminergico mesolimbico e quindi influire sui meccanismi alla base della motivazione sessuale.

Al fine di testare questa ipotesi, durante il mio Dottorato di Ricerca nella Sezione di Neuropsicobiologia del Dipartimento di Neuroscienze, ho studiato mediante l'utilizzo della microdialisi intracerebrale e di altre tecniche di indagine, 1) l'effetto di una dose proeretile di apomorfina, un classico agonista non selettivo dei recettori dopaminergici, iniettata nel PVN (vedi Melis & Argiolas, 1995, 2003; Melis *et al.*, 2005, 2006), sul rilascio di dopamina da parte dei neuroni dopaminergici mesolimbici nello "shell" del nucleo accumbens; 2) l'effetto dell'ossitocina iniettata nella VTA sull'erezione peniena e sulle concentrazioni di dopamina e DOPAC nello "shell" del nucleo accumbens e nel PVN; e, visto che l'ossitocina iniettata nella regione caudale della VTA è stata trovata capace di indurre erezione peniena, 3) ho studiato il meccanismo dell'effetto pro-eretile di questo neuropeptide quando iniettato nella VTA. In particolare, visto che la VTA è ricca di NO sintetasi e guanilato ciclasi (Jonhson & Ma, 1993; Kleibor *et al.*, 2004; Southam & Garthwaite, 1993; Shuman & Madison, 1994), è stato studiato il ruolo del sistema NO-GMP ciclico; ed infine, 4) è stata studiata la relazione fra fibre/assoni ossitocinergici-corpi cellulari dei neuroni dopaminergici mesolimbici, NO sintetasi e guanilato ciclasi nella VTA, attraverso l'utilizzo di saggi di immunostochimica verso l'ossitocina, la tirosina idrossilasi (TH), la NO sintetasi, e la guanilato ciclasi.

Nel loro insieme, i risultati di questo lavoro suggeriscono l'esistenza di un circuito neurale che connette il PVN con la VTA ed il nucleo accumbens al fine di controllare l'attività dei neuroni ossitocinergici paraventricolari che proiettano al midollo spinale e che mediano l'erezione peniena, e dei neuroni ossitocinergici paraventricolari che proiettano alla VTA e che controllano l'attività dei neuroni dopaminergici mesolimbici. Questo circuito neurale potrebbe giocare un ruolo chiave nell'integrazione delle attività neurali coinvolte nel controllo degli aspetti consumatori (erezione-eiaculazione) ed anticipatori (motivazione e rinforzo) del comportamento sessuale maschile in contesti fisiologici.

MATERIALI E METODI

Animali

In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati ratti maschi Sprague-Dawley (250-300gr, Charles River, Como, Italia). Gli animali sono stati stabulati in numero di 4-6 per gabbia, a temperatura di 24° C, umidità 60% , luce accesa dalle 7:00 alle 19:00, acqua e cibo ad libitum. Gli esperimenti sono stati eseguiti tra le 9:00 e le 13:00. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le linee guida della Comunità Europea del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) e la Legislazione Italiana (D.P.R. 166/92).

Farmaci e Peptidi

I composti raclopride, L-745,870 (3-[4-(4-clorofenilpiperazina-1-yl)-metil]-1H-pirrolo[2,3-b]piridina triclорidrato), ODQ, 8-bromo-GMP ciclico, sono stati acquistati dalla Tocris Cook (Bristol, UK); l' ω -conotossina GVIA, l'apomorfina HCl, la S-metil-L-tiocitrullina acetato (SMTC), l'aloiperidolo, l'emoglobina di ratto, sono stati acquistati dalla Sigma (S. Louis, MO, USA); l'ossitocina e la d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina dalla Bachem AG (CH). Tutti gli altri reagenti provengono da fonti disponibili in commercio.

Impianto mediante chirurgia stereotassica di cannule da microiniezione e/o da microdialisi

Le microiniezioni sono state eseguite attraverso l'impianto di una cannula guida di acciaio inossidabile (22 gauge) diretta al sito di interesse al fine di permettere la somministrazione dei farmaci con una cannula da microiniezione in un sito cerebrale specifico. La microdialisi è stata eseguita mediante l'impianto di una cannula da microdialisi al fine di permettere la raccolta del dializzato ottenuto da un sito cerebrale specifico. Le microiniezioni e la microdialisi nello stesso sito sono state eseguite attraverso l'impianto di una cannula da microdialisi accoppiata ad una cannula da microiniezione in silica capillare fusa che terminava adiacente alla membrana di dialisi (vedi Melis *et al.*, 1996). Quando necessario sono stati eseguiti impianti multipli sullo stesso animale, durante la stessa sessione di chirurgia, di cannule guida per microiniezione e/o cannule da microdialisi. Le cannule guida e/o le cannule da microdialisi sono state impiantate mediante chirurgia stereotassica (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) in anestesia totale (idrato di cloralio, 400 mg/kg) due/tre giorni prima degli esperimenti; ogni ratto è stato utilizzato una sola volta. Tutti gli impianti sono stati

eseguiti in accordo alle coordinate dell'Atlante Stereotassico di Pellegrino e Cushman, 1971 (PVN: AP= +0.2; L=-0.4; V= 7.3; NAs: AP= +3.2; L=-0.8; V= 7.0; VTAr: AP= -2.6; L=-1.4; V= 8.3; VTAc: AP= -3.0; L=-0.9; V= 8.8).

Microiniezioni e microdialisi: studi comportamentali

I ratti che sono stati impiantati solamente con cannula/e guida, sono stati posizionati singolarmente in gabbie di Plexiglas (30x30x30 cm). Dopo un periodo di adattamento di 30 minuti, il farmaco disciolto nel veicolo appropriato, o il solo veicolo (0.3µl), è stato somministrato nel sito di interesse attraverso l'utilizzo di una cannula da microiniezione collegata con un tubicino di polietilene ad una siringa Hamilton da 10µl guidata da una pompa da microinfusione Stoelting. La microiniezione dei farmaci è stata eseguita nell'arco di 2 minuti, e la cannula da microiniezione è stata lasciata nel sito per un altro minuto dopo la somministrazione al fine di permettere la diffusione ottimale del farmaco. Dopo il trattamento, gli animali sono stati osservati per 60 minuti durante i quali sono stati conteggiati gli episodi di erezione peniena. Quando è stato utilizzato un antagonista, questo è stato somministrato 15 minuti prima dell'agonista.

Negli esperimenti in cui è stata eseguita anche la microdialisi, la cannula da microdialisi è stata collegata attraverso un tubicino di polietilene ad una siringa Hamilton da 2500µl guidata da una pompa da microdialisi Stoelting 200. La cannula da microdialisi è stata perfusa con una soluzione Ringer (contenente: NaCl 147mM, KCl 3mM, CaCl₂ 1,2mM, pH 6.5), ad un flusso costante di 2,5µl/min. Dopo un periodo di adattamento di 2 ore, per equilibrare la soluzione di perfusione della cannula con il liquido extracellulare, il dializzato è stato raccolto ogni 15 minuti in aliquote da 37,5µl ciascuna. Dopo la raccolta di tre aliquote di dializzato, gli animali sono stati sottoposti al trattamento farmacologico assegnato (vedi sopra). Quindi, sono stati osservati per altri 75 minuti, durante i quali sono state raccolte altre 5 frazioni di dializzato da 37,5 µl, una ogni 15 minuti, e contemporaneamente sono stati conteggiati gli episodi di erezione peniena. In tutti gli esperimenti nei quali è stato utilizzato un antagonista, questa sostanza è stata disciolta nell'appropriato veicolo e somministrata 15 minuti prima dell'agonista.

Le erezioni peniene sono state conteggiate quando il pene emergeva dalla guaina peniena, il che è normalmente accompagnato da grooming penieno e flessione dei fianchi.

Determinazione della concentrazione di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens e nel dializzato del PVN

La concentrazione di dopamina e DOPAC è stata misurata nello stesso campione di dializzato (20 μ l) proveniente dallo “shell” del nucleo accumbens o dal nucleo paraventricolare mediante Cromatografia Liquida ad Alta Pressione (HPLC) (colonna 7.5x3.0 mm i.d., Supelcosil C18, 3- μ m p.s.) (Supelco, Supelchem, Milano, Italia) con un Electrochemical Detector ESA (Coulochem II, ESA, Cambridge, MA, USA) equipaggiato con Dual Cell 4011 (vedi Melis *et al.*, 2003). La rilevazione è stata eseguita in riduzione con potenziali settati tra +350 e -180 mV. La sensibilità del metodo è stata di 0.125 pg per la dopamina, e 0.1 pg per il DOPAC.

Determinazione dei NO_2^- e NO_3^- nel dializzato della VTA caudale

La produzione di NO è stata quantificata determinando la concentrazione dei suoi metaboliti (NO_2^- e NO_3^-) nel dializzato della VTA caudale. I NO_2^- sono stati determinati con la reazione di Griess (Melis *et al.*, 1996). Questa reazione porta alla formazione di un composto azoico che viene successivamente quantificato mediante Cromatografia Liquida ad Alta Pressione (HPLC) mediante rilevazione spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 546 nm. La sensibilità del metodo è stata di 0,1 μ M, e la risposta lineare con concentrazioni di NO_2^- sino a 25 μ M. Per la determinazione dei NO_3^- nel dializzato, questi sono stati precedentemente ridotti a NO_2^- con rame-cadmio, come precedentemente descritto (Melis *et al.*, 1996). I NO_2^- totali sono stati calcolati come già descritto ed il valore dei NO_3^- è stato calcolato per sottrazione dai NO_2^- presenti nel dializzato prima della riduzione rame-cadmio. La sensibilità del metodo è stata di 3 μ M, e la risposta lineare con concentrazioni di NO_3^- sino a 30 μ M.

Verifica Istologica

Alla fine degli esperimenti gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione ed i cervelli sono stati immediatamente rimossi e conservati in una soluzione acquosa al 2% di formalina per 10-12 giorni. Al fine di localizzare la posizione dell'estremità della cannula da microdialisi e/o della cannula da microiniezione, sono state preparate al criostato delle sezioni coronali dello spessore di 50 μ m, poi colorate con il Rosso Neutro ed analizzate con un microscopio a contrasto di fase. La posizione dell'estremità della cannula da microdialisi e/o da microiniezione è stata localizzata seguendo la traccia della

cannula attraverso una serie di sezioni consecutive del cervello. Solo gli animali trovati avere l'estremità della cannula da microdialisi e/o da microiniezione posizionata correttamente nel sito desiderato sono stati considerati per le analisi statistiche dei risultati.

Analisi Statistica

Per la valutazione statistica dei risultati degli esperimenti nei quali è stata condotta la microdialisi, sono state in primo luogo calcolate le aree sotto la curva (AUC) per ciascun ratto (numero di erezioni peniene e concentrazione di dopamina e DOPAC o NO_2^- e NO_3^- verso il tempo). Le AUC sono state quindi comparate statisticamente con l'ANOVA, seguita dal Mann-Whitney U-test o dal test di Tukey al fine di identificare le differenze significative fra i gruppi che hanno ricevuto un diverso trattamento farmacologico. Una $P < 0,025$ è stata considerata significativa. Per la valutazione statistica dei risultati degli esperimenti nei quali sono state eseguite solamente le microiniezioni attraverso le cannule guida, i dati ottenuti sono stati direttamente comparati per differenti trattamenti attraverso l'utilizzo dell'ANOVA a una via, seguita dal test di Tukey. Una $P < 0,025$ è stata considerata significativa (Statsoft, USA, 1994).

Microiontoforesi e immunoistochimica

Per la microiniezione tramite iontoforesi del tracciante retrogrado FluoroGold nello "shell" del nucleo accumbens, i ratti sono stati anestetizzati con idrato di cloralio (400 mg/kg, i.p.) e posizionati su un apparato stereotassico (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Per la iontoforesi del FluoroGold (Fluorochrome, 2% in soluzione fisiologica) sono state usate delle micropipette in vetro, posizionate nello "shell" del nucleo accumbens (10 μA , 5 s on, 5 s off, per 10 minuti). 5-7 giorni dopo l'iniezione del tracciante Fluorogold, gli animali sono stati anestetizzati profondamente e sottoposti a perfusione transcariaca con paraformaldeide (4%) in buffer fosfato 0.1M. Dopo una notte di lavaggio in soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS) (Fosfato: 0.01M; NaCl: 0.15M; pH 7.2-7.4) contenente saccarosio (7%) ed NaN_3 (0.02%), i campioni (cervelli prelevati) sono stati sistemati all'interno di appositi contenitori in foglio d'alluminio in un medium di congelamento (g/l: polivinile alcool, 80; polietilene glicole, 42.6; Tween-20, 10; NaN_3 , 0.5) (Cocco *et al.*, 2003), e congelati in freon liquido (raffreddato con azoto liquido). Le sezioni preparate al criostato (10-20 μm) sono state disposte su vetrini

rivestiti con L-polilisina e conservate in azoto liquido in fase gassosa all'interno di un apposito contenitore fino all'utilizzo.

Per l'immunoistochimica, le sezioni sono state portate a temperatura ambiente, lavate in Triton X-100 (1 ml/l in acqua distillata; 20 minuti), e trattate brevemente con avidina non coniugata, quindi con biotina (Vector, Burlingame, CA, USA). E' stata eseguita un'incubazione per tutta la notte con anticorpi primari, seguita da incubazione con anticorpi secondari coniugati con fluorocromi.

Il primo saggio è stato eseguito attraverso incubazione dei preparati istologici con anticorpi primari di coniglio-antiossitosina e/o topo-antitirosina idrossilasi (TH) (Chemicon International, Temecula, CA, USA, e Sigma, Milano, Italia, rispettivamente), seguita da incubazione con i rispettivi anticorpi secondari: IgG anti-coniglio coniugato con biotina e/o IgG anti-topo coniugato con cianina-2, o quando appropriato con cianina-3 coniugata con avidina (tutti da Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA).

Per il secondo saggio, sono state utilizzate sezioni seriali adiacenti alternate (5-8 μ m) per una doppia immunofluorescenza. È stata eseguita un'incubazione con anticorpi primari: (A) anticorpo di cavia anti-ossitosina (Abcam, Cambridge, UK) e anticorpo di coniglio anti NO-sintetasi neuronale (Abcam, Cambridge, UK); o (B) anticorpo di topo anti-TH (Sigma, Milano, Italia) e anticorpo di coniglio anti-guanilato ciclasi (Abcam, Cambridge, UK), seguita dall'incubazione nei rispettivi secondari: (A') IgG anti-cavia coniugato con cianina-3 e IgG anti-coniglio coniugato con cianina-2; o (B') IgG anti-topo coniugato con cianina-2 e IgG anti-coniglio coniugato con cianina-3 (tutti da Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). I preparati sono stati visualizzati attraverso l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza Olympus BX60, equipaggiato con una fotocamera digitale Fuji FinePix S3 Pro (Fujifilm, Milano, Italia) (vedi Cocco *et al.*, 2003).

Le analisi immunoistochimiche sono state condotte presso il Laboratorio di Neuroimmunoistochimica del Dipartimento di Citomorfologia dell'Università di Cagliari, in collaborazione con il Prof. GianLuca Ferri, responsabile del Laboratorio, e la Dr.ssa Cristina Cocco.

RISULTATI

Effetto dell'apomorfina iniettata nel PVN, ad una dose che induce erezione peniena, sulle concentrazioni extracellulari di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens

Nelle condizioni sperimentali usate in questo studio, la quantità di dopamina e DOPAC nel dializzato ottenuto dal nucleo accumbens di ratti maschi trovati avere l'estremità della cannula da microiniezione posizionata correttamente nel PVN è stata di 2.3 ± 0.4 pg di dopamina e 15.2 ± 2.5 pg di DOPAC in un volume di 20 μ l di dializzato, valori corrispondenti ad una concentrazione di 0.6 nM per la dopamina e 4.5 nM per il DOPAC (Figura 1). I valori riportati sono stati trovati nel dializzato proveniente dal nucleo accumbens dopo un periodo di perfusione di almeno 2 ore, al fine di equilibrare la soluzione di perfusione con il liquido extracellulare. Dato che il recupero della dopamina e del DOPAC che passa attraverso la cannula da microdialisi può essere stimato approssimativamente di circa 20% e 19%, rispettivamente, le concentrazioni di dopamina e DOPAC nel fluido extracellulare del nucleo accumbens possono essere stimate intorno a valori di 2.5 nM e di 24 nM, rispettivamente. Questi valori sono simili a quelli trovati da altri autori (Imperato *et al.*, 1988; Pfaus & Everitt, 1995, e bibliografia inclusa).

L'apomorfina (0.1 μ g) iniettata nel PVN ha indotto degli episodi di erezione peniena come atteso (Melis *et al.*, 1987, 1996, 2006). Questi episodi si sono verificati contemporaneamente ad un aumento nelle concentrazioni extracellulari di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens. Tale aumento è stato rilevato già 15 minuti dopo il trattamento ed ha avuto una durata di circa 45 minuti. In breve, l'apomorfina ha aumentato gli episodi di erezione peniena da 0.31 ± 0.02 a 4.5 ± 0.32 e la dopamina e il DOPAC da 2.3 ± 0.4 a 4.8 ± 0.8 e da 15.4 ± 1.4 a 21.3 ± 1.6 , rispettivamente. In accordo con ciò, le AUC dell'apomorfina per le erezioni peniene, la dopamina, ed il DOPAC, sono significativamente più alte rispetto a quelle degli animali trattati con il solo veicolo (controlli) ($P < 0.01$) (Figura 1).

Effetto del raclopride e del L-745,870 sulle erezioni peniene, e sul concomitante aumento di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens, indotte dall'apomorfina

Il raclopride (1 µg), un antagonista selettivo dei recettori dopaminergici D2 e D3, ha ridotto dell'80% l'aumento degli episodi di erezione peniene, e delle concentrazioni di dopamina e di DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens, indotto dall'apomorfina (0.1 µg), quando iniettato nel PVN 15 minuti prima dell'agonista dei recettori dopaminergici (Figura 2). Invece, è stata trovata una riduzione di solo il 40-45% degli effetti dell'apomorfina, quando è stato somministrato l'L-745,870 (1 µg), un antagonista selettivo dei recettori dopaminergici D4, somministrato nel PVN 15 minuti prima dell'apomorfina (Figura 2). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con raclopride+apomorfina o L-745,870+apomorfina sono più basse per le erezioni peniene, e per la dopamina ed il DOPAC, rispetto a quelle dei ratti trattati con apomorfina ($P < 0.01$); comunque, le AUC dei ratti trattati con L-745,870+apomorfina sono più alte rispetto a quelle dei ratti trattati con raclopride+apomorfina ($P < 0.01$). Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di raclopride o di L-745,870 nel PVN non modifica di per sé le erezioni peniene, né le concentrazioni di dopamina e di DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens (Figura 2).

Effetto della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ sulle erezioni peniene, e sul concomitante aumento di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens, indotte dall' apomorfina

La $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (1 µg) ha ridotto di più dell'80% l'aumento delle erezioni peniene e delle concentrazioni di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens indotto dall'apomorfina (0.1 µg), quando iniettata I.C.V. 15 minuti prima dell'agonista dopaminergico nel PVN ($P < 0.01$)(Figura 3). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ I.C.V.+apomorfina nel PVN per le erezioni peniene, e le concentrazioni di dopamina e DOPAC, sono significativamente più basse rispetto a quelle dei ratti trattati con veicolo I.C.V.+apomorfina nel PVN ($P < 0.01$). Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ I.C.V. non modifica di per sé le erezioni peniene, né le concentrazioni di dopamina e di DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens (Figura 3).

Effetto dell'iniezione di ossitocina nella VTA rostrale o caudale sull'erezione peniena: curve dose-risposta ed effetto della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$

Come mostrato in Figura 4, l'ossitocina (20, 40, 60, 80, e 100 ng) microiniettata nella VTA caudale, ma non in quella rostrale, induce episodi di erezione peniena, che iniziano all'incirca 25-30 minuti dopo il trattamento, sono presenti per all'incirca 30-40 minuti e scompaiono approssimativamente dopo 60 minuti dal trattamento. La curva dose-risposta segue un andamento "a campana" (U rovesciata): la dose minima efficace è stata 40 ng, che ha aumentato il numero di episodi di erezione peniena da 0.4 ± 0.22 a 1.2 ± 0.33 ($P < 0.01$), mentre la dose più efficace è stata 80 ng, che ha aumentato il numero di episodi di erezione peniena da 0.4 ± 0.22 a 2.85 ± 0.31 ($P < 0.001$). Una dose più alta (100 ng) è risultata inefficace ($P > 0.1$). La $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (1 μg), iniettata nella VTA caudale 15 minuti prima dell'ossitocina, ha abolito quasi completamente le erezioni peniene indotte dall'ossitocina. Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ nella VTA caudale non modifica di per sé le erezioni peniene (Figura 4).

Effetto della microiniezione di aloperidolo, un antagonista dei recettori D2, nel nucleo accumbens o nel PVN, sulle erezioni peniene indotte dalla somministrazione di ossitocina nella VTA caudale

L'aloiperidolo (1 μg) iniettato nello "shell" del nucleo accumbens (Figura 5), o nel PVN (Figura 6), 15 minuti prima dell'iniezione dell'ossitocina (80 ng) nella VTA caudale, ha ridotto quasi completamente gli episodi di erezione peniena indotti dall'ossitocina ($P < 0.01$). Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di aloiperidolo nel nucleo accumbens o nel PVN non modifica di per sé le erezioni peniene, né induce qualsiasi altra variazione comportamentale dell'attività motoria o della postura.

Effetto dell'iniezione di ossitocina nella VTA caudale sulle erezioni peniene e sulle concentrazioni di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens - prevenzione dell'effetto da parte della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$

L'ossitocina (80 ng) iniettata nella VTA caudale ha aumentato la concentrazione di dopamina extracellulare e DOPAC in 20 μl nel dializzato dello "shell" del nucleo

accumbens da 2.5 ± 0.3 pg e 15.3 ± 2.4 pg a 5.6 ± 0.5 pg e 29.04 ± 3.1 pg, rispettivamente. Questi aumenti sono stati trovati principalmente nelle aliquote di dializzato riguardanti i primi 15-30 minuti successivi al trattamento ed hanno avuto una durata di circa 45 minuti (Figura 7). Come atteso, l'ossitocina ha anche indotto episodi di erezione peniene, che sono stati osservati in media 15 minuti dopo l'aumento della dopamina extracellulare nel dializzato del nucleo accumbens (cioè durante la raccolta dell'aliquota di dializzato dei 30-45 minuti). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con ossitocina per le erezioni peniene, la dopamina ed il DOPAC, sono significativamente più alte di quelle dei ratti trattati con il solo veicolo (controlli) ($P < 0.01$). L'antagonista recettoriale ossitocinergico $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (1 μg), iniettato nella VTA caudale 15 minuti prima dell'ossitocina, ha abolito quasi completamente sia le erezioni peniene che l'aumento nelle concentrazioni di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens indotto dall'ossitocina (Figura 7). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ +ossitocina per le erezioni peniene, la dopamina ed il DOPAC, sono significativamente più basse rispetto a quelle dei ratti trattati con veicolo+ossitocina ($P < 0.01$). Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ nella VTA caudale non modifica di per sé le erezioni peniene, né le concentrazioni di dopamina e di DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens.

Effetto dell'iniezione di ossitocina nella VTA caudale sulle erezioni peniene e sulle concentrazioni di dopamina e DOPAC nel dializzato del PVN - prevenzione dell'effetto da parte della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$

Nelle condizioni sperimentali usate in questo studio, la quantità di dopamina e DOPAC trovata nel dializzato ottenuto dal PVN di ratti maschi che avevano l'estremità della cannula da microiniezione posizionata correttamente nella VTA caudale e la cannula da microdialisi posizionata correttamente nel PVN è stata veramente bassa, ai limiti della sensibilità del metodo. Infatti, i valori medi rilevati in un volume di 20 μl di dializzato sono stati di 0.150 ± 0.07 pg per la dopamina e di 1.35 ± 0.03 pg per il DOPAC, valori corrispondenti ad una concentrazione di 0.05 nM per la dopamina e 0.4 nM per il DOPAC (vedi anche Melis *et al.*, 2003). I valori riportati sono stati trovati nel dializzato proveniente dal PVN solo dopo un periodo di perfusione del PVN di almeno 2 ore, al fine di equilibrare la soluzione di perfusione con il liquido extracellulare. Dato che il

recupero della dopamina e del DOPAC che passa attraverso il probe può essere stimato approssimativamente come del 20% e 19%, rispettivamente, le concentrazioni di dopamina e DOPAC nel fluido extracellulare paraventricolare possono essere stimate come vicine a valori di 0.25 nM e di 2.1 nM, rispettivamente. L'ossitocina (80 ng), iniettata nella VTA caudale, ha aumentato la concentrazione di dopamina extracellulare e DOPAC in 20 µl di dializzato del nucleo paraventricolare, da 0.159±0.018 pg e 1.52±0.17 pg a 0.330±0.04 pg e 2.16±0.3 pg, rispettivamente. Questi aumenti sono stati trovati principalmente nelle aliquote di dializzato riguardanti i 30-45 minuti successivi al trattamento, hanno avuto una durata di circa 30 minuti, e si sono verificati contemporaneamente a degli episodi di erezione peniena (Figura 8). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con ossitocina per le erezioni peniene, la dopamina ed il DOPAC, sono significativamente più alte di quelle dei ratti trattati con il solo veicolo (controlli) ($P < 0.01$). L'antagonista recettoriale ossitocinergico $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina (1 µg), iniettato nella VTA caudale 15 minuti prima dell'ossitocina, ha abolito quasi completamente sia le erezioni peniene che l'aumento nelle concentrazioni di dopamina e DOPAC nel dializzato del PVN indotto dall'ossitocina (Figura 8). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina+ossitocina per le erezioni peniene, la dopamina ed il DOPAC, sono significativamente più basse rispetto a quelle dei ratti trattati con veicolo+ossitocina ($P < 0.01$) (Figura 8).

Effetto dell'ossitocina iniettata nella VTA caudale sulle erezioni peniene e sulla produzione di NO_2^- e NO_3^- nel dializzato della VTA caudale - prevenzione da parte della $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina

Nelle condizioni sperimentali usate in questo studio, la quantità di NO_2^- e NO_3^- nel dializzato ottenuto da ratti maschi trovati avere l'estremità della cannula da microdialisi posizionata correttamente nella VTA caudale è stata di 0.23±0.03 ng e di 1.23±0.14 pg, rispettivamente, in un volume di 20 µl di dializzato, valori corrispondenti ad una concentrazione di 0.28 µM per i NO_2^- e di 0.95 µM per i NO_3^- . I valori riportati sono stati trovati nel dializzato proveniente dalla VTA caudale solo dopo un periodo di perfusione della cannula da microdialisi di almeno 2 ore, al fine di equilibrare il buffer di perfusione con il liquido extracellulare. Come atteso, l'ossitocina (80 ng) iniettata nella VTA caudale ha aumentato gli episodi di erezione peniena da 0.30±0.04 a 2.18±0.21,

episodi che sono iniziati 25-30 minuti dopo l'iniezione e sono durati per all'incirca 30-40 minuti. L'ossitocina ha anche aumentato la concentrazione extracellulare di NO_2^- da $0.28 \pm 0.03 \mu\text{M}$ a $0.7 \pm 0.08 \mu\text{M}$, e di NO_3^- extracellulare da $0.95 \pm 0.15 \mu\text{M}$ a $1.34 \pm 0.25 \mu\text{M}$. Tali aumenti che si sono verificati già 15 minuti dopo il trattamento e sono durati per circa 30-45 minuti (Figura 9). L'aumento degli episodi di erezione peniena e delle concentrazioni di NO_2^- e NO_3^- nel dializzato della VTA caudale indotto dall'ossitocina è stato quasi completamente abolito dalla somministrazione dell'antagonista recettoriale dell'ossitocina $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina (1 μg), iniettata nella VTA caudale 15 minuti prima dell'ossitocina (Figura 9). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con ossitocina per le erezioni peniene, NO_2^- e NO_3^- , sono significativamente più alte di quelle dei ratti trattati con il solo veicolo (controlli), mentre le AUC dei ratti trattati con $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina+ossitocina per le erezioni, NO_2^- e NO_3^- , sono significativamente più basse rispetto a quelle dei ratti trattati con veicolo+ossitocina e simili a quelle dei ratti trattati con il solo veicolo ($P < 0.01$). Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina nella VTA caudale non modifica di per sé le erezioni peniene, né le concentrazioni di NO_2^- e NO_3^- nel dializzato della VTA caudale.

Effetto della SMTC e dell' ω -conotossina sulle erezioni peniene, e sull'aumento delle concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale, indotte dalla somministrazione dell'ossitocina nella VTA caudale

L'inibitore specifico della sintesi dell'NO neuronale SMTC (20 μg) ha ridotto quasi completamente l'aumento degli episodi di erezione peniena e delle concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale indotto dalla somministrazione di ossitocina (80 ng), quando somministrato nella VTA caudale 15 minuti prima dell'ossitocina (Figura 10). Simili risultati sono stati ottenuti con la ω -conotossina GVIA (50 ng), un antagonista dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti del tipo N, che ha ridotto quasi completamente l'aumento degli episodi di erezione peniena e delle concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale indotto dalla somministrazione di ossitocina (80 ng), quando somministrato nella VTA caudale 15 minuti prima dell'ossitocina (Figura 10). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con SMTC+ossitocina e dei ratti trattati con ω -conotossina+ossitocina per le erezioni peniene e le concentrazioni di NO_2^- , sono significativamente più basse rispetto a quelle dei ratti trattati con veicolo+ossitocina e

simili a quelle dei ratti trattati con il solo veicolo ($P < 0.01$). Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di SMTC o di ω -conotossina nella VTA caudale non modifica di per sé le erezioni peniene, né le concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale.

Effetto dell'ODQ e dell'emoglobina sulle erezioni peniene, e sull'aumento delle concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale, indotte dalla somministrazione dell'ossitocina nella VTA caudale

L'inibitore della guanilato ciclastasi solubile ODQ (40 μg) ha ridotto quasi completamente l'aumento degli episodi di erezione peniena indotto dalla somministrazione di ossitocina (80 ng), ma non l'aumento delle concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale, quando somministrato nella VTA caudale 15 minuti prima dell'ossitocina (Figura 11). A differenza dell'ODQ, l'emoglobina (40 μg), un catturatore di NO, ha abolito quasi completamente l'aumento delle concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale, ma non l'aumento degli episodi di erezione peniena indotto dalla somministrazione di ossitocina (80 ng), quando somministrata nella VTA caudale immediatamente prima dell'ossitocina (Figura 11). In accordo con ciò, le AUC dei ratti trattati con ODQ+ossitocina per le erezioni peniene e dei ratti trattati con emoglobina+ossitocina per le concentrazioni di NO_2^- , sono significativamente più basse rispetto a quelle dei ratti trattati con veicolo+ossitocina, mentre le AUC dei ratti trattati con ODQ+ossitocina per le concentrazioni di NO_2^- , e dei ratti trattati con emoglobina+ossitocina per le erezioni peniene, sono significativamente più alte rispetto a quelle dei ratti trattati con il solo veicolo ($P < 0.01$). Alle dosi usate in questi esperimenti, la microiniezione di ODQ o di emoglobina nella VTA caudale non modifica di per sé le erezioni peniene, né le concentrazioni di NO_2^- nel dializzato della VTA caudale.

Effetto dell'8-bromo-GMPc iniettato nella VTA caudale sulle erezioni peniene: curva dose-risposta

Come mostrato in Figura 12, l'8-bromo-GMP ciclico (0.5, 1, 2, 3, 5 e 10 μg), microiniettato nella VTA caudale, induce episodi di erezione peniena, che iniziano

all'incirca 15 minuti dopo il trattamento, sono presenti per circa 30 minuti, e scompaiono approssimativamente dopo 50-60 minuti dal trattamento. La curva dose-risposta segue un andamento "a campana" (U rovesciata): la dose minima efficace è stata 2 µg, che ha aumentato il numero di episodi di erezione peniena da 0.39 ± 0.052 a 1.1 ± 0.25 ($P < 0.01$), mentre la dose più efficace è stata 3 µg, che ha aumentato il numero di episodi di erezione peniena da 0.39 ± 0.052 a 2.0 ± 0.45 ($P < 0.001$). Una dose più alta (5 µg) è risultata inefficace ($P > 0.1$).

Immunoistochimica

In seguito alla somministrazione del FluoroGold nello "shell" del nucleo accumbens, l'intera VTA ha mostrato una numerosa popolazione di neuroni marcati con FluoroGold (Figura 13). Questi erano distintamente più abbondanti nella VTA caudale rispetto alla VTA rostrale (Figura 13, B vs A, rispettivamente), e la maggior parte si è dimostrata essere immunoreattiva verso la tirosina idrossilasi (TH), specialmente nella VTA caudale (approssimativamente il 75%, versus il 50-60% nella VTA rostrale). Assoni immunoreattivi all'ossitocina sono stati trovati in tutta la VTA, e spesso attorno (o che impingevano direttamente) ai neuroni marcati con FluoroGold (Figura 13, C-F). In generale, approssimativamente un terzo di neuroni marcati con FluoroGold, immunoreattivi alla TH, sembra ricevere stretto contatto/i da parte di assoni ossitocinergici (Figura 13, G-H).

L'immunoreattività alla guanilato ciclasi è stata osservata esclusivamente nella VTA caudale in diversi pericaria neuronali (Figura 14, A e C, colorazione in rosso), molti dei quali (più del 60%) sono risultati essere immunoreattivi anche per il TH (Figura 14, B e C, colorazione in verde). Pericaria immunoreattivi alla NO sintetasi neuronale sono stati trovati sia nella VTA caudale che in quella rostrale, con assoni contenenti ossitocina attorno ad essi (non mostrato). Nelle sezioni seriali della VTA caudale, una frazione (10%) dei pericaria reattivi sia alla guanilato ciclasi che al TH (Figura 14, A-C) risulta essere immunoreattiva (in sezioni adiacenti) anche alla NO sintetasi neuronale (Figura 14, E e F, colorazione in verde), e circondata da assoni e terminali contenenti ossitocina (Figura 14, D e F, colorazione in rosso).

DISCUSSIONE

I risultati degli esperimenti con l'apomorfina confermano che questo farmaco, agonista misto dei recettori dopaminergici D1 e D2, induce erezione peniena quando iniettato nel PVN di ratti maschi (Melis *et al.*, 1987, 2006), e mostrano per la prima volta che questo effetto è accompagnato da un aumento della concentrazione di dopamina extracellulare, e del suo principale metabolita DOPAC, nel dializzato proveniente dallo "shell" del nucleo accumbens. Questa area cerebrale contiene le terminazioni nervose dei neuroni dopaminergici mesolimbici che originano nell'area ventrale tegmentale (VTA) (vedi Dahlstrom & Fuxe, 1964). Questi neuroni giocano un ruolo chiave per quanto riguarda le proprietà motivazionali e di ricompensa dei rinforzi naturali, quali cibo ed attività sessuale, ed anche delle sostanze d'abuso (vedi Fibiger & Phillips, 1988; Everitt, 1990; Pfaus & Everitt, 1995; Wise & Rompre, 1989). Considerati assieme all'abilità del raclopride, potente D2 antagonista (Millan *et al.*, 1998), e dell'L-745,870, potente D4 antagonista (Patel *et al.*, 1997), di ridurre l'erezione peniena e gli aumenti nelle concentrazioni di dopamina e DOPAC nel dializzato del nucleo accumbens indotti dall'apomorfina, questi risultati suggeriscono che la stimolazione dei recettori dopaminergici della famiglia D2 (che include i recettori del sottotipo D4) nel PVN non solo facilita la funzione erettile, ma aumenta anche l'attività di meccanismi che portano, a loro volta, all'attivazione di questo sistema motivazionale e di rinforzo. Ciò può contribuire ad un aumento della motivazione sessuale e dell'attivazione sessuale, aspetti che normalmente anticipano gli aspetti consumatori dell'atto sessuale vero e proprio (copula). Questo può verificarsi, ad esempio, quando un ratto maschio sessualmente potente viene messo in presenza di una femmina recettiva ma inaccessibile. I ratti in questa condizione usualmente mostrano (ma non tutti) delle erezioni definite senza-contatto mediate dai feromoni (Sachs *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997; Melis *et al.*, 1998; Sachs, 2000) che si verificano contemporaneamente ad un aumento della dopamina (e del DOPAC) nel PVN (Melis *et al.*, 2003). L'aumento di dopamina nel PVN è ancora più alto quando i ratti maschi sono messi in condizione di copulare con la femmina recettiva (Melis *et al.*, 2003). Dal momento che i feromoni sessuali agiscono nell'area preottica mediale e nell'amigdala (vedi Liu *et al.*, 1997), è probabile che questi stimoli sessuali attivino dei circuiti neurali che includono il PVN, al fine di facilitare l'erezione peniena (una delle componenti consumatorie dell'attività sessuale), ed il nucleo accumbens, dove la dopamina agisce da mediatore della trasposizione degli aspetti motivazionali in comportamenti finalizzati al raggiungimento dell'obiettivo (in questo

caso l'attività sessuale) (Goto & Grace, 2005). In linea con questa ipotesi, un aumento di dopamina simile a quello indotto dall'apomorfina in questo studio si verifica nel nucleo accumbens durante le erezioni senza-contatto e la copula (Pfaus & Everitt, 1995).

Riguardo al meccanismo mediante cui l'apomorfina aumenta la dopamina extracellulare nel nucleo accumbens, l'abilità della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina, potente antagonista dei recettori ossitocinergici (Bankowski *et al.*, 1980), somministrata I.C.V., di ridurre quasi completamente l'aumento nelle concentrazioni di dopamina nel dializzato del nucleo accumbens, suggerisce che questo effetto è mediato dal rilascio di ossitocina in aree cerebrali extraipotalamiche. In altre parole, la stimolazione dei recettori dopaminergici nel PVN induce il rilascio di ossitocina in aree cerebrali che influenzano l'attività dei neuroni dopaminergici mesolimbici che mediano gli effetti appetitivi e rinforzanti dell'attività sessuale. Questo rende altamente probabile che la VTA sia una delle aree cerebrali in cui l'ossitocina viene rilasciata in seguito alla stimolazione dei neuroni ossitocinergici che hanno origine nel PVN. La VTA infatti contiene fibre ossitocinergiche che originano nel PVN (Buijs, 1978; Sofroniew, 1983; Roeling *et al.*, 1993), recettori ossitocinergici e relativo RNA messaggero (Freund-Mercier *et al.*, 1987; Vaccari *et al.*, 1998). L'ossitocina liberata nella VTA potrebbe agire direttamente e/o indirettamente sui corpi cellulari dei neuroni dopaminergici portando ad un aumento del rilascio di dopamina nel nucleo accumbens, e contribuire quindi ad un aumento della motivazione e dell'attivazione sessuale. Questa ipotesi è fortemente suffragata dai risultati degli esperimenti di questo studio che dimostrano, per la prima volta, che l'ossitocina iniettata monolateralmente nella VTA caudale, ma non nella VTA rostrale, induce erezione peniena secondo una curva dose-risposta "a campana" (U rovesciata), a dosi comprese tra 20 e 80 ng. Dato che l'effetto proerettile dell'ossitocina iniettata nella VTA caudale viene quasi completamente abolito dalla somministrazione nella stessa area della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina, questo effetto è mediato dalla stimolazione dei recettori per l'ossitocina nella VTA, come trovato per l'effetto proerettile dell'ossitocina iniettata nel PVN (Argiolas & Melis, 1995, 2004, 2005). Tuttavia, la curva dose-risposta dell'effetto proerettile dell'ossitocina iniettata nella VTA differisce da quella per l'effetto proerettile del neuropeptide iniettato nel PVN. Infatti, l'ossitocina iniettata unilateralmente nel PVN è in grado di indurre episodi di erezione peniena già a dosi di 3 ng (Argiolas *et al.*, 1986). Inoltre, nel PVN non è stata osservata una curva dose-risposta "a campana" dell'effetto proerettile della somministrazione di ossitocina, come nel caso della VTA. Un'altra differenza è che, nel

caso della VTA, la risposta sessuale inizia 30 minuti dopo la microiniezione di ossitocina in quest'area, mentre appare in 5-10 minuti quando il neuropeptide viene iniettato nel PVN (Argiolas *et al.*, 1986). La ragione di queste differenze è al momento sconosciuta. Nonostante ciò, i risultati ottenuti offrono interessanti spunti per cercare di descrivere almeno in parte cosa accade durante questo arco di tempo. Primo, le erezioni indotte dall'ossitocina somministrata nella VTA iniziano 15 minuti dopo un aumento della concentrazione di dopamina (e DOPAC) extracellulare nello "shell" del nucleo accumbens. A tal proposito, è importante ricordare che le terminazioni nervose dei neuroni dopaminergici mesolimbici del nucleo accumbens, hanno i loro corpi cellulari principalmente nella porzione caudale della VTA. Come ricordato prima, l'attività di questi neuroni si ritiene che abbia un ruolo chiave per quanto riguarda le proprietà motivazionali dei rinforzi naturali, quali cibo, acqua, ed attività sessuale (vedi Fibiger & Phillips, 1988; Wise & Rompre, 1989; Everitt, 1990). In particolare, nel caso dell'attività sessuale la dopamina rilasciata da questi neuroni può essere importante per la ricerca di un partner sessuale e per raggiungere quindi l'attività sessuale per ottenere ricompensa, ossia gratificazione e soddisfazione che fungono da stimolo di rinforzo per cercare di nuovo l'attività sessuale (vedi Goto & Grace, 2005). In accordo con ciò, la dopamina extracellulare aumenta nello "shell" del nucleo accumbens di ratti maschi sessualmente potenti durante l'esposizione ad una femmina recettiva ma inaccessibile, e tale aumento diventa ancora maggiore quando al ratto maschio viene permesso di copulare con la femmina recettiva (Pfaus & Everitt, 1995). Secondo, le erezioni peniene indotte dalla somministrazione dell'ossitocina nella VTA si verificano contemporaneamente ad un aumento della dopamina (e del DOPAC) extracellulare nel PVN, dove originano i neuroni ossitocinergici (che proiettano in aree cerebrali extraipotalamiche, inclusa la VTA ed il midollo spinale) che giocano un ruolo chiave nel controllo centrale della funzione erettile. A questo proposito è importante ricordare (vedi l'Introduzione) che la dopamina nel PVN si trova nei terminali nervosi di neuroni dopaminergici che originano nel sistema dopaminergico incerto-ipotalamico, i quali impingono sui neuroni ossitocinergici, e che l'attivazione di questi neuroni ossitocinergici da parte della dopamina, e/o da parte di dopamino-agonisti del tipo D2 (e del sottotipo D4) facilita l'erezione peniena (vedi Melis *et al.*, 2003, 2005, 2006; Argiolas & Melis, 2004, 2005). Il fatto che l'erezione peniena si verifichi in seguito all'aumento della dopamina extracellulare nel nucleo accumbens e contemporaneamente ad un aumento della dopamina extracellulare nel PVN, suggerisce che l'ossitocina attiva

i neuroni dopaminergici mesolimbici, cosa che a sua volta contribuisce ad attivare, con un meccanismo ancora sconosciuto, i neuroni dopaminergici incerto-ipotalamici; la dopamina rilasciata da questi neuroni nel PVN stimola quindi i neuroni ossitocinergici che mediano l'erezione peniena, come già discusso (vedi Melis *et al.*, 2003, 2006; Argiolas & Melis, 2004, 2005).

Questa interpretazione è supportata anche dai risultati degli studi di immunoistochimica di questo studio. Primo, gli esperimenti di immunoistochimica confermano che la VTA contiene fibre ossitocinergiche, che originano nel PVN (Buijs, 1978; Sofronew, 1983; Roeling *et al.*, 1993), e mostrano per la prima volta che alcune di queste fibre fanno contatto e/o passano attorno a corpi cellulari di neuroni dopaminergici mesolimbici che hanno i loro terminali nello "shell" del nucleo accumbens. Di particolare interesse, la regione della VTA caudale contiene un alto numero di corpi cellulari dopaminergici, comparata alle regioni adiacenti. Questi risultati suggeriscono anche che i recettori per l'ossitocina, che attivano i neuroni dopaminergici mesolimbici, si trovano, con molta probabilità, sui corpi cellulari di questi neuroni dopaminergici (vedi anche Succu *et al.*, 2007; Martino *et al.*, 2005). Secondo, l'aloiperidolo, un potente antagonista dei recettori dopaminergici del tipo D2, somministrato nel PVN o nel nucleo accumbens 15 minuti prima della somministrazione dell'ossitocina nella VTA caudale, riduce le erezioni peniene indotte dalla somministrazione del neuropeptide.

Insieme ai precedenti risultati (che mostrano che la stimolazione da parte di agonisti dopaminergici dei recettori dopaminergici del tipo D2 nel PVN induce episodi di erezione peniena ed un contemporaneo aumento nella concentrazione di dopamina extracellulare nello "shell" del nucleo accumbens, e che queste risposte sono quasi completamente abolite dalla precedente somministrazione I.C.V. della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$), questi risultati supportano l'ipotesi dell'esistenza di un circuito neurale che connette il PVN con la VTA ed il nucleo accumbens (Figura 15). Questo circuito potrebbe giocare un ruolo importante nell'integrazione delle attività neurali coinvolte nel controllo degli aspetti consumatori (erezione-eiaculazione) ed anticipatori (motivazione e rinforzo) del comportamento sessuale maschile in contesti fisiologici (Melis *et al.*, 2007). Sempre in accordo con questa ipotesi, come già detto, la dopamina (ed il DOPAC) extracellulare aumenta nel nucleo accumbens e nel PVN di ratti maschi sessualmente potenti durante l'esposizione ad una femmina recettiva ma inaccessibile (quando si verificano le erezioni senza-contatto), ed ancor di più quando

viene consentito loro di copulare (Pfaus & Everitt, 1995; Melis *et al.*, 2003). Sembra quindi ragionevole ipotizzare che questo circuito neurale, mentre contribuisce agli aspetti consumatori del comportamento sessuale, allo stesso tempo attiva anche il sistema dopaminergico mesolimbico, e fornisce un substrato neurale che può spiegare le proprietà di rinforzo dell'attività sessuale (vedi Everitt, 1990; Pfaus & Everitt, 1994). Riguardo a ciò, è importante ricordare che il sistema dopaminergico mesolimbico attivato dall'ossitocina iniettata nella VTA è lo stesso attivato dalle sostanze d'abuso, quali oppiacei, cannabinoidi, amfetamine, cocaina ed alcol (vedi Tanda *et al.*, 1997), e che l'ossitocina è in grado di ridurre la tolleranza e la dipendenza alla cocaina, alla morfina, all'alcol, ed ai cannabinoidi (Kovacs *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 2001).

Infine, i risultati ottenuti dimostrano che l'ossitocina iniettata nella VTA caudale induce erezione peniena con un meccanismo che coinvolge l'attività della NO sintetasi, presente nella VTA (Vincent & Kimura, 1992; Johnson & Ma, 1994; Southam & Garthwaite, 1994; Ding *et al.*, 2004), e la produzione di NO. Infatti, i risultati di questo studio mostrano che l'ossitocina iniettata nella VTA aumenta l'attività della NO sintetasi, e quindi la produzione di NO, misurata dall'aumentata concentrazione di NO_2^- ed NO_3^- nel dializzato della VTA caudale ottenuto mediante l'utilizzo della microdialisi intracerebrale *in vivo* (Succu *et al.* 2008, Melis *et al.*, 2007). I NO_2^- ed NO_3^- sono i prodotti della reazione dell'NO appena formato con l' O_2 , e rappresentano un indiretto, ma affidabile, indicatore della produzione di NO *in vivo* nei fluidi biologici, almeno in condizioni di assenza di sangue (Ignarro, 1990; Melis *et al.*, 1996). L'aumento nella produzione di NO nella VTA caudale è presente già 15 minuti dopo l'iniezione di ossitocina nella VTA, mentre l'erezione peniena è osservabile solo dopo 25-30 minuti. Di particolare importanza, in questo contesto, è il fatto che l'ossitocina iniettata nella VTA caudale, ad una dose che induce erezione peniena, aumenta la concentrazione di dopamina (e di DOPAC) extracellulare nel dializzato dello "shell" del nucleo accumbens 15 minuti dopo la sua somministrazione (Melis *et al.*, 2007), cioè allo stesso tempo nel quale aumenta la produzione di NO_2^- ed NO_3^- nel dializzato della VTA caudale dopo la somministrazione del neuropeptide in questa area cerebrale.

Sia l'aumento nella produzione di NO che gli episodi di erezione peniena indotti dall'ossitocina iniettata nella VTA caudale, sono aboliti dalla somministrazione in questa stessa area sia della SMTC, un potente inibitore della NO sintetasi neuronale (Furbine *et al.*, 1994), che della $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$, che blocca i recettori

ossitocinergici. Nel complesso, questi risultati confermano che l'ossitocina induce erezione peniena, quando iniettata nella VTA, attivando i recettori per l'ossitocina e suggeriscono che la stimolazione di questi recettori porta, all'interno del neurone, all'attivazione della NO sintetasi, il che porta a sua volta ad un aumento nella produzione di NO. L'NO a sua volta attiva delle vie neurali che portano, in ultimo, all'erezione peniena. Quanto al meccanismo mediante cui la stimolazione dei recettori ossitocinergici porta all'attivazione della NO sintetasi, è possibile che l'attivazione di questo enzima sia secondaria ad un aumento nell'influsso di ioni Ca^{2+} all'interno dei neuroni che contengono la NO sintetasi, enzima Ca^{2+} -calmodulina dipendente (vedi Ignarro, 1990; Southam & Garthwaite, 1993; Shuman & Madison, 1994). In accordo con questa spiegazione, l'aumento della produzione di NO nella VTA caudale, e del numero di erezioni peniene indotte dall'ossitocina, sono aboliti dalla somministrazione della ω -conotossina, un potente bloccante dei canali Ca^{2+} del tipo N (McCleskey *et al.*, 1987), iniettata nella VTA 15 min prima dell'ossitocina.

Come già detto (vedi l'Introduzione), simili meccanismi si verificano anche nel PVN. Infatti, anche nel caso del PVN, l'effetto proerettile dell'ossitocina ed il concomitante aumento nella produzione di NO, vengono aboliti dalla precedente somministrazione in questa stessa area della $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina, della SMTC, e della ω -conotossina (vedi Argiolas & Melis, 2004, 2005).

Quanto al meccanismo mediante cui l'aumento nella produzione di NO, indotto dalla stimolazione dei recettori per l'ossitocina nella VTA caudale, induce l'erezione peniena, l'NO sembra agire a livello della VTA come messaggero intracellulare all'interno dei neuroni nei quali si è formato, dato che l'emoglobina, un potente "scavenger" dell'NO, iniettata nella VTA immediatamente prima dell'ossitocina, riduce la concentrazione di NO_2^- nel dializzato della VTA senza influenzare gli episodi di erezione peniena. A causa del suo alto peso molecolare, l'emoglobina non attraversa le membrane cellulari, per cui in questo contesto, si può ritenere che l'emoglobina stia agendo come "scavenger" dell'NO extracellulare, ma non di quello intracellulare.

Per quanto riguarda il target attivato dall'NO nella VTA caudale che poi porta all'erezione peniena, la capacità dell'ODQ, un potente inibitore della guanilato ciclasi (Garthwaite *et al.*, 1995), di ridurre gli episodi di erezione peniena senza però ridurre l'aumento nella produzione di NO, supporta l'ipotesi che l'NO facilita l'erezione peniena attivando la guanilato ciclasi, il target principale dell'NO nel Sistema Nervoso

Centrale (vedi Ignarro, 1990; Southam & Garthwaite, 1993; Shuman & Madison, 1994). Questa ipotesi è suffragata dalla capacità dell'8-bromo-GMP ciclico, un analogo attivo del GMP ciclico resistente alle fosfodiesterasi, di indurre erezione peniena, in modo dose-dipendente, quando iniettato nella VTA caudale.

Ulteriore supporto per un coinvolgimento del sistema NO-GMPc nell'effetto proerettile dell'ossitocina somministrata nella VTA caudale proviene dai risultati di immunostochimica di questo studio, che mostrano che nella VTA caudale fibre immunoreattive all'ossitocina impingono sui corpi cellulari di neuroni immunoreattivi sia alla TH che alla NO sintetasi, e che una parte di questi neuroni è immunoreattiva anche alla guanilato ciclasi. Nelle condizioni sperimentali di questo studio, la frazione di neuroni nella VTA caudale immunoreattivi sia alla TH che alla NO sintetasi, è all'incirca del 60%. Questo valore è simile a quello riportato in studi precedenti (Kleibor *et al.*, 2004), che hanno riportato valori dal 29% al 67% nelle diverse parti della VTA. Sebbene solo il 10% di questi neuroni (immunoreattivi sia alla TH che alla NO sintetasi) è positivo anche per la guanilato ciclasi e mostra contatti da parte di fibre/assoni contenenti ossitocina, questi neuroni hanno un importante ruolo nell'effetto proerettile dell'ossitocina iniettata nella VTA, dal momento che gli inibitori della NO sintetasi e della guanilato ciclasi, somministrati nella VTA caudale, aboliscono quasi completamente l'effetto proerettile dell'ossitocina.

Nel loro insieme, i risultati degli esperimenti con l'emoglobina e l'ODQ, uniti ai risultati ottenuti con i saggi di immunostochimica, supportano l'ipotesi che l'NO sintetasi e la guanilato ciclasi coesistono nei corpi cellulari di neuroni dopaminergici mesolimbici, la cui attivazione facilita l'erezione peniena. I risultati di immunostochimica infatti, mostrano che l'immunoreattività alla guanilato ciclasi ed alla NO sintetasi è presente in corpi cellulari immunoreattivi alla TH, i quali inviano le loro proiezioni al nucleo accumbens. Il fatto che la guanilato ciclasi, e quindi il GMP ciclico, può attivare i neuroni dopaminergici per facilitare l'erezione peniena è anche in linea con il fatto che le erezioni peniene indotte dalla somministrazione del 8-bromo-GMP ciclico nella VTA caudale si verificano già 15 minuti dopo il trattamento, mentre quelle indotte dalla somministrazione di ossitocina nella VTA caudale si verificano 25-30 minuti dopo il trattamento. Ciò può essere spiegato dal fatto che mentre l'effetto proerettile dell'ossitocina si verifica dopo diversi passaggi (cioè, a partire dalla stimolazione dei suoi recettori, che aumenta l'influsso di Ca^{2+} all'interno dei corpi cellulari, che a sua

volta porta all'attivazione della NO sintetasi che aumenta la produzione di NO, il quale, infine, attiva la guanilato ciclasi, causando un aumento della concentrazione di GMP ciclico), l'8-bromo-GMP ciclico stimola direttamente meccanismi ancora sconosciuti, attivati in condizioni fisiologiche dal GMP ciclico, causando l'attivazione dei neuroni dopaminergici, attivazione che porta infine all'erezione peniena.

Nel complesso, questi risultati mostrano che l'ossitocina iniettata nella VTA caudale attiva il sistema NO-GMP ciclico localizzato all'interno dei corpi cellulari di neuroni dopaminergici mesolimbici che proiettano al nucleo accumbens. Questo porta all'attivazione di questi neuroni, e dei circuiti neurali responsabili della stimolazione del sistema dopaminergico incerto-ipotalamico, e di conseguenza all'attivazione dei neuroni ossitocinergici paraventricolari che controllano la risposta erettile (Melis *et al.*, 2007; Succu *et al.*, 2007, 2008). I sistemi neurali che originano nel nucleo accumbens e causano l'attivazione del sistema dopaminergico incerto-ipotalamico, sono ancora sconosciuti. Ulteriori studi sono necessari al fine di identificare i sistemi neurali ed i neurotrasmettitori coinvolti.

CONCLUSIONE

In conclusione, i risultati del mio lavoro dimostrano che la stimolazione dei recettori dopaminergici nel PVN attiva neuroni ossitocinergici che proiettano non solo nel midollo spinale ma anche nella VTA, e probabilmente anche in altre aree cerebrali come l'ippocampo, dove l'iniezione bilaterale di ossitocina induce erezione peniena (Melis *et al.*, 1987, 1990, 1992). L'ossitocina qui liberata attiva, con un meccanismo che coinvolge il sistema NO-GMPc, i neuroni dopaminergici mesolimbici che proiettano nel nucleo accumbens. La dopamina qui liberata, in qualche modo, attiva vie neurali che portano all'attivazione dei neuroni dopaminergici incerto-ipotalamici, che a loro volta attivano i neuroni ossitocinergici nel PVN. Questo suggerisce l'esistenza di un circuito neurale in cui neuroni dopaminergici e ossitocinergici giocano un ruolo molto importante per gli aspetti anticipatori-motivazionali e consumatori del comportamento sessuale. Questo circuito può essere attivato da stimoli sessuali fisiologici come, ad esempio, i feromoni rilasciati dalla femmine recettive, e, quando attivato, facilita non solo il comportamento copulatorio attraverso l'attivazione di neuroni ossitocinergici che proiettano nel midollo spinale, ma favorisce anche i meccanismi gratificanti e di rinforzo dell'attività sessuale attraverso la stimolazione di neuroni ossitocinergici che proiettano nella VTA e che attivano i sistemi dopaminergici della motivazione e della gratificazione (Melis *et al.*, 2007; Succu *et al.*, 2007, 2008).

BIBLIOGRAFIA

- Andersson, K.E., 2001. Pharmacology of penile erection. *Pharmacological Reviews* 53, 417-450.
- Argiolas, A., 2005. The chemical pharmacology of male erectile dysfunction. *Drugs Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2, 31-36.
- Argiolas, A., Melis, M.R., 1995. Neuromodulation of penile erection: an overview of the role of neurotransmitters and neuropeptides, *Progress in Neurobiology* 47, 235-255.
- Argiolas, A., Melis, M.R., 2004. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiology and Behavior* 83, 309-317.
- Argiolas, A., Melis, M.R., 2005. Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Progress in Neurobiology* 76, 1-21.
- Argiolas, A., Melis, M.R., Gessa, G.L., 1986. Oxytocin: an extremely potent inducer of penile erection and yawning in male rats. *Eur. J. Pharmacol.* 130, 265-272.
- Bankowski, K., Manning, M., Seto, J., Haldar, J., Sawyer, W.H., 1980. Design and synthesis of potent in vivo antagonists of oxytocin. *International Journal of Peptide and Protein Research* 16, 382-391.
- Bitner, R.S., Nikkel, A.L., Otte, S., Martino, B., Barlow, E.H., Bhatia, P., Stewart, A.O., Brioni, J.D., Decker, M.W., Moreland, R.B., 2006. Dopamine D4 receptor signalling in the rat paraventricular hypothalamic nucleus: Evidence of natural coupling involving immediate early gene induction and mitogen activated protein kinase phosphorylation. *Neuropharmacology* 50, 521-531.
- Brioni, J.D., Moreland, R.B., Cowart M., Hsieh, G.C., Stewart, A.O., Hedlund, P., Donnelly-Roberts, D.L., Nakane, M., Lynch J., Kolasa, T., Polakowski, J.S., Osinski, M.A., Marsh, K., Andersson, K.E., Sullivan, J.P., 2004. Activation of

- dopamine D₄ receptors by ABT-724 induces penile erection in rats. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 101, 6758-6763.
- Buijs, R.M., Geffard, M., Pool, C.W., Hoorneman, E.M.D., 1984. The dopaminergic innervation of the supraoptic and paraventricular nucleus. A light and electron microscopy study. *Brain Research* 323, 65-72.
- Buijs, R.M., 1978. Intra- and extra-hypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Research* 192, 423-435.
- Cocco, C., Melis, G.V., Ferri, G.-L., 2003. Embedding media for cryomicrotomy: an applicative reappraisal. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 11, 274-280.
- Cui, S.S., Bowen, R.C., Gu, G.B., Hannesson, B.K., Yu, P.H., Zhang, X., 2001. Prevention of cannabinoid withdrawal syndrome by lithium: involvement of oxytocinergic neuronal activation. *J. Neurosci.*, 21, 9867-9876.
- Dahlstrom, A., Fuxe, K., 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica* 62 (Suppl. 232), 1-54.
- Ding, J.D., Burette, A., NedVetsky, P.I., Schmidt, H.H.H.W., Weinberg, R.J., 2004. Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 472, 437-448.
- Eaton, R.C., Markowski, V.P., Lumley, L.A., Thompson, J.T., Moses, J., Hull, E.M., 1991. D₂ receptors in the paraventricular nucleus regulate genital responses and copulation in male rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 39, 177-181.
- Everitt, B.J., 1990. Sexual motivation: a neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses male rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 14, 217-232.

- Fibiger, H.C., Phillips, A.G., 1988. Mesocortico-limbic dopamine system and reward. *Annals of the New York Academy of Sciences* 5, 206-215.
- Freund-Mercier, M.J., Stoeckel, M.E., Palacois, J.M., Pazos, J.M., Richard, P.H., Porte, A., 1987. Pharmacological characteristics and anatomical distribution ^3H oxytocin binding sites in the Wistar rat brain studied by autoradiography. *Neuroscience* 20, 599-614.
- Furfine, F.S., Harmon, M.F., Paith, J.E., Knowles, R.G., Salter, M., Kiff, R.J., Duffy, C., Hazelwood, R., Oplinger, J.A., Garvey, E.P., 1994. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L- thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J. Biol. Chem.*, 269, 26677-683.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.E., Nielsen, E.B., Schmidt, K. Mayer, B., 1995. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*, 48,184-8.
- Giuliano, F., Rampin, O., 2000. Central neural control of penile erection. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24, 517-533.
- Goto, Y., Grace, A.A., 2005. Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nature Neuroscience* 8, 805-812.
- Hull, E.M., Du, J., Lorrain, D.S., Matuszewich, L., 1995. Extra-cellular dopamine in the medial preoptic area: implications for sexual motivation and hormonal control of copulation. *Journal of Neuroscience* 15, 7465-7471.
- Hull, E.M., Meisel, R.L., Sachs, B.D., 2002. Male sexual behavior. In: *Hormones, Brain and Behavior*, pp. 3-137. Eds. D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A.M. Etgen, S.E. Fahrbach, R.T. Rubin. New York: Academic Press.
- Ignarro, L.J., 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annual reviews of Pharmacology and Toxicology* 30, 535-560.

- Imperato, A., Tanda, G., Frau, R., Di Chiara, G., 1988. Pharmacological profile of dopamine receptor agonists as studied by brain dialysis in behaving rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 245, 257-264.
- Johnson, M.D. & Ma, P.N., 1993. Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 332, 391-406.
- Kleibor, I., Domaradzka-Pytel, B., Ludkiewicz, B., Wojcik, S., Morys, J., 2004. The relationship between neurons containing dopamine and nitric oxide synthase in the ventral tegmental area. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 42, 83-87.
- Kovacs, G.L., Sarnyai, Z., Szabo, G., 1998. Oxytocin and addiction: a review. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 945-962.
- Lindvall, O., Bjorklund, A., Skagerberg, G., 1984. Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Research* 306, 19-30.
- Liu, Y.-C., Sachs, B.D., Salamone, J.D., 1998. Sexual behavior in male rats after radiofrequency or dopamine-depleting lesions in nucleus accumbens. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 60, 585-592.
- Liu, Y.-C., Salamone, J.D., Sachs, B.D., 1997. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis: differential effects on copulatory behaviour and noncontact erections in male rats. *Journal of Neuroscience* 17, 5245-5253.
- McKenna, K.E., 2000. Some proposals regarding the organization of the central nervous system control of penile erection. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24, 535-540.
- McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W., Yoshikami, D., 1987. ω -Conotoxin: Direct and persistent blockade of specific

- types of calcium channels in neurons but not muscle. *Prot. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 4327-4331
- Martino, B., Hsieh, G.C., Hollingsworth, P.R., Mikusa, J.P., Moreland, R.B., Bitner, R.S., 2005. Central oxytocinergic and dopaminergic mechanisms regulating penile erection in conscious rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81, 797-804.
- Meisel, R.L., Sachs, B.D., 1994. The physiology of male sexual behavior. In Knobil, E. & Neil, J. (eds.), *The physiology of Reproduction*, 2, 2nd ed. Raven Press, New York, pp 3-96.
- Melis, M.R., Argiolas, A., 1995. Dopamine and sexual behaviour. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 19, 19-38.
- Melis, M.R., Argiolas, A., 2003. Central oxytocinergic neurotransmission: A drug target for the therapy of psychogenic erectile dysfunction. *Current Drug Targets* 4, 55-66.
- Melis, M.R., Argiolas, A., Gessa, G.L., 1987. Apomorphine-induced penile erection and yawning: Site of action in the brain. *Brain Research* 415, 98-104.
- Melis, M.R., Argiolas, A., Stancampiano, R., Gessa, G.L., 1990. Effect of apomorphine on oxytocin concentrations in different brain areas and plasma of male rats. *European Journal of Pharmacology* 182, 101-107.
- Melis, M.R., Melis, T. Cocco, C., Succu, S., Sanna, F., Pillolla, G., Boi, A., Ferri, G.-L., Argiolas, A., 2007. Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *Eur. J. Neurosci.*, 26, 1026-1035.
- Melis, M.R., Spano, M.S., Succu, S., Argiolas, A. 1999. The oxytocin antagonist $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocin reduces non-contact penile erections in male rats. *Neuroscience Letters* 265, 171-174.

- Melis, M.R., Stancampiano, R., Argiolas, A., 1992. Hippocampal oxytocin mediates apomorphine-induced penile erection and yawning. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 42, 61-66.
- Melis, M.R., Succu, S., Argiolas, A., 1996. Dopamine agonists increase nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: correlation with penile erection and yawning. *European Journal of Neuroscience* 8, 2056-2063.
- Melis, M.R., Succu, S., Mauri, A., Argiolas, A., 1998. Nitric oxide production is increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats during non-contact penile erections and copulation. *European Journal of Neuroscience* 10, 1968-1974.
- Melis, M.R., Succu, S., Mascia, M.S., Cortis, L., Argiolas, A., 2003. Extra-cellular dopamine increases in the paraventricular nucleus of male rats during sexual activity. *European Journal of Neuroscience* 17, 1266-1272.
- Melis, M.R., Succu, S., Mascia, M.S., Argiolas, A., 2005. PD-168077, a selective dopamine D₄ receptor agonist, induces penile erection when injected into the paraventricular nucleus of male rats. *Neuroscience Letters* 379, 59-62.
- Melis, M.R., Succu, S., Sanna, F., Melis, T., Mascia, M.S., Enguehard-Gueiffier, C., Hubner, H., Gmeiner, P., Gueiffier, A., Argiolas, A., 2006. PIP3EA and PD-168077, two selective dopamine D₄ receptor agonists, induce penile erection in male rats: site and mechanism of action in the brain. *European Journal of Neuroscience* 24, 2021-2030.
- Millan, M.J., Newman-Tancredi, A., Brocco, M., Gobert, A., Lejeune, F., Audinot, V., Rivet, J.M., Schreiber, R., Dekeyne, A., Spedding, M., Nicolas, J.P., Peglion, J.L., 1998. S 18126 ((2-[4-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin-6-yl)piperazin-1-yl methyl]indan-2-yl)), a potent selective and competitive antagonist at dopamine D₄ receptors: an in vitro and in vivo comparison with L-745,870 (3-(4-[4-

- chlorophenyl]piperazin-1-yl)methyl-1H-pyrrolo[2,3b]pyridine) and raclopride. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 287, 167-186.
- Patel, S., Freedman, S., Chapman, K.L., Emms, F., Fletcher, A.E., Knowles, M., Marwood, R., Mccallister, G., Myers, J., Curtis, J.J., Kulagowski, J.J., Leeson, P.D., Ridgill, M., Graham, M., Matheson, S., Rathbone, D., Watt, A.P., Bristow, L.J., Rupniak, N.M., Baskin, E., Lynch, J.J., Ragan, C.I., 1997. Biological profile of L-745,870, a selective antagonist with high affinity for the dopamine D4 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, 636-647.
- Pellegrino, L.J., Cushman, A.J., *A Stereotaxic Atlas of The Rat Brain*, Meredith, New York, 1971.
- Pfaus, J.G., Everitt, B.J., 1995. The psychopharmacology of sexual behavior. In: *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*, pp.742-758. Eds. F.E. Knobil, D.J. Kupfer. New York: Raven Press.
- Roeling, T.P.A., Veening, J.G., Peters J.P.W., Vermelis, M.E.J., Nieuwenhuys, R., 1993. Efferent connections of the hypothalamic grooming area in the rat. *Neuroscience* 56, 199-225.
- Sachs, B.D., 2000. Contextual approaches to the physiology and classification of erectile function, erectile dysfunction, and sexual arousal. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 24, 541-560.
- Sachs, B.D., Akasofu, K., Citro, J.K., Daniels, S.B., Natoli, J.H., 1994. Non-contact stimulation from estrus females evokes penile erection in rats. *Physiology and Behaviour* 55, 1073-1079.
- Schuman, E.M., Madison, D.V., 1994. Nitric oxide and synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.* 17, 153-183.
- Sofroniew, M.V., 1983. Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. *Trends in Neuroscience* 6, 467-472.

- Southam, E., Garthwaite, J., 1993. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology* 32, 1267-1277.
- Succu, S., Sanna, F., Cocco, C., Melis, T., Boi, A., Ferri, G.-L., Argiolas, A., Melis, M.R., 2008. Oxytocin induces penile erection when injected into the ventral tegmental area of male rats: role of nitric oxide and cyclic GMP. *Eur. J. Neurosci.*, 28, 813-821.
- Succu, S., Sanna, F., Melis, T., Boi, A., Argiolas, A., Melis, M.R., 2007. Stimulation of dopamine receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens: involvement of central oxytocin. *Neuropharmacology*, 52, 1034-1043.
- Tanda, G., Pontieri, F.E., Di Chiara, G., 1997. Cannabinoids and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276, 2048-2050.
- Vaccari, C., Lolait, S.J., Ostrowski, N.L. 1998. Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology* 139, 5015-5033.
- Vincent, S.R., Kimura, H., 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46, 755-784.
- Wise, R.A., Rompre, P.-P., 1989. Brain dopamine and reward. *Annual Reviews of Psychology* 40, 191-225.

APPENDICE

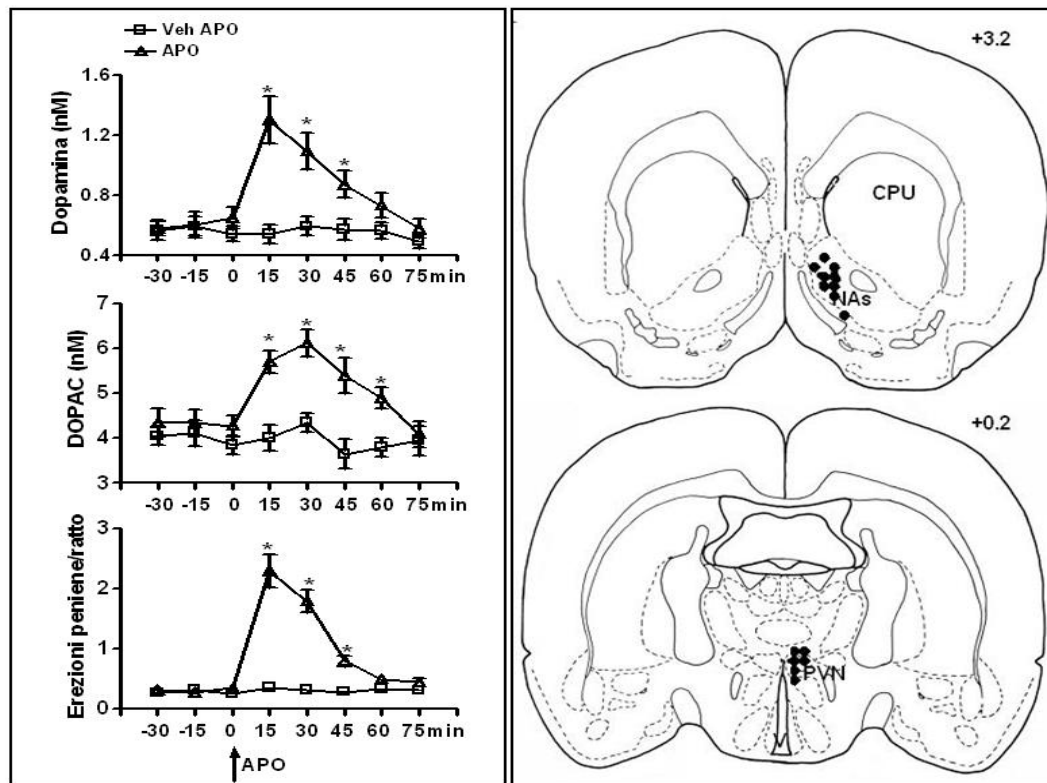


Figura 1. (A sinistra) Effetto dell'apomorfina (APO), iniettata nel PVN di ratti maschi, sull'erezione peniena e sulla concentrazione extracellulare di dopamina e di DOPAC nel dializzato ottenuto dallo "shell" del nucleo accumbens. L'apomorfina (0.1 μ g) disciolta in fisiologica, o la fisiologica da sola, è stata iniettata in un volume di 0.3 μ l nel PVN dopo la raccolta di 3 aliquote di dializzato per la determinazione dei valori basali di dopamina e DOPAC (come descritto nei Materiali e Metodi). Dopo l'iniezione, i ratti sono stati riposizionati individualmente in gabbie di Plexiglas e osservati per altri 75 min durante i quali sono stati contati gli episodi di erezione peniena e sostituiti i loops di raccolta del dializzato pieni con quelli vuoti. La dopamina ed il DOPAC sono stati immediatamente misurati nelle aliquote di dializzato mediante HPLC accoppiata a rilevazione elettrochimica. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 7 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con veicolo (one-way ANOVA). (A destra) Rappresentazione schematica di due sezioni coronali di cervello di ratto che mostrano la posizione usuale della cannula da microdialisi (cerchi pieni) nello "shell" del nucleo accumbens, e dell'estremità della cannula da microiniezione nel PVN.

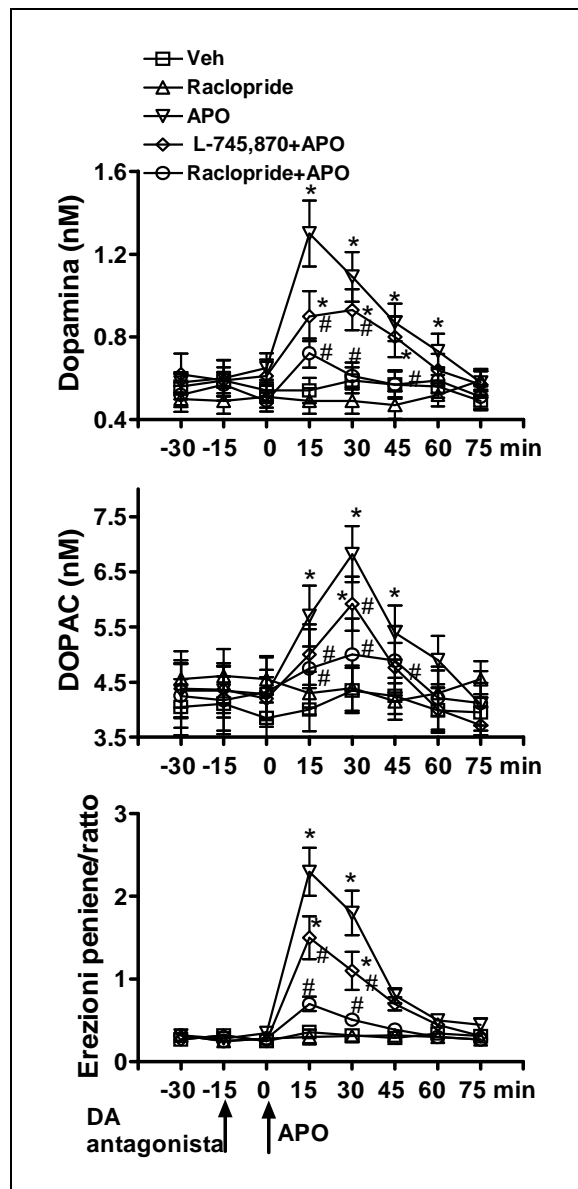


Figura 2. Effetto del raclopride e del L-745,870 sull'erezione peniena e sul concomitante aumento della dopamina e del DOPAC nel dializzato proveniente dallo "shell" del nucleo accumbens indotto dall'apomorfina iniettata nel PVN. Il raclopride (1 μ g) o l'L-745,870 (1 μ g), disciolto in fisiologica, è stato iniettato nel PVN in un volume di 0.3 μ l 15 min prima dell'apomorfina (0.1 μ g). Le altre condizioni sperimentali sono identiche a quelle descritte nella Legenda della Figura 1. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 7 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con il veicolo; # $P < 0.01$ rispetto al corrispondente gruppo trattato con apomorfina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test).

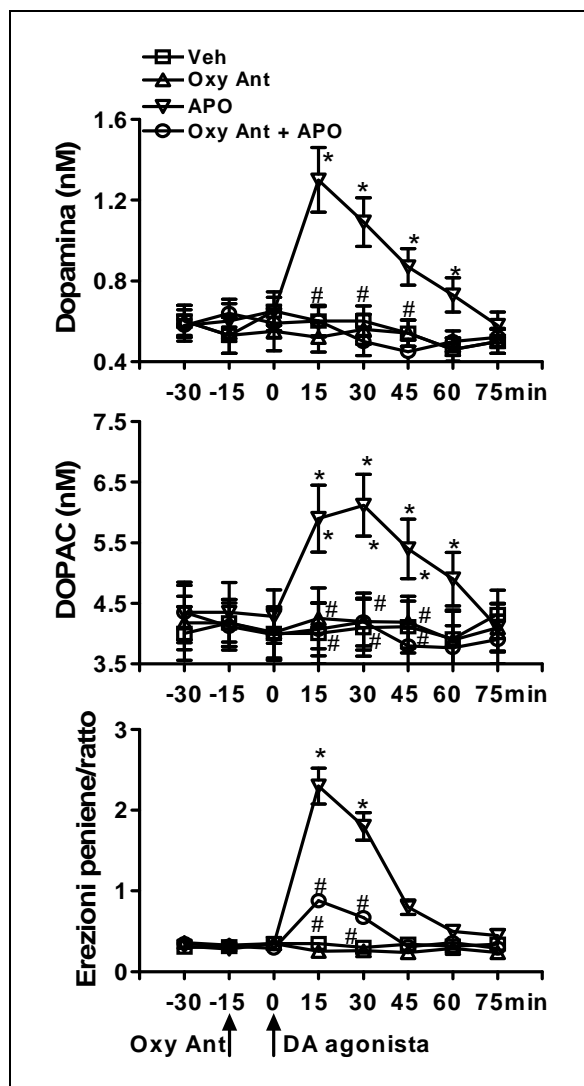


Figura 3. Effetto della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (Oxy Ant) sulle erezioni peniene e sul concomitante aumento della dopamina e del DOPAC nel dializzato dello “shell” del nucleo accumbens indotto dall’apomorfina iniettata nel PVN. La $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (1 μg) disciolta in fisiologica è stata iniettata nei ventricoli laterali (I.C.V.) in un volume di 10 μl 15 min prima dell’apomorfina nel PVN (0.1 μg). Le altre condizioni sperimentali sono identiche a quelle riportate nella Legenda della Figura 1. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 7 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con il veicolo; # $P < 0.01$ rispetto al gruppo corrispondente trattato con apomorfina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey’s multiple comparison test).

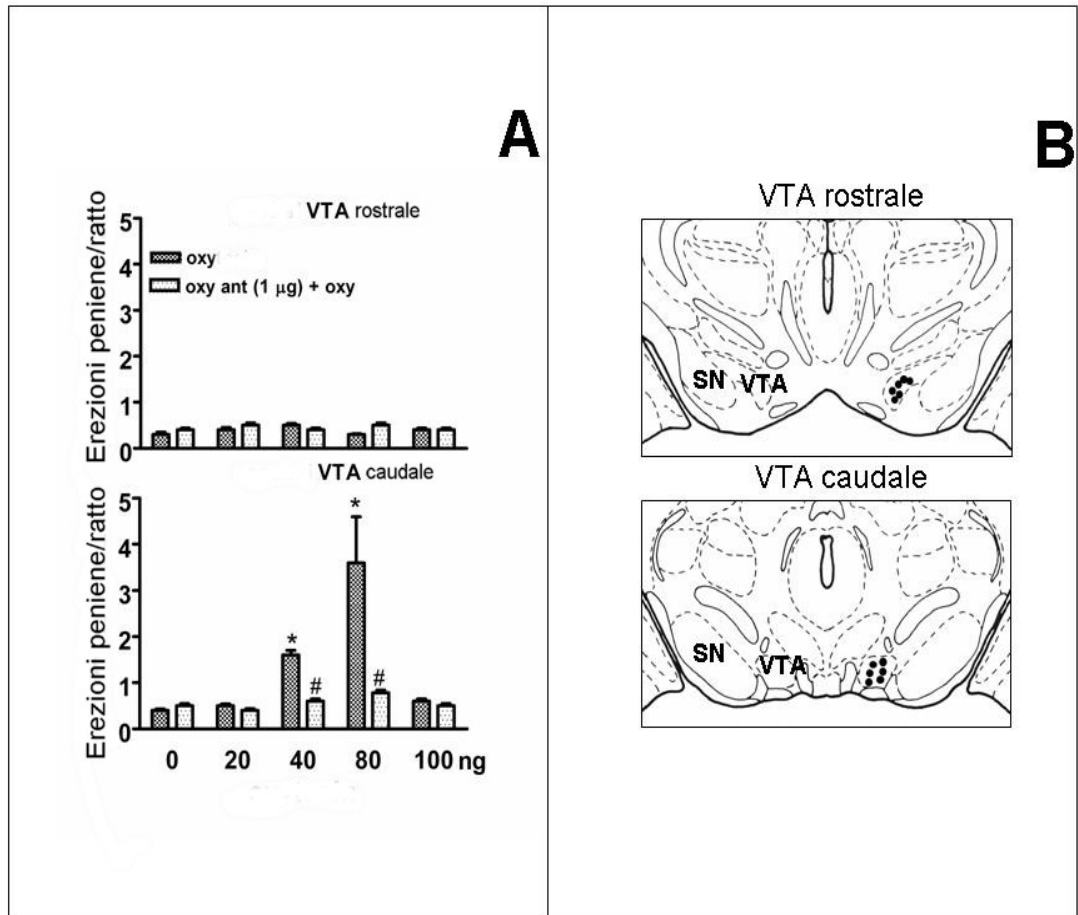


Figura 4. (A) Effetto dell'ossitocina iniettata nella VTA rostrale o caudale di ratti maschi sull'erezione peniena: curve dose-risposta e antagonismo da parte della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$. (A) L'ossitocina (0, 20, 40, 80, and 100 ng), disciolta in fisiologica, è stata iniettata nella VTA rostrale o caudale in un volume di 0.3 μl in 2 min. I ratti di controllo sono stati trattati con la fisiologica da sola. Quando è stata usata la $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$, il composto (1 μg) è stato iniettato in un volume di 0.3 μl 15 min prima dell'ossitocina. Dopo il trattamento, gli animali sono stati messi individualmente in gabbie di Plexiglas e osservati per 60 min durante i quali sono stati contati gli episodi di erezione peniena. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 7 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con il solo veicolo; # $P < 0.01$ rispetto al gruppo corrispondente trattato con la sola ossitocina (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test). (B) Rappresentazione schematica di due sezioni coronali del cervello di ratto che mostrano la posizione dell'estremità della cannula da microiniezione (cerchi pieni) nella VTA rostrale o caudale dei ratti maschi utilizzati in questa serie di esperimenti.

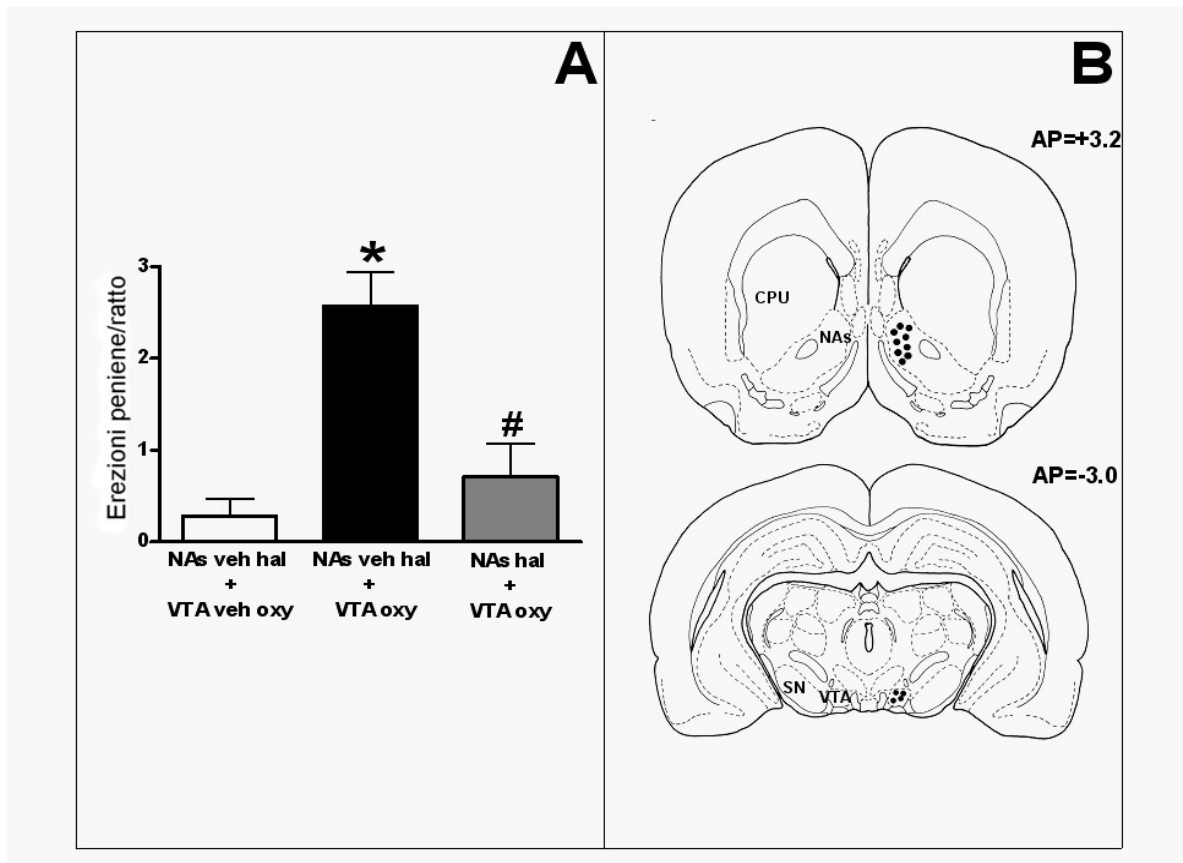


Figura 5. (A) Effetto dell’aloperidolo iniettato nello “shell” del nucleo accumbens (NAs) sulle erezioni indotte dall’ossitocina iniettata nella VTA caudale. L’aloperidolo (1 μ g), disciolto in una goccia di acido acetico glaciale e diluito con acqua distillata, è stato iniettato nel nucleo accumbens in un volume di 0.3 μ l 15 min prima dell’iniezione dell’ossitocina (80 ng) nella VTA caudale. Le altre condizioni sperimentali sono identiche a quelle riportate nella Legenda della Figura 4. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 6 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con veicolo; # $P < 0.01$ rispetto al gruppo corrispondente trattato con ossitocina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey’s multiple comparison test). (B) Rappresentazione schematica di due sezioni coronali di cervello di ratto che mostrano la posizione dell’estremità della cannula di microiniezione (cerchi pieni) per l’aloperidolo nel nucleo accumbens, e per l’ossitocina nella VTA caudale dei ratti maschi utilizzati in questa serie di esperimenti.

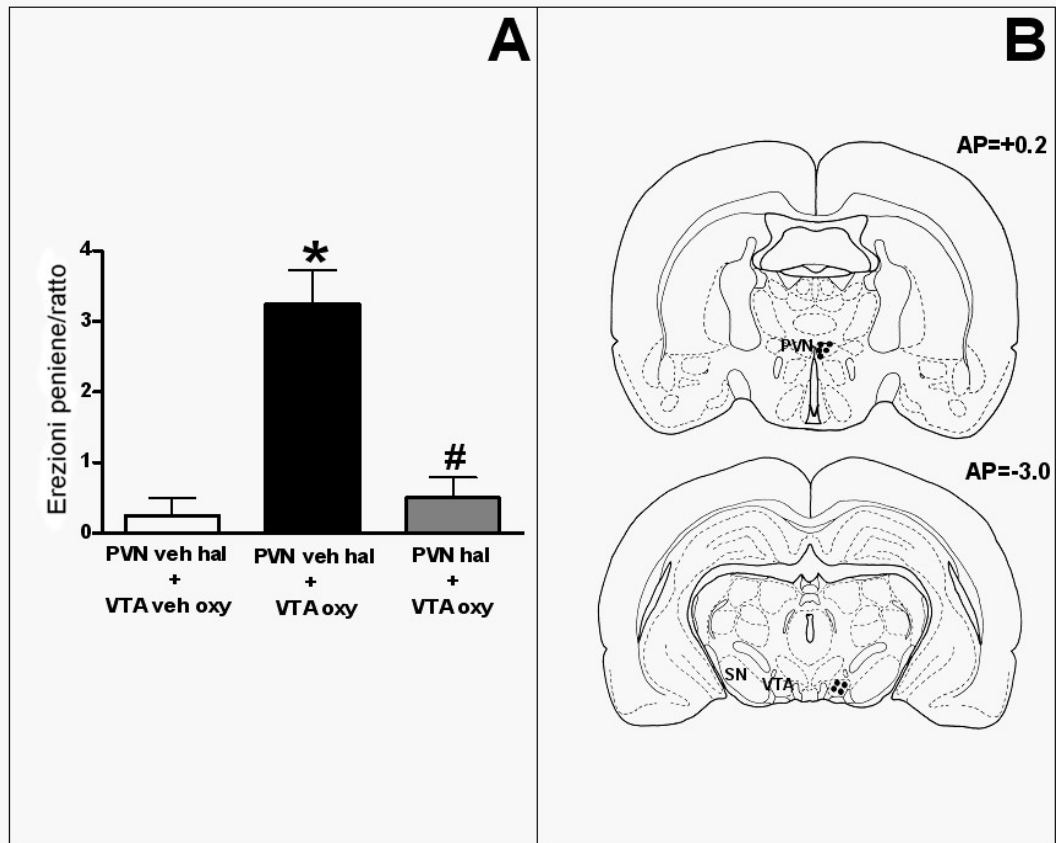


Figura 6. (A) Effetto dell'aripiprazolo iniettato nel PVN sulle erezioni peniene indotte dall'ossitocina iniettata nella VTA caudale. L'aripiprazolo (1 μ g), disciolto con una goccia di acido acetico glaciale e diluito con acqua distillata, è stato iniettato nel PVN in un volume di 0.3 μ l 15 min prima dell'iniezione dell'ossitocina (80 ng) nella VTA caudale. Le altre condizioni sperimentali sono identiche a quelle riportate nella Legenda della Figura 4. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 6 ratti per gruppo. *P < 0.01 rispetto ai ratti trattati con veicolo; #P < 0.01 rispetto al gruppo corrispondente trattato con ossitocina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test). (B) Rappresentazione schematica di due sezioni coronali di cervello di ratto che mostrano la posizione dell'estremità della cannula di microiniezione (cerchi pieni) per l'aripiprazolo nel PVN, e per l'ossitocina nella VTA caudale dei ratti maschi utilizzati in questa serie di esperimenti.

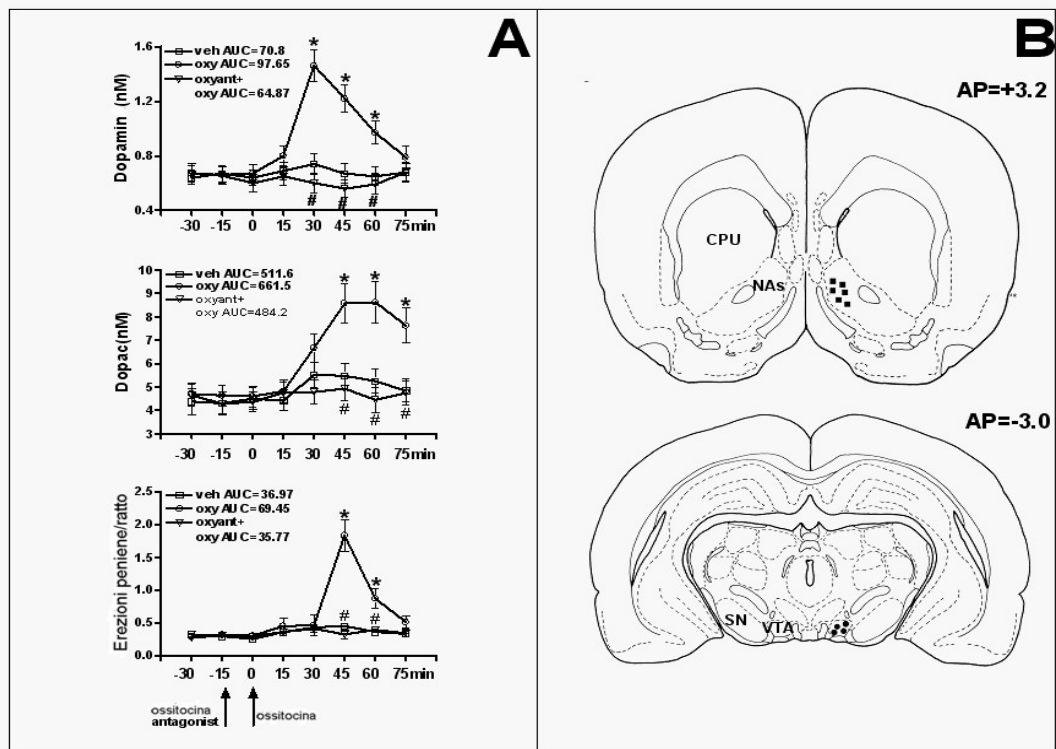


Figura 7. (A) Effetto dell'ossitocina (80 ng) sulle erezioni peniene e sulle concentrazioni extracellulari di dopamina e DOPAC nel dializzato dello "shell" del nucleo accumbens: antagonismo da parte della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (1 μg). L'ossitocina (80 ng) disciolta in fisiologica o la fisiologica da sola è stata iniettata in un volume di 0.3 μl nella VTA caudale dopo la raccolta di 3 aliquote di dializzato per la determinazione dei valori basali della dopamina e del DOPAC nello "shell" del nucleo accumbens, come descritto nei Materiali e Metodi. La $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ è stata iniettata nella VTA caudale in un volume di 0.3 μl di fisiologica 15 min prima dell'ossitocina. Dopo l'iniezione di ossitocina, i ratti sono stati osservati per 75 min durante i quali sono stati conteggiati gli episodi di erezione peniena e sostituiti i loops di raccolta del dializzato pieni con quelli vuoti. La dopamina e il DOPAC sono stati immediatamente misurati mediante HPLC accoppiata a rilevazione elettrochimica. Le AUC sono state calcolate come descritto nei Materiali e Metodi. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 6 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con veicolo; # $P < 0.01$ rispetto al gruppo corrispondente trattato con ossitocina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test). (B) Rappresentazione schematica di due sezioni coronali di cervello di ratto che mostrano la posizione della cannula da microdialisi (quadrati pieni) nello "shell" del nucleo accumbens, e

dell'estremità della cannula da microiniezione (cerchi pieni) nella VTA caudale dei ratti maschi utilizzati in questa serie di esperimenti.

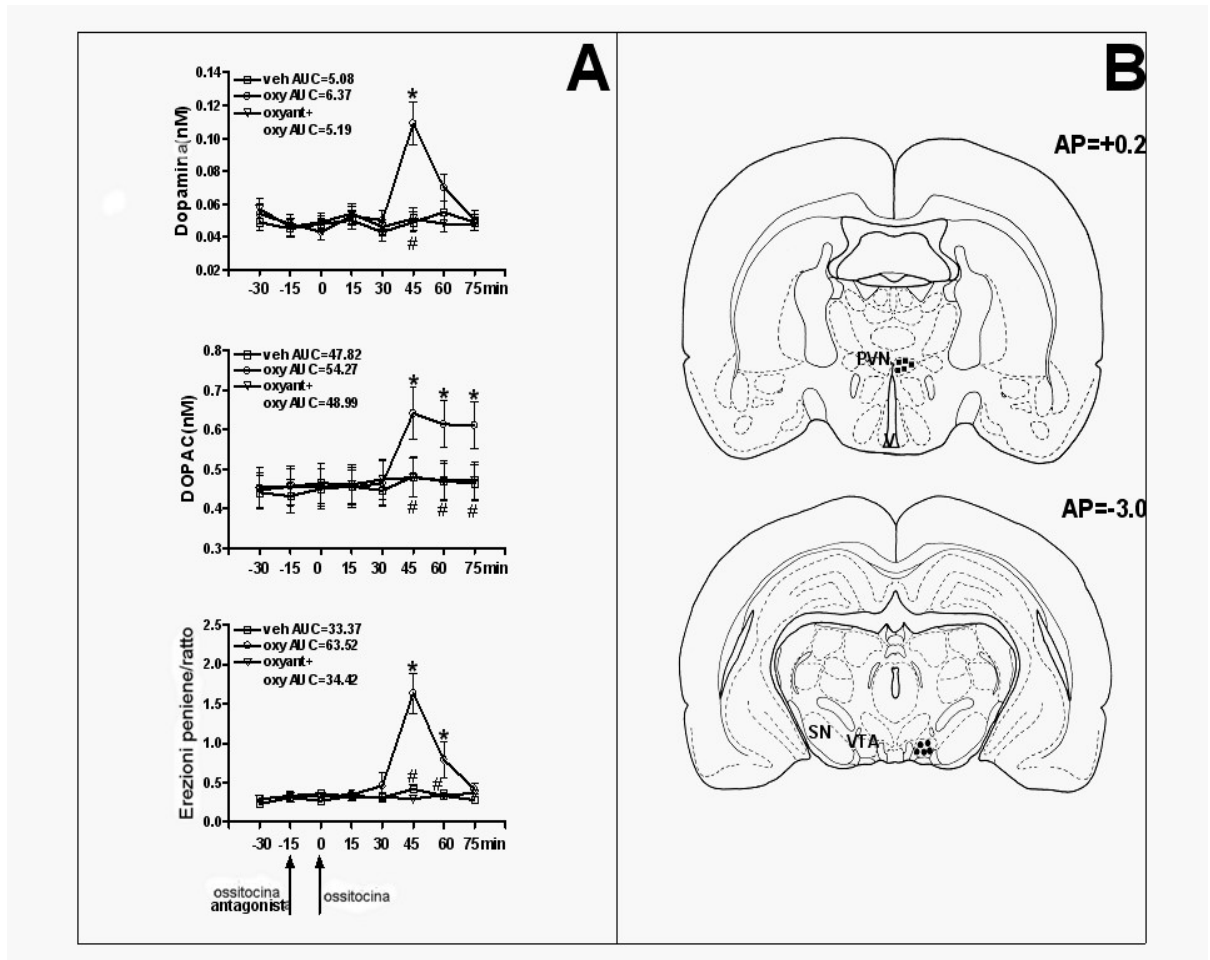


Figura 8. (A) Effetto dell'ossitocina (80 ng) sulle concentrazioni extracellulari di dopamina e DOPAC nel dializzato del PVN: antagonismo da parte della $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (1 μg). Le condizioni sperimentali sono identiche a quelle riportate nella legenda della Figura 7. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 6 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con veicolo; # $P < 0.01$ rispetto al gruppo corrispondente trattato con ossitocina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test). B) Rappresentazione schematica di due sezioni coronali di cervello di ratto che mostrano la posizione della cannula da microdialisi (quadrati pieni) nel PVN, e dell'estremità della cannula da microiniezione (cerchi pieni) nella VTA caudale dei ratti maschi utilizzati in questa serie di esperimenti.

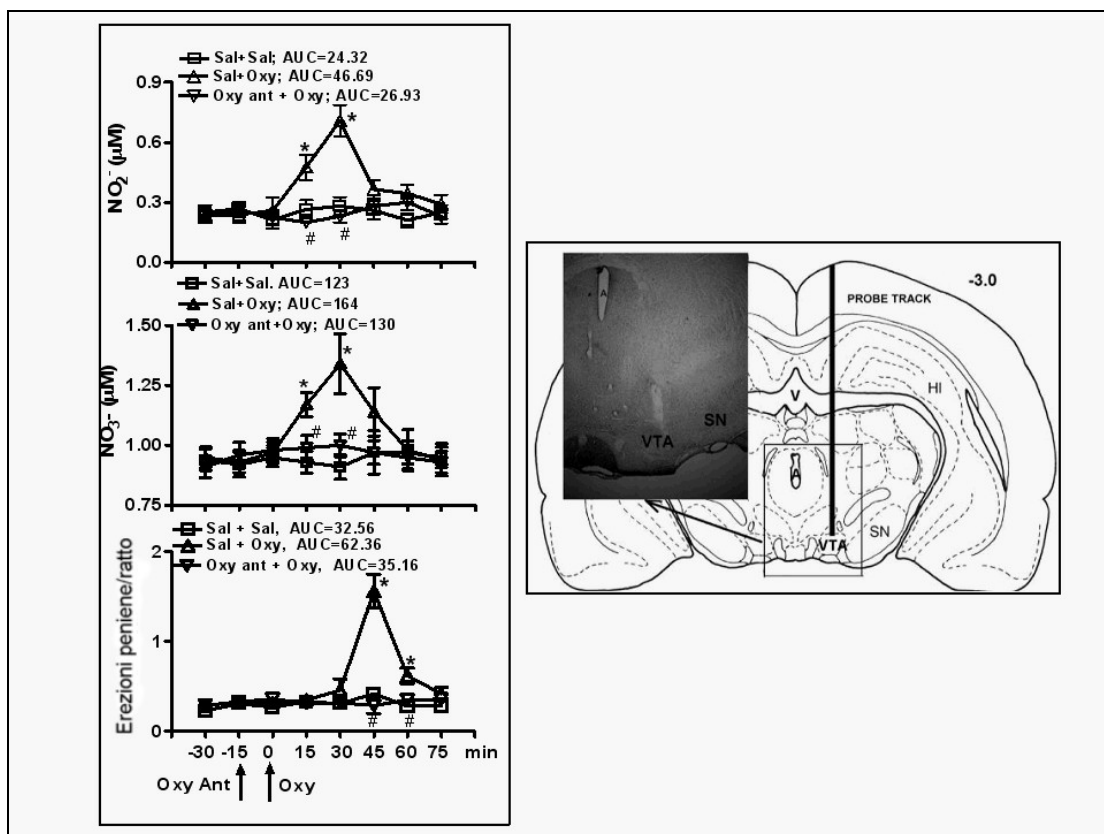


Figura 9. (A sinistra) Effetto dell'ossitocina iniettata nella VTA caudale sulle erezioni peniene e sulla produzione di NO₂⁻ e NO₃⁻ nel dializzato ottenuto dalla VTA caudale: antagonismo da parte della d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina. La d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina (1 μg) disciolta in fisiologica (0.3 μl) o la fisiologica da sola è stata iniettata nella VTA caudale 15 min prima della ossitocina (80 ng). Dopo le iniezioni, che sono state eseguite dopo la raccolta di tre aliquote di dializzato per la determinazione dei valori basali di NO₂⁻ and NO₃⁻ nella VTA caudale, gli animali sono stati messi individualmente in gabbie di Plexiglas e osservati per altri 75 min, durante i quali sono state raccolte altre 5 aliquote di dializzato e contati gli episodi di erezione peniena, come descritto nei Materiali e Metodi. I valori riportati sono le medie ± SEM di 6 ratti per gruppo. *P < 0.01 rispetto ai ratti trattati con veicolo; #P < 0.01 rispetto al gruppo corrispondente trattato con ossitocina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test). (A destra) Rappresentazione schematica di una sezione coronale del cervello di ratto che mostra la traccia della cannula da microdialisi diretta alla VTA caudale. L'ingrandimento nella Figura, colorato con il Rosso Neutro, mostra la posizione usuale dell'estremità della cannula da microdialisi nella VTA caudale dei ratti maschi utilizzati per questa serie di esperimenti.

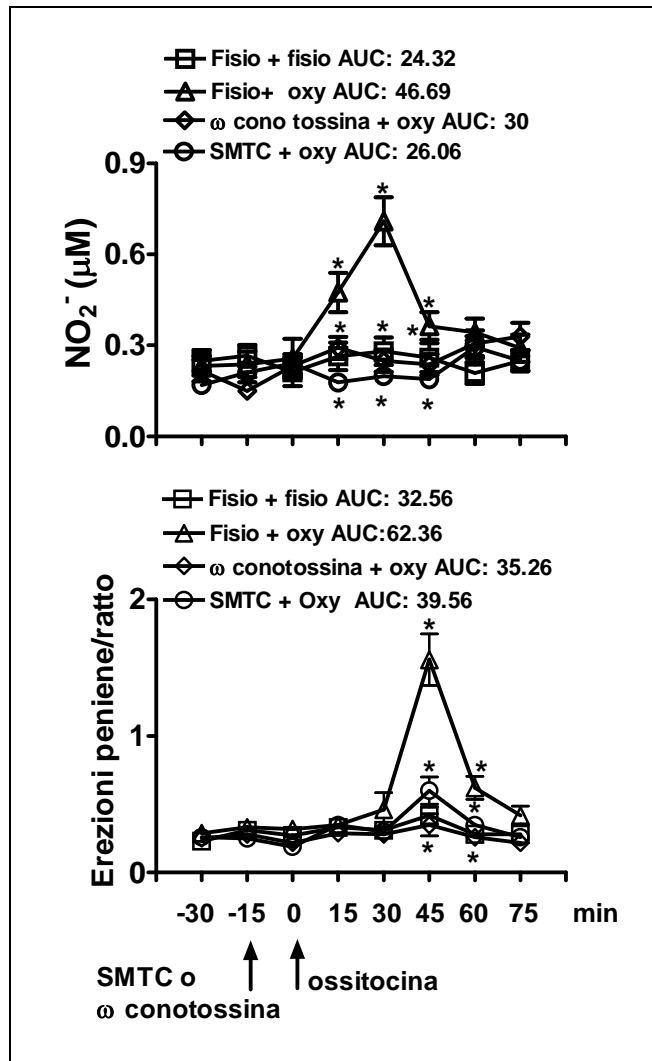


Figura 10. Effetto della SMTC o della ω -conotossina sulle erezioni peniene e sull'aumento delle concentrazioni di NO_2^- nella VTA caudale indotto dalla ossitocina iniettata nella VTA caudale. La SMTC (20 μg) o la ω -conotossina (50 ng) disciolta in fisiologica (0.3 μl), o la fisiologica da sola, è stata iniettata nella VTA caudale 15 min prima dell'ossitocina (80 ng). Le altre condizioni sperimentali sono identiche a quelle riportate nella Legenda della Figura 9. I valori riportati sono le medie \pm SEM di 6 ratti per gruppo. * $P < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con veicolo; # $P < 0.01$ rispetto al gruppo corrispondente trattato con ossitocina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test).

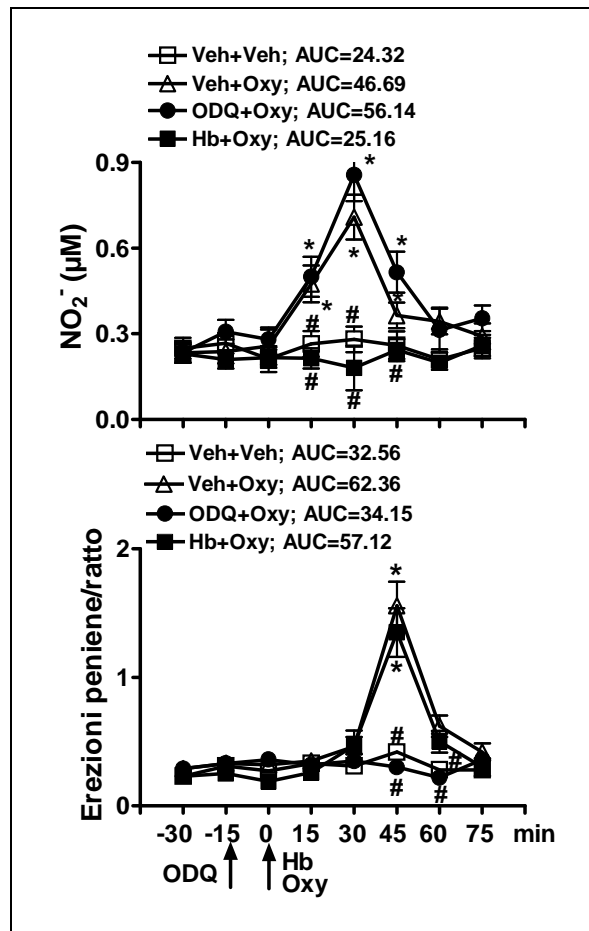


Figura 11. Effetto dell'ODQ o dell'emoglobina sulle erezioni peniene e sull'aumento delle concentrazioni di NO₂⁻ nella VTA caudale indotto dall'ossitocina iniettata nella VTA caudale. L'ODQ (40 µg) disciolto con una goccia di DMSO e diluito con fisiologica (0.3 µl), o il veicolo da solo (Veh), è stato iniettato nella VTA caudale 15 min prima dell'ossitocina (80 ng); l'emoglobina (40 µg) disciolta in fisiologica (0.3 µl), o la fisiologica da sola (Veh), è stata iniettata nella VTA caudale immediatamente prima dell'ossitocina (80 ng). Le altre condizioni sperimentali sono identiche a quelle riportate nella Legenda della Figura 9. I valori riportati sono le medie ± SEM di 6 ratti per gruppo. *P < 0.01 rispetto ai ratti trattati con veicolo; #P < 0.01 rispetto al gruppo corrispondente trattato con ossitocina da sola (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test).

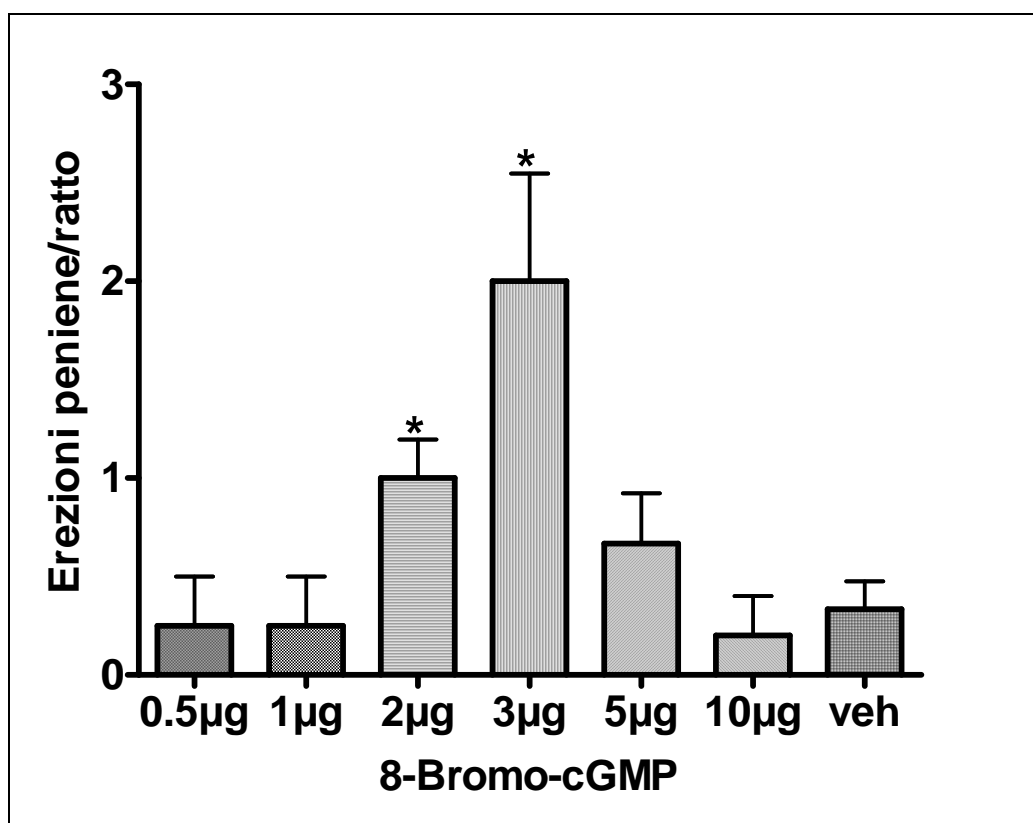


Figura 12. Effetto dell'8-bromo-GMP ciclico iniettato nella VTA caudale sull'erezioni peniene: curva dose-risposta. L'8-bromo-GMPc disciolto in fisiologica, o la fisiologica da sola (veh), è stato iniettato nella VTA caudale in un volume di 0.3µl. Dopo le iniezioni, gli animali sono stati messi individualmente in gabbie Plexiglas e osservati per 75 min durante i quali sono stati contati gli episodi di erezione peniena. I valori sono le medie ± SEM di 6 ratti per gruppo. *P < 0.01 rispetto ai ratti trattati con fisiologica (one-way ANOVA, seguita dal Tukey's multiple comparison test).

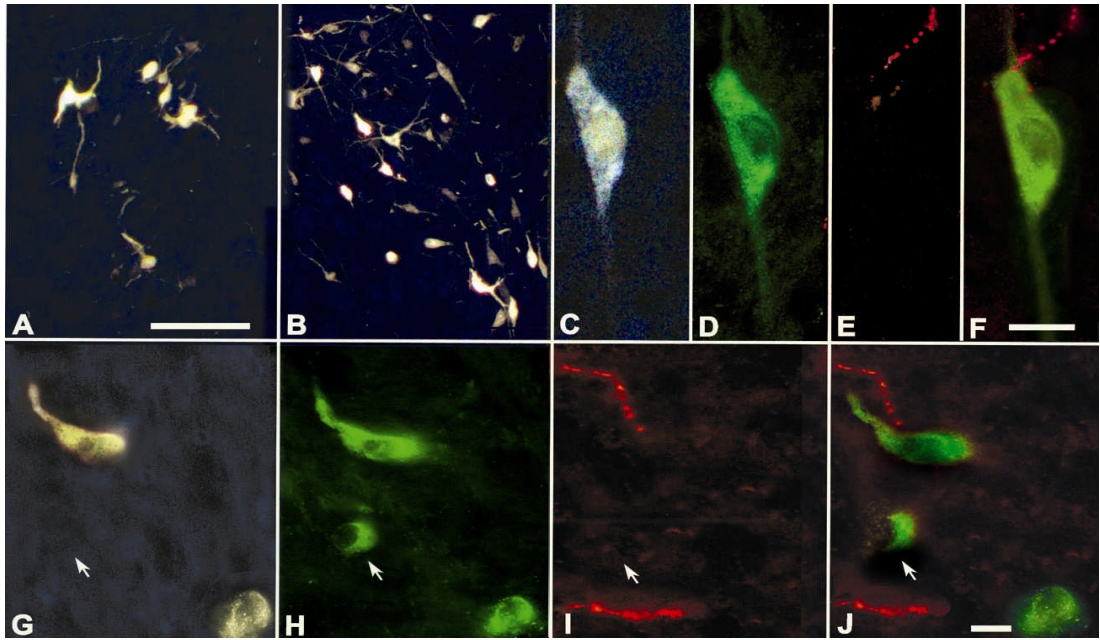


Figura 13. Marcatura retrograda ed immunoistochimica nella VTA. (A e B) dopo iniezione nello “shell” del nucleo accumbens, il FluoroGold marca molti neuroni nella VTA, che aumentano di numero nel passaggio dalla regione rostrale (panello A) della VTA a quella caudale (panello B). (C-J) Due esempi di neuroni immunoreattivi per la tirosina idrossilasi (TH) (D, F, H, J: colorazione in verde), molti dei quali risultano essere marcati dal FluoroGold iniettato nello “shell” del nucleo accumbens (C-D e G-H; la freccia in G-H indica un pericaria TH-immunoreattivo non marcato dal FluoroGold). Circa un terzo dei neuroni marcati dal Fluorogold ed immunoreattivi per la TH, mostra assoni ossitocinergici che impingono sul proprio corpo cellulare o che vi passano nelle vicinanze (E-F e I-J). Scala: 50 μ m (A e B); 20 μ m (C-F e G-J).

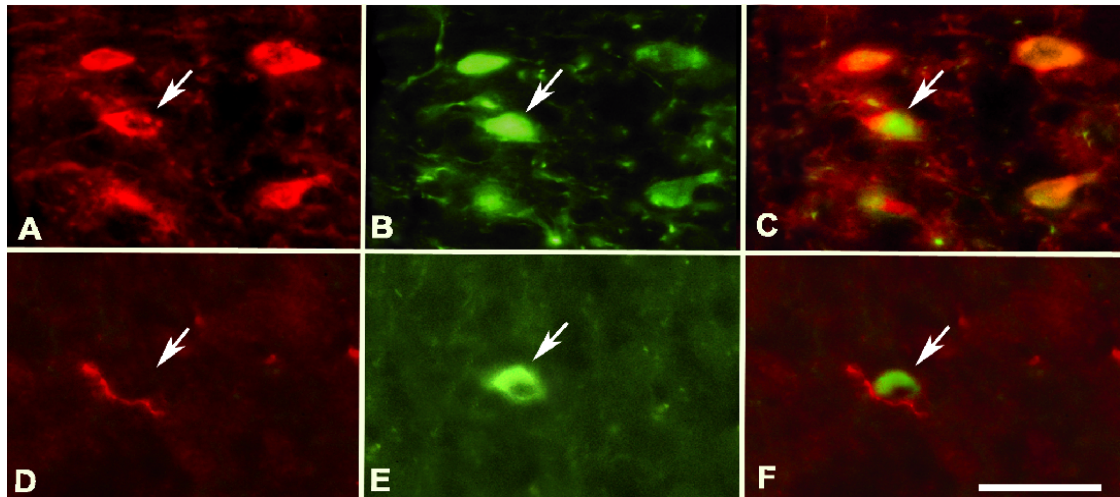


Figura 14. Doppia immunistochemica della VTA caudale. (A)-(F): Due sezioni seriali adiacenti sono state marcate per la guanilato ciclasi e per la TH (A-C), e per l'ossitocina e per la NO sintetasi (D-F). Un gruppo di neuroni della VTA marcati per la guanilato ciclasi (A e C, colorazione in rosso) risulta essere marcato anche per la TH (B e C: colorazione in verde). Indicato dalla freccia, viene mostrato un singolo pericarion neuronale immunoreattivo per la guanilato ciclasi e per la TH (A-C), ed anche per la NO sintetasi (E-F, colorazione in verde); questo neurone mostra anche uno stretto contatto da parte di un assone contenente ossitocina (D e F, colorazione in rosso). Scala: 60 μ m.

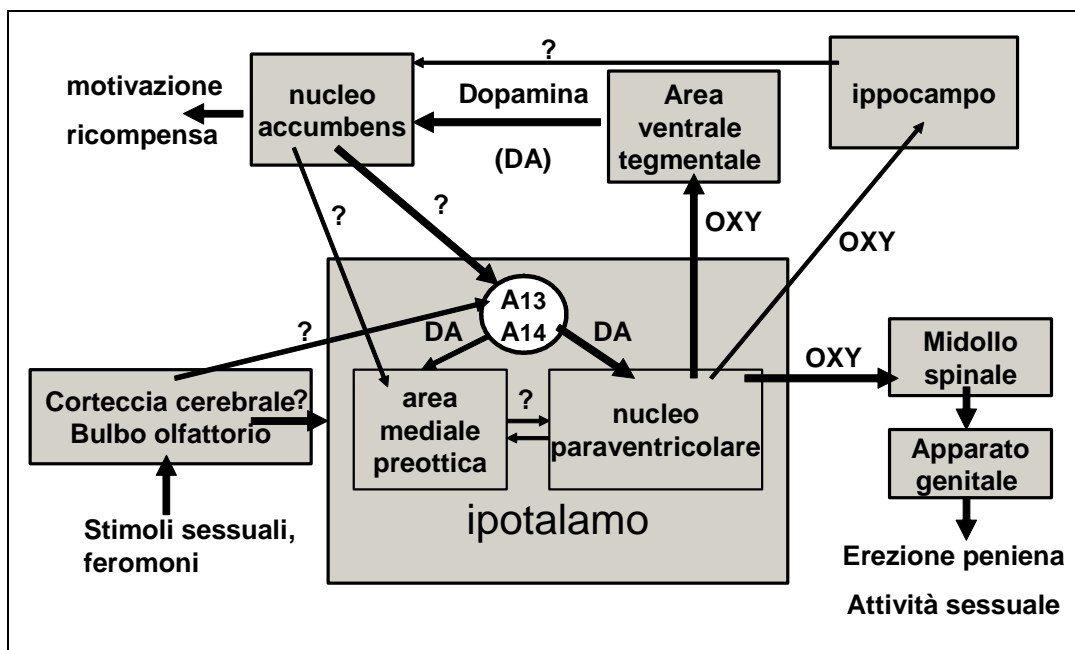


Figura 15. Schema di un ipotetico circuito neurale, che coinvolge la dopamina e l'ossitocina, in grado di influenzare la motivazione, il rinforzo e la performance sessuale, come suggerito dai risultati di questo ed altri lavori. Neuroni ossitocinergici che originano nel PVN e proiettano al midollo spinale quando attivati, per esempio dalla dopamina (ma anche da altri neurotrasmettitori), facilitano la risposta erettile e la performance sessuale. La dopamina nel PVN attiva anche neuroni ossitocinergici che proiettano alla VTA, che attivano a loro volta neuroni dopaminergici mesolimbici che proiettano al nucleo accumbens, modulando così la motivazione sessuale e il rinforzo esercitato dall'attività sessuale. La dopamina liberata nel nucleo accumbens attiva anche circuiti neurali ancora sconosciuti che aumentano l'attività dei neuroni dopaminergici incerto-ipotalamici (che originano dai gruppi A13 e A14 di Dahlstrom e Fuxe) che impingono tra l'altro sui corpi cellulari dei neuroni ossitocinergici del PVN, inclusi quelli che proiettano al midollo spinale e che mediano la risposta erettile. Questo circuito può essere attivato anche dall'ossitocina iniettata nella VTA caudale favorendo così la modulazione sia della motivazione che della risposta erettile. Altri neuroni ossitocinergici (e.g., quelli che proiettano all'ipocampo) possono fare parte di questo circuito dato che l'ossitocina favorisce la risposta erettile anche quando iniettata nell'ipocampo. Infine questo circuito può essere anche attivato dai feromoni rilasciati dalle femmine recettive, dato che la dopamina extracellulare aumenta nel PVN, nel nucleo accumbens e nell'area preottica mediale durante le erezioni senza-contatto mediate dai feromoni. (le voci bibliografiche appropriate sono riportate nel testo e nella Bibliografia).

INDICE

Introduzione	1
Materiali e Metodi	5
Risultati	10
Discussione	18
Conclusione	26
Bibliografia	27
Appendice	34

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare, in rigoroso ordine sparso, tutti coloro hanno permesso, da un punto di vista umano e professionale, che questo lavoro vedesse la luce ed arrivasse a compimento: il Prof. Antonio Argiolas, la Prof.ssa Maria Rosaria Melis, la Dott.ssa Salvatora Succu, la Dott.ssa Tiziana Melis, il Sig. Antonio Boi, il Prof. GianLuca Ferri, la Dott.ssa Cristina Cocco, il Dott. Giuliano Pillola, i miei Genitori Giorgio e Grazietta, i miei Suoceri Nicola e Michela, la mia Cognata preferita Giorgia, mio Fratello Gianuario, Elena, Lidia, la mia Figlioccia Giulia, la mia seconda Madre Michellina, Sabrina, Cristina, mio Padrino Salvatore, i miei Amici, tutti coloro che mi vogliono bene, e ancor di più quelli che mi vogliono male, tutti quelli a cui ho voluto bene e che non ci sono più, perché so che mi proteggono e mi guidano dall'alto nel cammino della vita.

Vorrei ringraziare in modo particolare, dal profondo del mio cuore, NATALIA, che con il suo supporto incondizionato e la sua infinita pazienza, la sua caparbia e comprensione fuori dal comune, giorno dopo giorno mi tiene per mano e mi sostiene, facendomi dono di una vita migliore; senza di Lei, non solo questo lavoro non sarebbe mai esistito, ma la mia vita intera non avrebbe senso.