



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN SCIENZE MORFOLOGICHE E FUNZIONALI**

Ciclo XXVIII

**OSSITOCINA NELLA SOSTANZA NERA DEL RATTO: AZIONE  
SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA E INTERAZIONE CON I NEURONI  
DOPAMINERGICI, GLUTAMMATERGICI E GABAERGICI NIGRALI**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/16

Presentata da	Dott.ssa Laura Angioni
Coordinatore Dottorato	Prof.ssa Valeria Sogos
Tutor	Dott.ssa Cristina Cocco

Esame finale anno accademico 2014 – 2015



*None but those who have experienced them  
can conceive of the enticements of science.  
In other studies you go as far as others  
have gone before you, and there is nothing  
more to know; but in a scientific pursuit there  
is continual food for discovery and wonder.*

*Mary Shelley, Frankenstein*



## **OXYTOCIN IN RAT SUBSTANTIA NIGRA: ACTION ON LOCOMOTOR ACTIVITY AND INTERACTION WITH NIGRAL DOPAMINERGIC, GLUTAMATERGIC AND GABAERGIC NEURONS**

Oxytocin, the neurohypophyseal hormone well-known for its hormonal role in lactation and parturition, also exerts a wide range of effects acting in the Central Nervous System as a neuromodulator or neurotransmitter. An increasing number of experimental studies have suggested that, in rodents, central oxytocin exerts also a modulatory role on locomotor activity, but little is known about the cerebral areas in which oxytocin might act to produce this effect.

The substantia nigra, a mesencephalic structure which is part of the basal ganglia, a group of interconnected nuclei involved in motor and non-motor functions, receives oxytocinergic projections from the parvocellular compartment of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Moreover, oxytocinergic receptors and oxytocin receptor messenger RNA have been shown to be present in human and rat substantia nigra, respectively. Furthermore, it has been demonstrated that a significant decrease in the number of oxytocin-immunoreactive neurons occurs in the paraventricular nucleus of patients suffering from Parkinson's Disease, a progressive neurodegenerative movement disorder characterised by the degeneration of the cell bodies of nigrostriatal dopaminergic neurons projecting to the dorsal striatum.

In order to investigate the role of nigral oxytocin in locomotor activity, a combined approach comprehensive of immunohistochemical, behavioural and lesion studies, has been used in male rats. First, the effect on locomotor activity of low and high doses of oxytocin, given intraperitoneally or into the substantia nigra, and of  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocin}$ , a selective oxytocin receptor antagonist, given into the lateral ventricles or into the substantia nigra, were studied in male rats habituated to the experimental conditions in order to avoid novelty-induced behavioural effects. Second, the presence of nigral oxytocinergic fibres and their localization with respect to nigral neurons immunoreactive for tyrosine hydroxylase (TH) (a marker of dopaminergic neurons) was investigated by immunohistochemistry. Finally, the effect on spontaneous locomotor activity of the bilateral injection into the substantia nigra of oxytocin-saporin (OXY-SAP), a recently discovered neurotoxin that specifically destroys neurons presenting oxytocinergic receptors on their surface, was studied in relation to the modifications induced in the dopaminergic, glutamatergic and GABAergic systems, assessed by immunohistochemistry using antibodies against TH, vesicular glutamate transporters (VGluT1, VGluT2 and VGluT3) and glutamate decarboxylase (GAD). Together, the results of the above experiments with oxytocin and  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocin}$  and those with OXY-SAP, which revealed the existence of a correlation between the changes in locomotor activity found in OXY-SAP-treated rats and the extent of the changes in nigral TH, VGluT1, VGluT2 and VGluT3 immunoreactivities measured at 28 days after OXY-SAP injection, provide support for a modulatory role of oxytocin on locomotor activity at the level of the substantia nigra.



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
1.1. ANATOMIA E FUNZIONI DEI GANGLI DELLA BASE .....	2
1.2. IL SISTEMA DOPAMINERGICO MESENCEFALICO .....	6
1.3. LA SOSTANZA NERA .....	10
1.3.1. CITOARCHITETTURA DELLA SOSTANZA NERA .....	10
1.3.2. PROIEZIONI AFFERENTI ALLA SOSTANZA NERA .....	12
1.4. INTERAZIONE TRA IL SISTEMA OSSITOCINERGICO ED IL SISTEMA DOPAMINERGICO .....	15
1.5. IL SISTEMA OSSITOCINERGICO .....	17
1.5.1. I RECETTORI OSSITOCINERGICI .....	20
1.5.2. OSSITOCINA E ATTIVITÀ LOCOMOTORIA .....	24
1.5.2.1. ATTIVITÀ LOCOMOTORIA ED ESPLORAZIONE .....	24
1.5.2.2. RUOLO DELL'OSSITOCINA NELL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA .....	25
1.5.3. OSSITOCINA, SOSTANZA NERA E MALATTIA DI PARKINSON .....	29
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>33</b>
3.1. ANIMALI.....	34
3.2. FARMACI E PEPTIDI .....	34
3.3. TRATTAMENTI FARMACOLOGICI .....	34
3.3.1.SOMMINISTRAZIONI PER VIA SISTEMICA .....	34
3.3.2.SOMMINISTRAZIONI NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE .....	34
3.3.2.1. IMPIANTO DELLE CANNULE GUIDA .....	35
3.3.2.2. MICROINIEZIONI NELLA SOSTANZA NERA E NEL VENTRICOLO LATERALE .....	35
3.3.3.TRATTAMENTI EFFETTUATI .....	36
3.3.3.1. SOMMINISTRAZIONE INTRAPERITONEALE DI OSSITOCINA .....	36
3.3.3.2. SOMMINISTRAZIONE INTRAPERITONEALE DI OSSITOCINA ACCOPPIATA ALLA SOMMINISTRAZIONE INTRACEREBROVENTRICOLARE DI $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ - vasotocina .....	36
3.3.3.3. SOMMINISTRAZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA NELLA SOSTANZA NERA .....	36
3.3.3.4. SOMMINISTRAZIONE BILATERALE $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina NELLA SOSTANZA NERA O UNILATERALE NEL VENTRICOLO LATERALE .....	36
3.3.3.5. INIEZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA .....	37

3.4. ATTIVITÀ LOCOMOTORIA .....	37
3.5. ISTOLOGIA .....	39
3.6. IMMUNOISTOCHEMICA.....	40
3.6.1.PREPARAZIONE DEI TESSUTI .....	40
3.6.2.IMMUNOCOLORAZIONI .....	41
3.7. STATISTICA .....	42
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>44</b>
4.1. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE INTRAPERITONEALE DI OSSITOCINA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CURVE DOSE-RISPOSTA E ANTAGONISMO DA PARTE DELLA $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina .....	45
4.2. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CURVE DOSE-RISPOSTA.....	48
4.3. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE BILATERALE DI $d(CH_2)_5Tyr(Me)_2-Orn^8$ -vasotocina NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA .....	50
4.4. EFFETTO DELL'INIEZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CONFRONTO CON L'EFFETTO INDOTTO DAL BIANCO-SAPORINA E DALLA PBS.....	52
4.5. IMMUNOISTOCHEMICA.....	55
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>62</b>
<b>6. CAPITOLO SUPPLEMENTARE .....</b>	<b>70</b>
6.1. INTRODUZIONE .....	74
6.2. MATERIALI E METODI .....	74
6.2.1.ANIMALI .....	74
6.2.2.FARMACI E PEPTIDI .....	74
6.2.3.INIEZIONE MONOLATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA .....	74
6.2.4.ATTIVITÀ LOCOMOTORIA .....	75
6.2.5.TURNING .....	75
6.2.6.DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI DOPAMINA NEL DIALIZZATO OTTENUTO BILATERALMENTE DALLO STRIATO DORSALE DI RATTI SOTTOPOSTI AD INIEZIONE CON OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS .....	76
6.2.7.STATISTICA .....	77
6.3. RISULTATI .....	79



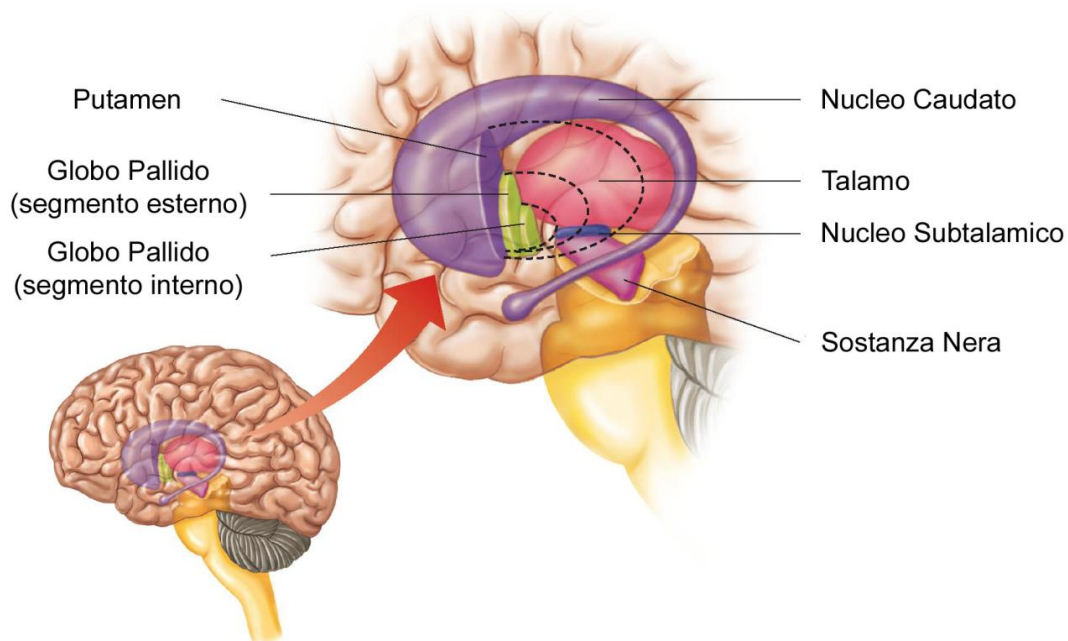
6.3.1.EFFETTO DELL'INIEZIONE MONOLATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CONFRONTO CON L'EFFETTO INDOTTO DAL BIANCO-SAPORINA E DALLA PBS.....	79
6.3.2.EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE SISTEMICA DI APOMORFINA O AMFETAMINA SUL TURNING IN RATTI INIETTATI CON OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA.....	80
6.3.3.EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE SISTEMICA DI AMFETAMINA SULLE CONCENTRAZIONI DI DOPAMINA NEL DIALIZZATO OTTENUTO BILATERALMENTE DALLO STRIATO DORSALE DI RATTI INIETTATI MONOLATERALMENTE CON OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA .....	83
6.4. DISCUSSIONE .....	86
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>89</b>

## **1. INTRODUZIONE**

## 1.1. ANATOMIA E FUNZIONI DEI GANGLI DELLA BASE

I Gangli della Base comprendono diversi nuclei sottocorticali tra loro interconnessi, situati nel telencefalo, nel diencefalo e nel mesencefalo, e coinvolti nella regolazione di diverse funzioni tra cui i processi motori, cognitivi, emozionali e mnemonici (Hauber, 1998). Il coinvolgimento dei Gangli della Base nel controllo delle funzioni motorie è noto da tempo grazie a studi sperimentali e clinici, i quali hanno messo in evidenza il loro contributo in diversi aspetti ad esse correlati tra cui: l'iniziazione e l'esecuzione dei movimenti (Denny-Brown and Yanagisawa, 1976; Evarts et al., 1981; Flowers, 1976; Hallett and Khoshbin, 1980; Wilson, 1925), la loro sequenza (Schwab et al., 1954), l'esecuzione automatica dei movimenti routinari (Marsden and Obeso, 1994), l'inibizione di programmi motori in competizione con i movimenti desiderati (Mink, 1996), l'apprendimento motorio (Kimura, 1995) e i meccanismi di gratificazione (Schultz, 1994).

I Gangli della Base comprendono lo striato, costituito dal nucleo caudato e dal putamen, i segmenti esterno ed interno del Globo Pallido, che nel ratto corrisponde al nucleo entopeduncolare, il Nucleo Subtalamico e la Sostanza Nera (Figura 1). Recentemente, è stato suggerito che anche il Nucleo Peduncolopontino, situato nel tronco encefalico, sia da considerarsi parte dei Gangli della Base, data la sua associazione anatomo-funzionale con essi e la capacità di influenzare l'attività di alcuni dei nuclei facenti parte di questo circuito (Mena-Segovia et al., 2004).



**Figura 1.** Nuclei del cervello umano appartenenti al circuito dei Gangli della Base.

Dal punto di vista funzionale lo striato è la principale stazione di input dei Gangli della Base e riceve proiezioni eccitatorie glutammatergiche topograficamente organizzate, provenienti dall'intera corteccia cerebrale e, in particolare, dalle cortecce frontale, prefrontale e parietale (DeLong and Wichmann, 2007; Flaherty and Graybiel, 1991).

I principali nuclei di output dei Gangli della Base (DeLong, 1990) sono il Globo Pallido interno e la *pars reticulata* della Sostanza Nera. Questi, attraverso vari nuclei talamici, proiettano a gran parte delle aree corticali del lobo frontale (Alexander et al., 1990). Il Globo Pallido interno e la *pars reticulata* della Sostanza Nera, inoltre, inviano degli output discendenti al tronco encefalico, specialmente al nucleo tegmentale peduncolopontino.

Lo striato può essere suddiviso in tre parti principali: il putamen ed il nucleo caudato, che costituiscono la parte dorsale dello striato (neostriato) e che nei roditori vengono anche identificati sotto il nome di Caudato-Putamen (non essendo, a differenza dei primati, tra loro separati dal braccio anteriore della capsula interna), e lo striato ventrale (Nucleus Accumbens). Questa suddivisione corrisponde approssimativamente alla tripartizione funzionale dei circuiti che connettono tra loro i Gangli della Base, il talamo e la corteccia:

1. i *circuiti sensori-motori* del putamen, con output verso la corteccia motoria primaria, la corteccia motoria supplementare e la corteccia premotoria, importanti nella pianificazione e nell'esecuzione del piano motorio volontario;
2. i *circuiti associativi* del nucleo caudato, con output alla corteccia prefrontale, importanti nell'ideazione del piano motorio volontario;
3. i *circuiti limbici* dello striato ventrale, con output alla corteccia cingolata anteriore e alla corteccia prefrontale mediale (DeLong, 1990; Parent and Carpenter, 1996). Lo striato ventrale (limbico) riceve inputs anche da parte di altre strutture limbiche, come l'amigdala e l'ippocampo (Joel and Weiner, 2000).

Il neostriato (striato dorsale), caratterizzato da un'organizzazione in compartimenti denominati "striosomi" e "matrice", distinguibili in base all'impiego di specifici marker immunoistochimici, proietta alle strutture di output dei Gangli della Base (Globo Pallido interno e *pars reticulata* della Sostanza Nera) attraverso due diverse vie: la *via diretta* e la *via indiretta* (Figura 2).

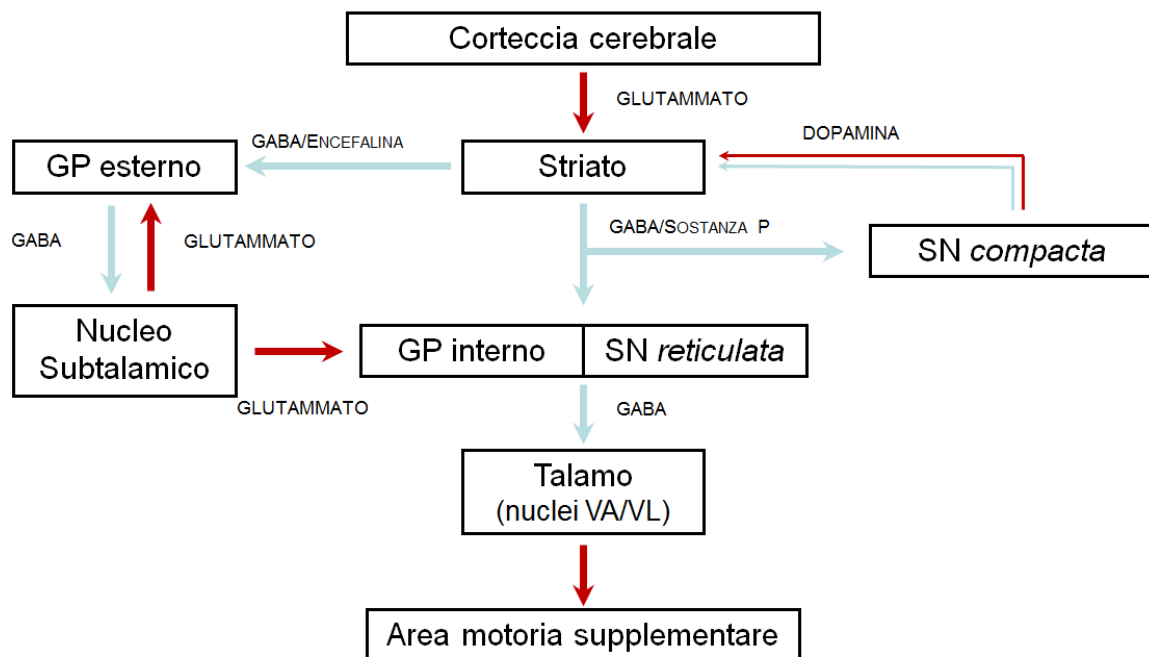
Nella *via diretta* lo striato invia proiezioni inibitorie, le quali impiegano vari neurotrasmettitori tra cui l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) e la Sostanza P, al segmento interno del Globo Pallido e alla *pars reticulata* della Sostanza Nera. Questi a loro volta inviano proiezioni GABAergiche inibitorie ai nuclei talamici ventrale anteriore e ventrale laterale. Dai nuclei

talamici partono infine efferenze eccitatorie glutammatergiche dirette alla corteccia prefrontale, premotoria e motoria supplementare.

La *pars reticulata* della Sostanza Nera proietta inoltre agli strati profondi del collicolo superiore, da cui parte la *via tetto-spinale* che interviene nel controllo del movimento della testa e del collo e nella regolazione dei movimenti oculari rapidi di tipo saccadico, e al nucleo Nucleo Peduncolopontino, che interviene nel controllo della locomozione e del tono muscolare posturale.

Nella *via indiretta* lo striato invia proiezioni inibitorie, che impiegano GABA ed encefalina, al segmento esterno del Globo Pallido il quale, a sua volta, invia proiezioni inibitorie GABAergiche al Nucleo Subtalamico. Da qui hanno origine efferenze glutammatergiche eccitatorie dirette al segmento interno del Globo Pallido.

I neuroni dello striato hanno una scarsa attività spontanea e si attivano solo durante i movimenti per azione delle afferenze corticali mentre i neuroni GABAergici del Globo Pallido interno e della *pars reticulata* della Sostanza Nera sono tonicamente attivi. L'attivazione della *via diretta* inibisce i neuroni del Globo Pallido interno e della *pars reticulata* della Sostanza Nera che, a loro volta, inibiscono i neuroni talamici determinando infine l'attivazione dei neuroni corticali. L'attivazione della *via indiretta* ha invece un effetto opposto: attiva il Globo Pallido interno e la *pars reticulata* della Sostanza Nera inibendo in tal modo la corteccia (DeLong, 1990). In questo modo le due vie si bilanciano a vicenda, modulando l'attività corticale.



**Figura 2.** Rappresentazione schematica delle vie diretta e indiretta nel circuito dei Gangli della Base. Le frecce rosse indicano proiezioni eccitatorie, quelle blu proiezioni inibitorie.

Abbreviazioni: SN= Sostanza Nera; GP= Globo Pallido; VA= nucleo ventrale anteriore; VL= nucleo ventrale laterale (adattata da Kandel et al., 1991 Principles of neural science, 3 ed. Elsevier).

Nonostante i considerevoli progressi, il ruolo dei Gangli della Base nel controllo del movimento e la funzione dei vari sistemi neurotrasmettitoriali che intervengono nella regolazione motoria non sono ancora stati chiariti in dettaglio.

I Gangli della Base, infatti, sono le regioni cerebrali dotate della più grande varietà di neurotrasmettitori e recettori (McGeer and McGeer, 1993). Molti di questi neurotrasmettitori sono associati a vie afferenti o a vie intrinseche al circuito dei Gangli della Base e interagiscono in maniera complessa con nuclei distinti.

Molti degli aspetti riguardanti il ruolo ed il significato funzionale dell'interazione di tali neurotrasmettitori nei vari aspetti del controllo motorio restano ancora da chiarire.

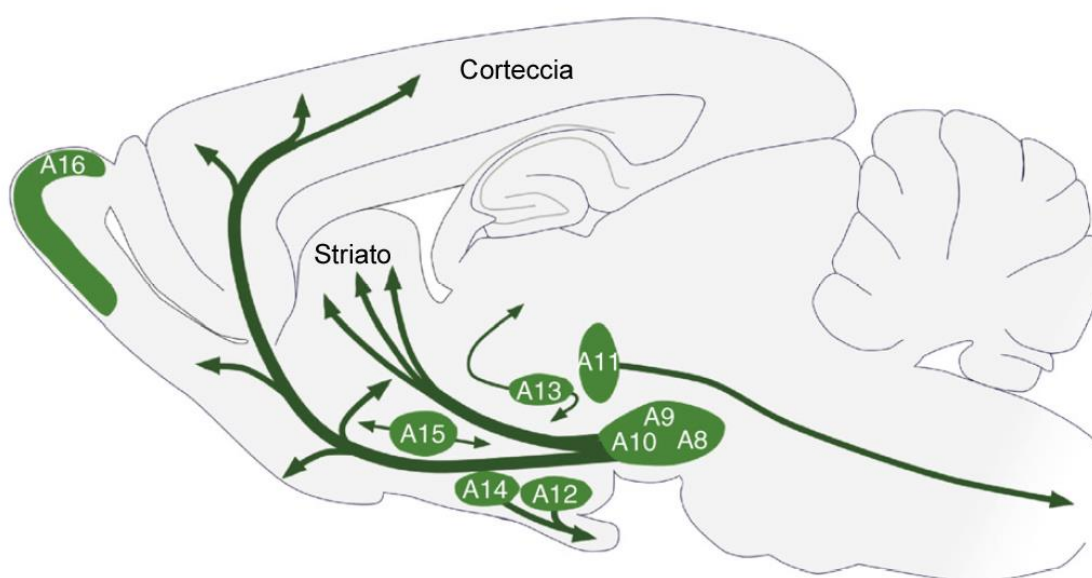
La dopamina è un neurotrasmettitore che interviene nella regolazione della risposta dei Gangli della Base agli stimoli corticali (Shen et al., 2008) e, a livello del sistema nervoso centrale, esercita un ruolo cruciale in diverse funzioni correlate al movimento, alla motivazione e alla gratificazione (Bolam et al., 2000; Graybiel, 2000).

Il ruolo della dopamina nel comportamento motorio è ben noto: la dopamina regola l'output neuronale (Gerfen and Surmeier, 2011) e la denervazione conseguente alla degenerazione del sistema dopaminergico induce delle alterazioni funzionali a carico del sistema dei Gangli della Base cui consegue l'insorgenza dei deficit motori tipici della malattia di Parkinson (Carlsson, 2002; Mallet et al., 2008; Wichman and Dostrovsky, 2011).

## 1.2.IL SISTEMA DOPAMINERGICO MESENCEFALICO

Nel cervello dei mammiferi i neuroni dopaminergici sono localizzati in nove distinti gruppi cellulari la cui distribuzione va dal mesencefalo al bulbo olfattorio (Figura 3). La numerazione di tali gruppi cellulari, che va da A8 a A16, è stata introdotta nel 1964 in seguito agli studi di Dahlström e Fuxe e a quelli successivi di Hökfelt e collaboratori (1984), sulla distribuzione dei neuroni catecolaminergici e serotoninergici a livello cerebrale.

Questa classificazione è tutt'oggi valida per due principali motivi: in primo luogo i gruppi neuronali catecolaminergici, in molti casi, non sono confinati in singole strutture anatomiche definite, in secondo luogo, la distribuzione dei corpi cellulari all'interno di ciascun gruppo neuronale varia notevolmente nelle diverse specie di mammiferi, e ancora di più tra i vertebrati (Parent et al., 1984; Smeets and Gonzalez, 2000). L'impiego di questa nomenclatura è pertanto notevolmente utile nella comparazione di dati provenienti da diverse specie animali.



**Figura 3.** Rappresentazione schematica della distribuzione dei gruppi neuronali dopaminergici in una sezione sagittale di cervello di rodente adulto. I gruppi cellulari sono numerati, secondo la classificazione di Dahlström e Fuxe, da A8 a A16. Le frecce illustrano le principali aree di proiezione dei gruppi cellulari dopaminergici (adattata da *Björklund and Dunnett, 2007*).

Il sistema dopaminergico mesencefalico comprende due sottotipi principali di neuroni dopaminergici: i neuroni della Sostanza Nera e quelli dell'Area Ventrale Tegmentale (VTA) che, secondo la classificazione di Dahlström e Fuxe, corrispondono alle aree A9 e A10 rispettivamente (dell'area A10 fanno parte anche il nucleo interfascicolare ed il nucleo lineare caudale). Nelle regioni dorsomediale e rostrale i neuroni dopaminergici della Sostanza Nera e della VTA vanno a costituire un unico corpo e ciò rende impossibile stabilire il confine tra

questi due nuclei mediante una semplice marcatura con la Tirosina Idrossilasi (TH), l'enzima che catalizza la tappa limitante la sintesi della dopamina, che viene impiegata come marker dei neuroni dopaminergici. Per tale motivo si fa spesso riferimento a queste due aree come al complesso Sostanza Nera-VTA.

Fa parte del sistema dopaminergico mesencefalico anche l'area A8, coincidente con l'area retrorubrale della formazione reticolare, che forma l'estensione dorsale e caudale dell'area A9 e che contiene neuroni che proiettano ad aree striatali, limbiche e corticali (*Bentivoglio and Morelli, 2005*).

Il sistema dopaminergico mesencefalico gioca un ruolo fondamentale nella regolazione funzionale dei circuiti che collegano la corteccia e i Gangli della Base agendo attraverso tre vie principali: la *via nigro-striatale*, la *via mesocorticale* e la *via mesolimbica*.

La *via nigrostriatale* è costituita dalle proiezioni dopaminergiche che hanno origine dai neuroni della *pars compacta* della Sostanza Nera e proiettano allo striato dorsale, principalmente al putamen. Bisogna tuttavia sottolineare che la Sostanza Nera non contiene solamente neuroni che proiettano allo striato, ma anche neuroni che proiettano ad aree corticali e limbiche (Figura 4).

La *via nigrostriatale*, che interviene nell'apprendimento e nella gratificazione ed è di fondamentale importanza nella corretta esecuzione dei movimenti (Wise, 2009; Haber, 2014), modula l'attività dei neuroni striatali in maniera complessa.

Secondo un modello semplificato, i neuroni striatali che formano la *via diretta* esprimono principalmente i recettori ad azione eccitatoria del tipo D1 (che stimolano l'adenilato ciclasi, con un aumento della produzione di cAMP, e incrementano l'attività della fosfolipasi C), mentre quelli della *via indiretta* esprimono principalmente i recettori ad azione inibitoria del tipo D2 (che inibiscono l'adenilato ciclasi, attivano l'efflusso di ioni  $K^+$  e inibiscono l'influsso di  $Ca^{2+}$ ). Nel complesso, attraverso l'attivazione della *via diretta* e l'inibizione di quella *indiretta* la dopamina esercita un'azione facilitatoria sull'attività motoria.

Nella malattia di Parkinson, la degenerazione dei neuroni dopaminergici della *pars compacta* della Sostanza Nera determina un'alterazione della modulazione dopaminergica sui circuiti che collegano funzionalmente la corteccia e i Gangli della Base determinando l'insorgenza di ipocinesia e difficoltà nell'iniziazione di diversi pattern motori, inclusa l'espressività facciale (Blair, 2003); in maniera opposta, un incremento dell'attività dopaminergica striatale causa ipercinesia (portando, ad esempio, ad una attivazione prematura o involontaria dei programmi motori).

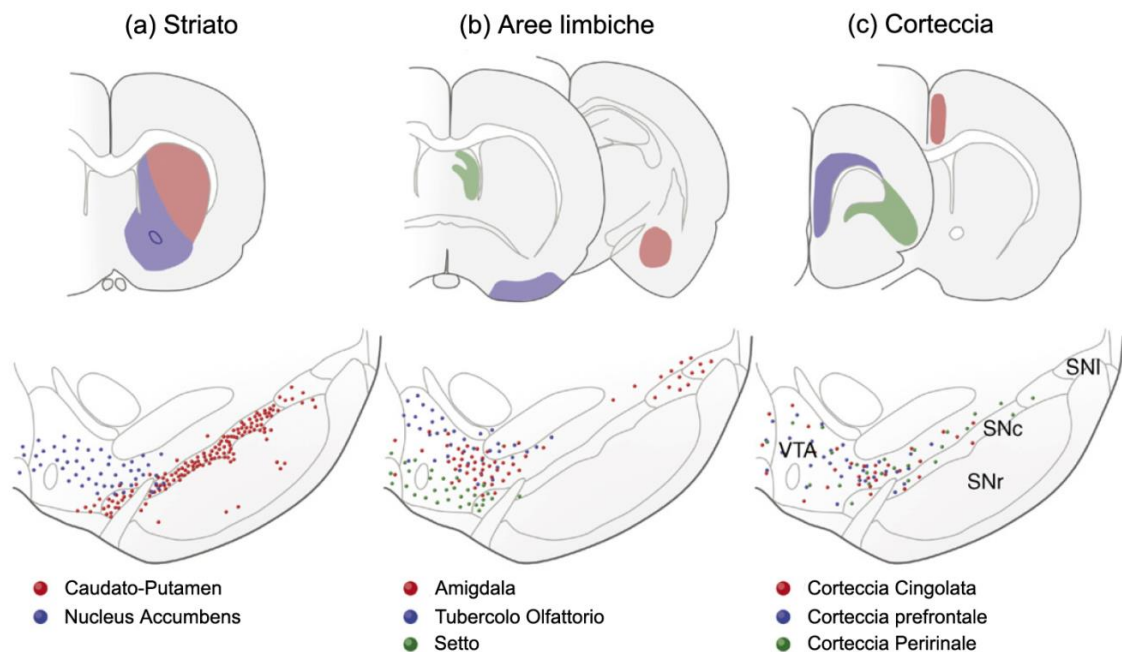
Le vie *mesocorticale* e *mesolimbica* originano entrambe dai neuroni dopaminergici della VTA e proiettano a diverse aree cerebrali. In particolare, la *via mesocorticale* proietta alla corteccia prefrontale mentre quella *mesolimbica* proietta allo striato ventrale (Nucleus Accumbens) e, nei roditori, alla porzione ventro-mediale della testa del caudato-putamen.



Queste vie sono coinvolte nel rinforzo dei comportamenti, nei comportamenti guidati dalla gratificazione, nella memoria di lavoro e nell'attenzione, nonché nell'esecuzione dei movimenti (Amalric and Koob, 1993; Beninger, 1983; Nieoullon, 2002; Wise, 2004; Haber, 2014).

Queste tre vie nervose sono anatomicamente e funzionalmente distinte ma recentemente è stato messo in evidenza che i neuroni da cui esse hanno origine non hanno una distribuzione spaziale segregata all'interno del complesso Sostanza Nera-VTA.

Nel ratto (Figura 4) e nella scimmia, infatti, l'innervazione dopaminergica striatale proviene non solo dalla pars compacta della Sostanza Nera, ma anche dai neuroni localizzati nella VTA laterale e nell'area A8; inoltre, i neuroni dopaminergici che proiettano ad aree corticali e limbiche sono localizzati non solo nella VTA ma anche nello strato dorsale della Sostanza Nera e nell'area A8.



**Figura 4.** Rappresentazione schematica della distribuzione dei neuroni da cui hanno origine le vie nigrostriatale, mesolimbica e mesocorticale, nel ratto. I neuroni dopaminergici che proiettano ad aree a) striatali, b) limbiche e c) corticali non hanno una distribuzione spazialmente segregata: i neuroni localizzati nello strato ventrale della pars compacta della Sostanza Nera [punti rossi in a)] innervano, probabilmente in maniera esclusiva, la porzione sensorimotoria del caudato-putamen [area rossa nell'inserito in (a)], mentre i neuroni dello strato dorsale comprendono neuroni che proiettano in maniera diffusa a regioni limbiche e corticali del prosencefalo, come illustrato in b) e c), rispettivamente.

Abbreviazioni: SNc: Sostanza Nera pars compacta; SNI: Sostanza Nera pars lateralis; SNr, Sostanza Nera pars reticulata; VTA: Ventral Tegmental Area (adattata da Björklund and Dunnett, 2007).

Studi recenti hanno messo in evidenza che la popolazione di neuroni dopaminergici del mesencefalo costituisce un gruppo molto più eterogeneo di quanto si ritenesse in passato. In base alla connettività ed alle caratteristiche morfologiche, essi possono essere

separati in due compartimenti, uno dorsale ed uno ventrale, che non sono nettamente separati dal punto di vista anatomico, ma sono tuttavia distinguibili dal punto di vista neurochimico e dello sviluppo (Alfahel-Kakunda and Silverman, 1997).

Lo strato dorsale include neuroni localizzati nella porzione dorsale della VTA e della Sostanza Nera e nell'area A8 che innervano aree dello striato ventrale, limbiche e corticali ed il compartimento della matrice dello striato dorsale (Bentivoglio and Morelli, 2005; Gerfen et al., 1987b; Lynd-Balta and Haber, 1994a). Questi neuroni hanno una forma tondeggiante o fusiforme, sono tipicamente positivi per la calbindina, una proteina legante il calcio, ed esprimono livelli relativamente bassi del trasportatore per la dopamina (DAT).

Lo strato ventrale comprende una lamina di neuroni densamente impaccati localizzati nelle parti ventrali della VTA e della Sostanza Nera. Questi neuroni sono negativi per la calbindina, esprimono livelli più elevati di DAT e sono per la maggior parte immunopositivi per la proteina dei canali ionici al potassio GIRK2 (G-protein Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channel) (Inanobe et al., 1999). I neuroni dello strato ventrale proiettano (probabilmente in maniera esclusiva) allo striato, dove innervano principalmente il compartimento degli "striosomi"; molti di questi neuroni possiedono dei dendriti ben visibili che proiettano ventralmente alla *pars reticulata* della Sostanza Nera (Gerfen et al., 1987b; Prensa and Parent, 2001).

I neuroni dopaminergici mesencefalici mostrano pertanto una complessa organizzazione in sottocompartimenti che differiscono tra loro per morfologia, ma anche per l'espressione di marker molecolari e per i pattern di proiezione al prosencefalo.

## 1.3. LA SOSTANZA NERA

### 1.3.1. CITOARCHITETTURA DELLA SOSTANZA NERA

La Sostanza Nera è un nucleo mesencefalico che gioca un importante ruolo nel controllo del movimento, agendo come principale centro di input e output dei Gangli della Base (Fink and Smith, 1980; Parent and Hazrati, 1995).

Dal punto di vista citoarchitettonico è stata suddivisa in tre diverse parti:

1. la Sostanza Nera *pars compacta*, uno strato orizzontale di cellule densamente impaccate, di grandi e medie dimensioni, che occupa il terzo dorsale della Sostanza Nera;
2. la Sostanza Nera *pars reticulata*, una sezione più ampia e meno ricca di cellule, contenente neuroni di piccole e medie dimensioni, localizzata tra la *pars compacta* e i peduncoli cerebrali;
3. la Sostanza Nera *pars lateralis*, un piccolo gruppo di cellule di medie dimensioni che si estende rostrocaudalmente lungo il confine laterale della *pars compacta* e della *pars reticulata* (Fallon e Loughlin, 1985; Yelnik et al., 1987; McRichie and Halliday, 1995; McRichie et al., 1996).

Sulla base dei neurotrasmettitori impiegati, i neuroni nigrali sono stati classificati in due distinte popolazioni che differiscono tra loro dal punto di vista funzionale: la popolazione dei neuroni dopaminergici e quella dei neuroni GABAergici (Dahlström and Fuxe, 1964; Hökfelt et al., 1984; Mugnaini and Oertel, 1985), entrambe implicate nella patogenesi di diversi disturbi dei Gangli della Base (Albin et al., 1989).

I neuroni dopaminergici che, come precedentemente riportato, corrispondono all'area A9 di Dahlström e Fuxe (1964), sono localizzati prevalentemente nella *pars compacta*, in misura minore nella *pars reticulata* e, in misura ancora minore, nella *pars lateralis* della Sostanza Nera. Dai neuroni dopaminergici localizzati negli strati dorsale e ventrale della *pars compacta* della Sostanza Nera ha origine la *via nigrostriatale* in senso stretto, che costituisce la principale fonte di innervazione dopaminergica dello striato sensori-motorio (Björklund and Dunnett, 2007).

I neuroni GABAergici sono sostanzialmente confinati nella *pars reticulata* della Sostanza Nera e solo una piccola parte di essi si trova nella *pars lateralis* (Hökfelt et al., 1984; Mugnaini and Oertel, 1985; Smith et al., 1987; Ficalora and Mize, 1989; German and Manaye, 1993; Nelson et al., 1996). Essi costituiscono uno dei più importanti output dei

Gangli della Base e proiettano al talamo, al collicolo e al tegmento (Grofova et al., 1982; Appell and Behan, 1990; Moriizumi et al., 1992; Redgrave et al., 1992).

Sebbene molte delle più rilevanti caratteristiche dell'area A9 siano conservate nei roditori e nei primati umani e non umani, esistono diverse differenze inter-specie.

Secondo gli studi di *Gerfen e collaboratori* (1987 a,b) la Sostanza Nera di ratto è una struttura laminare costituita da uno strato dorsale e uno ventrale, localizzati nella *pars compacta*, e da uno strato a localizzazione ventrale situato nella *pars reticulata* (Gerfen et al., 1987 a,b).

Gli studi di *González-Hernández e collaboratori* (2000) hanno invece individuato la presenza di due bande di neuroni dopaminergici densamente impaccati, una di ampie dimensioni a localizzazione rostr dorsale e una di dimensioni più piccole, a localizzazione caudoventrale, che emette dei ponti cellulari che prendono contatto con la banda rostr dorsale.

La banda rostr dorsale corrisponde ai neuroni dopaminergici degli strati dorsale e ventrale della *pars compacta* secondo *Gerfen e collaboratori*, mentre quella caudoventrale, con i relativi ponti cellulari, corrisponde ai neuroni dopaminergici a localizzazione ventrale nella *pars reticulata* secondo *Gerfen e collaboratori*.

Nei primati umani e non umani, sebbene sia riconoscibile una sorta di organizzazione in strati (Olszewski and Baxter, 1954), i neuroni dopaminergici nigrali formano degli aggregati sia nella porzione ventrale sia nella porzione dorsale della Sostanza Nera (McRitchie et al., 1996,1998). Inoltre, secondo *Damier e collaboratori* (1999a), nell'uomo i neuroni dopaminergici della Sostanza Nera hanno una distribuzione simile a quella dei neuroni striatali comprendente alcuni gruppi di neuroni dopaminergici (nigrosomi) disposti in un'area meno ricca in neuroni dopaminergici (matrice nigrale). Questa diversa organizzazione rende difficile l'identificazione di similitudini e differenze nelle varie specie.

Oltre alla dopamina e al GABA, altre sostanze neuroattive sono state identificate nella Sostanza Nera. Tra di esse vi sono la calbindina-D28k e la calretinina, espresse nei neuroni dopaminergici (Fortin and Parent 1996), e la parvalbumina, espressa nei neuroni GABAergici (Reiner and Anderson 1993), le quali appartengono alla classe delle proteine leganti il calcio (Baimbridge et al., 1992) e sono state relate alla neuroprotezione (Heizmann and Braun, 1992; Iacopino et al., 1992). Sembra pertanto che i neuroni dopaminergici, così come probabilmente quelli GABAergici, possano essere costituiti da differenti sottopopolazioni neuronali diverse dal punto di vista neurochimico, e che tali differenze neurochimiche possano essere coinvolte nelle loro proprietà fisiologiche e nella vulnerabilità al danno.

È stato infatti osservato che nella Malattia di Parkinson solo alcuni neuroni dell'area A9 sono altamente vulnerabili alla degenerazione. In particolare sembra che la degenerazione abbia inizio nei neuroni dopaminergici delle regioni ventrolaterali e caudali della Sostanza Nera e si estenda successivamente a quelli delle regioni dorsomediali e

ventrali e alla VTA, dove molti dei neuroni dopaminergici sono preservati fino agli stadi finali della malattia (Damier et al., 1999b).

### **1.3.2. PROIEZIONI AFFERENTI ALLA SOSTANZA NERA**

Tutti i nuclei appartenenti al circuito dei Gangli della Base proiettano alla Sostanza Nera, dove formano sinapsi con i neuroni dopaminergici e GABAergici in essa presenti. Le principali proiezioni afferenti alla Sostanza Nera sono GABAergiche e di natura inibitoria e provengono dallo striato e dal Globo Pallido, ad eccezione di quelle provenienti dal Nucleo Subtalamico, che sono di natura glutammatergica ed eccitatoria (Rinvik and Ottersen, 1993) e di quelle provenienti dal nucleo peduncolopontino (Rye et al., 1987), che sono in parte di natura glutammatergica e in parte di natura colinergica (Futami et al, 1995; Takakusaki et al., 1996) (Tabella 1). Sembra inoltre che la Sostanza Nera riceva proiezioni corticali discendenti di natura glutammatergica ed eccitatoria. È stato infatti dimostrato che lesioni a carico della corteccia risultano in una riduzione del contenuto di glutammato nella Sostanza Nera di ratto e in una degenerazione delle fibre della via cortico-nigrale (Affi et al., 1974; Carter, 1980; Kornhuber, 1984). L'esistenza delle proiezioni cortico-nigrali è stata inoltre confermata da studi con traccianti retrogradi (Bunney and Aghajanian, 1976).

La Sostanza Nera riceve proiezioni afferenti inibitorie GABAergiche provenienti dallo striato e dal Globo Pallido. I neuroni dopaminergici dell'intera *pars compacta* ricevono proiezioni dai neuroni GABAergici degli "striosomi" mentre i neuroni GABAergici della "matrice" striatale formano sinapsi principalmente con i neuroni non-dopaminergici della *pars reticulata* (Gerfen 1984; Holstein et al., 1986; Hedreen and DeLong, 1991; Smith and Bolam, 1991). I neuroni dello striato ventrale proiettano invece alla *pars compacta* e alla *pars reticulata* della Sostanza Nera mediale (Haber et al. 1990; Berendse et al., 1992; Lynd-Balta and Haber, 1994). A queste si aggiungono poi le proiezioni GABAergiche provenienti dal Globo Pallido che formano sinapsi con il corpo cellulare ed i dendriti prossimali dei neuroni nigrali (Smith and Bolam, 1990).

La *pars reticulata* della Sostanza Nera dà origine ad una delle più importanti, sebbene ancora poco caratterizzate, afferenze inibitorie dei neuroni dopaminergici nigrali. In aggiunta alle proiezioni a lungo raggio dirette al talamo ed al collicolo superiore, infatti, da questi neuroni hanno origine collaterali assoniche locali che mediano l'inibizione dei neuroni nigrali dopaminergici e GABAergici ad esse adiacenti. Tali collaterali assoniche arborizzano tanto nella *pars reticulata* quanto in quella *compacta*.

Le afferenze eccitatorie esercitano un'influenza notevolmente minore sulla Sostanza Nera e provengono da diversi nuclei, come i nuclei tegmentali laterodorsale e peduncolopontino, l'amigdala (Price and Amaral, 1981; Gonzales and Chesselet, 1990) ed il

Nucleo Subtalamico (Smith and Grace, 1992; Iribe et al., 1999) che gioca un ruolo di fondamentale importanza.

Le proiezioni efferenti dal Nucleo Subtalamico si portano principalmente alla *pars reticulata* e in misura minore alla *pars compacta* della Sostanza Nera, formando sinapsi principalmente con i dendriti di medie e piccole dimensioni della *pars reticulata* e solo raramente con i corpi cellulari (Chang et al., 1984). La maggior parte di queste sinapsi viene formata con dendriti immunonegativi per la Tirosina Idrossilasi - probabilmente di natura GABAergica - e in misura notevolmente inferiore con dendriti dopaminergici.

Nonostante, come sino ad ora esposto, i neuroni dopaminergici, localizzati prevalentemente nella *pars compacta* della Sostanza Nera e quelli GABAergici, localizzati principalmente nella *pars reticulata*, ricevano approssimativamente gli stessi inputs, alcuni di questi inputs esercitano un'azione più marcata sulla *pars reticulata*.

Gli effetti delle afferenze GABAergiche e glutammatergiche sono mediati principalmente da recettori di tipo ionotropico, la cui attivazione determina delle alterazioni rapide nella trasmissione sinaptica, ma spesso anche da recettori di tipo metabotropico. I sistemi neurotrasmettitoriali che non sono in grado di determinare risposte rapide esercitano un ruolo di tipo modulatorio (Misgeld, 2004).

**Tabella 1** Proiezioni afferenti alla Sostanza Nera e loro putativi neurotrasmettitori

Afferenze eccitatorie monosinaptiche		Afferenze inibitorie monosinaptiche	
Origine	Neurotrasmettitore	Origine	Neurotrasmettitore
Nucleo Subtalamico	Glutammato (AMPA/NMDA)	Striato	GABA
Amygdala	Glutammato	Globo pallido	GABA
Nucleo tegmentale Peduncolopontino	Glutammato/ACh (nicotinico)	<b>Afferenze modulatorie</b>	
Corteccia	Glutammato	Raphe dorsale	5-HT
Nucleo tegmentale laterodorsale Habenua	Glutammato	Nucleo tegmentale Peduncolopontino	ACh (muscarinico)

Abbreviazioni: NMDA= N-metil D-aspartato; ACh= acetilcolina; 5-HT= serotonina (Misgeld, 2004)

Le afferenze modulatorie comprendono quelle colinergiche provenienti dal Nucleo Peduncolopontino e quelle serotoninergiche provenienti dal nucleo dorsale del raphe. Le proiezioni afferenti dal Nucleo Peduncolopontino, come precedentemente detto, sono di duplice natura e costituiscono l'unica fonte di inputs di natura colinergica per i neuroni dopaminergici nigrali. Le afferenze colinergiche, in particolare, formano sinapsi con i corpi cellulari ed i dendriti sia dei neuroni dopaminergici sia di quelli GABAergici.

La Sostanza Nera riceve anche proiezioni afferenti serotoninergiche che originano dai corpi cellulari posti nel nucleo dorsale del raphe, le quali formano sinapsi con i dendriti dei neuroni dopaminergici e non-dopaminergici delle *pars compacta* e *reticulata* (Moukhles et al., 1997).

Oltre alle proiezioni afferenti sopra citate, la Sostanza Nera riceve afferenze ossitocinergiche provenienti dal Nucleo Paraventricolare dell'Ipotalamo (PVN) (Adan et al., 1995; Mai et al., 1993; Sofroniew, 1980,1983; Zimmerman et al., 1984). Ben poco è noto a riguardo della localizzazione della distribuzione di tali afferenze nella Sostanza Nera o sulla loro funzione, sebbene l'interazione tra i sistemi ossitocinergico e dopaminergico sia ampiamente nota e studiata in altre aree cerebrali in relazione a diversi aspetti funzionali e comportamentali.

## 1.4. INTERAZIONE TRA IL SISTEMA OSSITOCINERGICO E IL SISTEMA DOPAMINERGICO

Un crescente numero di evidenze sperimentali anatomiche, funzionali e comportamentali ha messo in evidenza l'esistenza di un'interazione tra i sistemi ossitocinergico e dopaminergico. Tale interazione ha con molta probabilità un'origine filogenetica antica, come dimostrato dal fatto che nei roditori essa è di fondamentale importanza nella regolazione di comportamenti sociali complessi come il legame di coppia ed il comportamento materno (Skuse and Gallagher, 2009).

Dal punto di vista anatomico in alcune aree cerebrali, tra cui la corteccia frontale, lo striato ventrale e la VTA, sono presenti siti recettoriali e afferenze di natura sia ossitocinergica sia dopaminergica (Melis et al., 2007; Meyer-Lindenberg et al., 2011). Inoltre, gran parte dei neuroni ossitocinergici ipotalamici dell'area preottica mediale, del nucleo sopraottico (SON) e del PVN esprimono tutte e tre le isoforme dei recettori dopaminergici del tipo D2 (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub>) (Baskerville et al., 2009). In aggiunta a questo, recentemente, a livello dello striato dorsale e mediale, è stata dimostrata l'esistenza di eteromeri tra i recettori dopaminergici del tipo D2 e i recettori ossitocinergici. L'interazione allosterica tra questi recettori è promossa dall'ossitocina, la quale sembra rendere maggiormente disponibile il sito ortosterico del recettore D2 favorendone il riconoscimento da parte degli agonisti dopaminergici (Romero-Fernandez et al., 2013).

Dal punto di vista funzionale i sistemi ossitocinergico e dopaminergico intervengono nel mantenimento dell'omeostasi cardiovascolare (Pyner, 2009) e nella modulazione dell'erezione peniena (Succu et al., 2008). In particolare, nel ratto, la stimolazione dei recettori dopaminergici del sottotipo D<sub>2</sub> localizzati sui corpi cellulari dei neuroni ossitocinergici del PVN induce erezione peniena (Sanna et al., 2011).

Dal punto di vista comportamentale è noto che la stimolazione delle vie centrali dopaminergiche o di quelle ossitocinergiche esercita effetti simili su alcuni comportamenti sociali e affiliativi, come il comportamento sessuale ed il legame di coppia (Baskerville and Douglas, 2009; Wang and Aragona, 2004). L'ossitocina, che è in grado di attivare le vie dopaminergiche mesocorticolimbica e nigrostriatale, influisce infatti sulla formazione dei legami sociali e di coppia (Liu and Wang, 2003; Young and Wang, 2004). Studi di imaging funzionale hanno inoltre dimostrato che nell'uomo le aree del tegmento ventrale, che sono coinvolte nelle attività legate alla gratificazione sociale dopamino-mediata e all'elaborazione degli stimoli sociali, si attivano in seguito alla somministrazione di ossitocina (Schott et al., 2008; Groppe et al., 2013).

Nell'amigdala, invece, un'interazione anomala tra la dopamina e l'ossitocina è stata associata alla compromissione della funzionalità socio-cognitiva che si manifesta in pazienti



affetti da schizofrenia (Rosenfeld et al., 2011). In pazienti con disturbi psichiatrici quali l'autismo, la depressione e il deficit dell'attenzione con iperattività (Park et al., 2010) si osservano spesso disturbi comportamentali e deficit sociali che suggeriscono che una compromissione nell'integrazione tra le vie dopaminergica e ossitocinergica possa essere in parte responsabile dei disturbi della sfera sociale riscontrati in questi pazienti (Baskerville and Douglas, 2010).

## 1.5. IL SISTEMA OSSITOCINERGICO

L'ossitocina è un neormone peptidico costituito da nove amminoacidi (*Cys*<sup>1</sup>-*Tyr*-*Ile*-*Gln*-*Asn*-*Cys*<sup>6</sup>-*Pro*-*Leu*-*Gly*-*NH*<sub>2</sub>) nel quale i residui cisteinici in posizione 1 e 6 sono uniti mediante un ponte disolfuro a formare una struttura ciclica (Figura 5).

L'ossitocina venne scoperta nel 1906 da Sir Henry Dale, il quale osservò che estratti ottenuti dall'ipofisi posteriore umana inducevano la contrazione dell'utero in una gatta gravida. Da tale osservazione nacque il nome ossitocina, coniato dallo stesso Sir Henry Dale a partire dalle parole greche  $\omega\kappa\nu\zeta$  "veloce" e  $\tau\omicron\kappa\omicron\chi\zeta$  "parto". L'ossitocina è stata inoltre il primo ormone peptidico ed essere sequenziato e sintetizzato, nel 1953, da Vincent du Vigneaud (Taylor and du Vigneaud, 1953; Mueller et al., 1953; Ressler et al., 1953; du Vigneaud et al., 1953) che, due anni più tardi, fu insignito del premio Nobel per il suo lavoro.

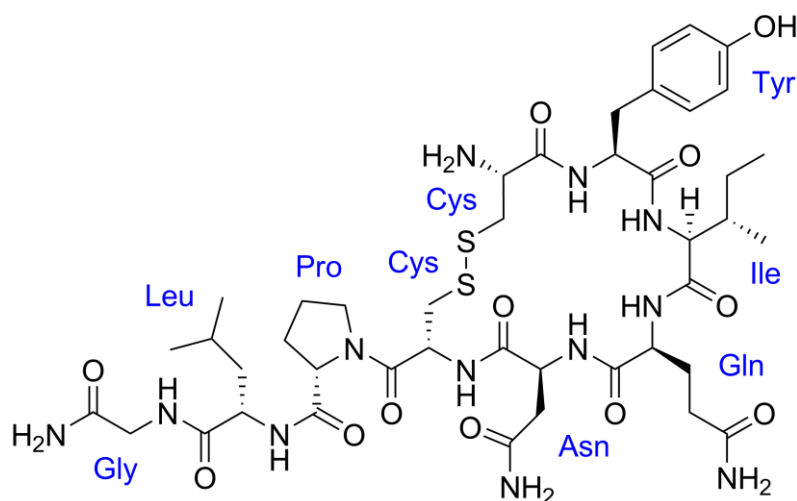


Figura 5. Formula di struttura dell'ossitocina

L'ossitocina, la cui sintesi avviene *in vivo* principalmente a livello del Sistema Nervoso Centrale, sembra essere prodotta anche in diversi tessuti periferici (cuore, midollare del surrene, timo, pancreas, adipociti, placenta, ovaio, cellule interstiziali di Leydig del testicolo) ed esercita un ampio spettro di effetti, a livello centrale e periferico, agendo sia come ormone sia come neurotrasmettitore o neuromodulatore (Argiolas et al., 1990; Melis et al., 1993; Ivell et al., 1997; Hoare et al., 1999; Gimpl and Fahrenholz, 2001).

Sebbene l'ossitocina prodotta a livello periferico non attraversi facilmente la barriera ematoencefalica, ad oggi non è ancora chiaro se l'ossitocina rilasciata a livello centrale e quella rilasciata a livello periferico si combinino e agiscano in maniera sinergica, così come non sono ancora state completamente chiarite le vie attraverso cui l'ossitocina, rilasciata a livello centrale, interviene in specifici aspetti comportamentali (Grinevich et al., 2016).

Nel Sistema Nervoso Centrale, l'ossitocina viene sintetizzata non solo nei nuclei ipotalamici sopraottico (SON) e paraventricolare (PVN), da cui hanno origine i due principali sistemi ossitocinergici (Tabella 2) - il sistema ossitocinergico magnocellulare ed il sistema ossitocinergico parvocellulare - ma anche da neuroni ossitocinergici sensibili agli estrogeni disseminati in aree cerebrali adiacenti al PVN (regione periventricolare dell'ipotalamo, area preottica mediale, nucleo del letto della stria terminale e nucleo subcommissurale laterale) (Jirikowski et al., 1988; Argiolas and Gessa, 1991).

**Tabella 2** Principali sistemi ossitocinergici nel Sistema Nervoso Centrale

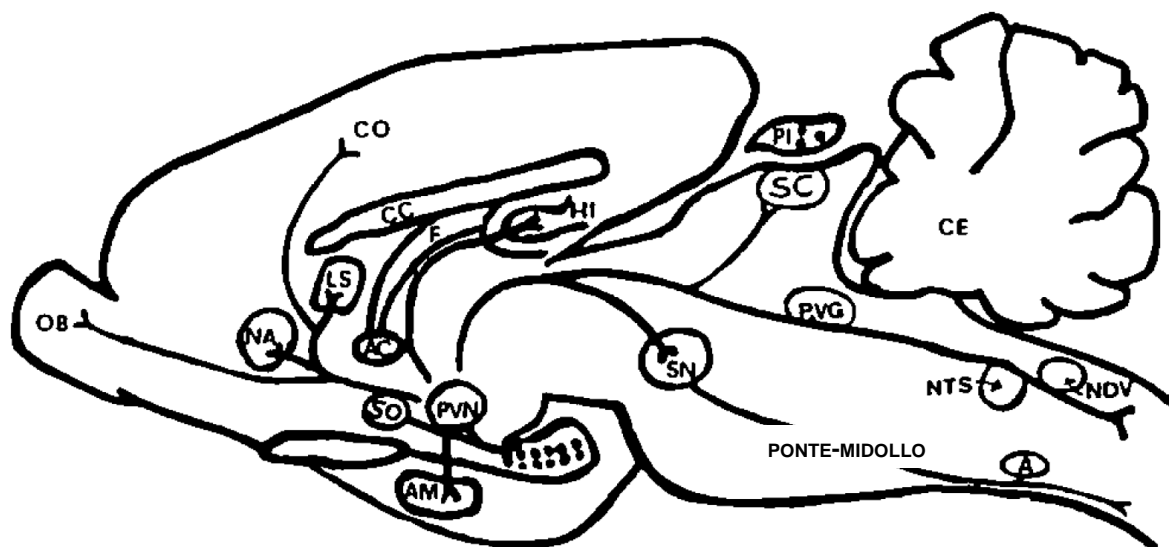
SISTEMA OSSITOCINERGICO	ORIGINE	PROIEZIONI	FUNZIONE
<b>MAGNOCELLULARE</b> (assonale)	SON/PVN	neuroipofisi	parto, contrazioni uterine, eiezione del latte
<b>MAGNOCELLULARE</b> (dendritico)	SON/PVN	SON/PVN, aree extraipotalamiche	autoregolazione del rilascio, stimolazione endocannabinoide
<b>PARVOCELLULARE</b>	PVN	setto laterale, ippocampo	memoria e apprendimento
		MPOA	comportamento materno
		PVN, VTA, ippocampo, MPOA	erezione peniena, comportamento copulatorio, lordosi, sbadiglio
		ippocampo, setto	tolleranza ai narcotici, dipendenza
		tegmento ventrale, area ventrale del setto	grooming
		complesso del nucleo midollare vestibolare, area ventrale del setto	disturbi motori, barrel rotations
		?	assunzione di cibo
		nucleo motorio dorsale del vago	regolazione autonoma e cardiovascolare
		area preottica	termoregolazione
		?	effetto antidepressivo

Abbreviazioni: MPOA= area preottica mediale; SON= nucleo sopraottico; PVN= nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; VTA= area ventrale tegmentale (adattata da Argiolas and Gessa, 1991 e Baskerville and Douglas, 2010).

Il sistema ossitocinergico magnocellulare ha origine dai neuroni magnocellulari del SON e del PVN. Il rilascio di ossitocina a partire da tali neuroni può avvenire, per via assonale, nell'ipofisi posteriore (neuroipofisi) (Poulain and Wakerley, 1982) o, per via somatodendritica, negli stessi SON e PVN, a partire dai quali potrebbe essere in grado di raggiungere, mediante diffusione, siti distanti. Il rilascio di ossitocina per via assonale avviene in seguito all'ingresso di calcio extracellulare che si ha in risposta ad un potenziale

d'azione mentre il rilascio per via somatodendritica è innescato dalla liberazione di calcio dai depositi intracellulari ed è indipendente dall'attività elettrica neuronale (Ludwig et al., 2002, 2006).

L'ossitocina liberata dalla neuroipofisi nella circolazione sistemica esercita un importante ruolo ormonale intervenendo in diverse funzioni fisiologiche legate alla riproduzione, tra cui la contrazione della muscolatura liscia uterina durante il parto e quella delle cellule mioepiteliali durante la lattazione; mentre quella rilasciata a livello somatodendritico nel PVN e nel SON interviene nell'autoregolazione del proprio rilascio (Moos et al., 1984,1989; Newman et al., 1993 a,b).



**Figura 6.** Rappresentazione schematica delle proiezioni ossitocinergiche nel cervello di ratto. Nel ratto la presenza di fibre e terminali ossitocinergici è stata descritta in varie aree cerebrali: il nucleo dorsomediale dell'ipotalamo, alcuni nuclei talamici, l'ippocampo ventrale e dorsale, il subicolo, la corteccia entorinale, i nuclei del setto laterale e mediale, l'amigdala, il bulbo olfattorio, il nucleo grigio centrale del mesencefalo, la Sostanza Nera, il locus coeruleus, i nuclei del raphe, il nucleo del tratto solitario e il nucleo motorio dorsale del vago. Fibre ossitocinergiche corrono anche in prossimità della ghiandola pineale e del cervelletto e molte di esse si portano al midollo spinale. Alcune fibre ossitocinergiche terminano a livello dei capillari del sistema portale a livello dell'eminenza mediana (Buijs et al., 1985; Kozłowski and Nilaver, 1986; Richard et al., 1991; Sawchenko and Swanson, 1985; Sofroniew, 1985).

Abbreviazioni: A= nucleo ambiguo; AC= nucleo commissurale anteriore; AM= amigdala; CC= corpo calloso; CE= cervelletto; CO= corteccia; F= fimbria del fornice; HI= ippocampo; LS= setto laterale; NA= nucleus accumbens; NDV= nucleo motorio dorsale del vago; NTS= nucleo del tratto solitario; OB= bulbo olfattorio; PI= ghiandola pineale; PVG= grigio periacqueduttale; PVN= nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; SC= collicolo superiore; SN= sostanza nera; SO= nucleo sopraottico VTA= area ventrale tegmentale (adattata da Argiolas and Gessa, 1991).

Il *sistema ossitocinergico parvocellulare* (Figura 6) ha origine dai neuroni parvocellulari del PVN. Questi neuroni proiettano a numerose aree cerebrali extraipotalamiche, tra cui aree appartenenti al sistema limbico (come l'ippocampo,

l'amigdala, l'ipotalamo ed il nucleus accumbens), al romboencefalo (come il ponte ed il tronco cerebrale) e al mesencefalo (come la Sostanza Nera e la VTA), alla corteccia frontale e al midollo spinale (Buijs,1978; Hawthorn et al., 1985; Lang et al., 1983; Sofroniew, 1983). A livello delle aree cerebrali extraipotalamiche l'ossitocina è localizzata in vescicole sinaptiche dalle quali, in seguito a stimoli fisiologici o farmacologici, viene rilasciata, sia *in vivo* sia *in vitro*, mediante un meccanismo calcio-dipendente che ne dimostra l'azione in qualità di neurotrasmettitore o neuromodulatore (Landgraf et al., 1988; Lawrence et al., 1985).

Attraverso il sistema ossitocinergico parvocellulare, l'ossitocina rilasciata a livello cerebrale e spinale interviene nella neuromodulazione di un'ampia varietà di funzioni e comportamenti legati e non legati alla sfera sociale. Tra i comportamenti legati alla sfera sociale figurano la memoria sociale, l'attaccamento, il comportamento sessuale, l'erezione peniena, lo sbadiglio (Argiolas and Melis, 2004,2005,2013; Melis et al., 1997; Melis and Argiolas, 2011), il comportamento materno, l'aggressività, il legame di coppia e la fiducia. I comportamenti non legati alla sfera sociale includono l'apprendimento e la memoria (Bohus et al., 1978; Tomizawa et al., 2003), la nutrizione, la respirazione, la digestione, l'attività cardiaca, il bilancio energetico, la termoregolazione, la natriuresi, la regolazione endocrina ed immunitaria e la percezione del dolore (Argiolas and Gessa, 1991; Petersson, 2002; Yang et al., 2013).

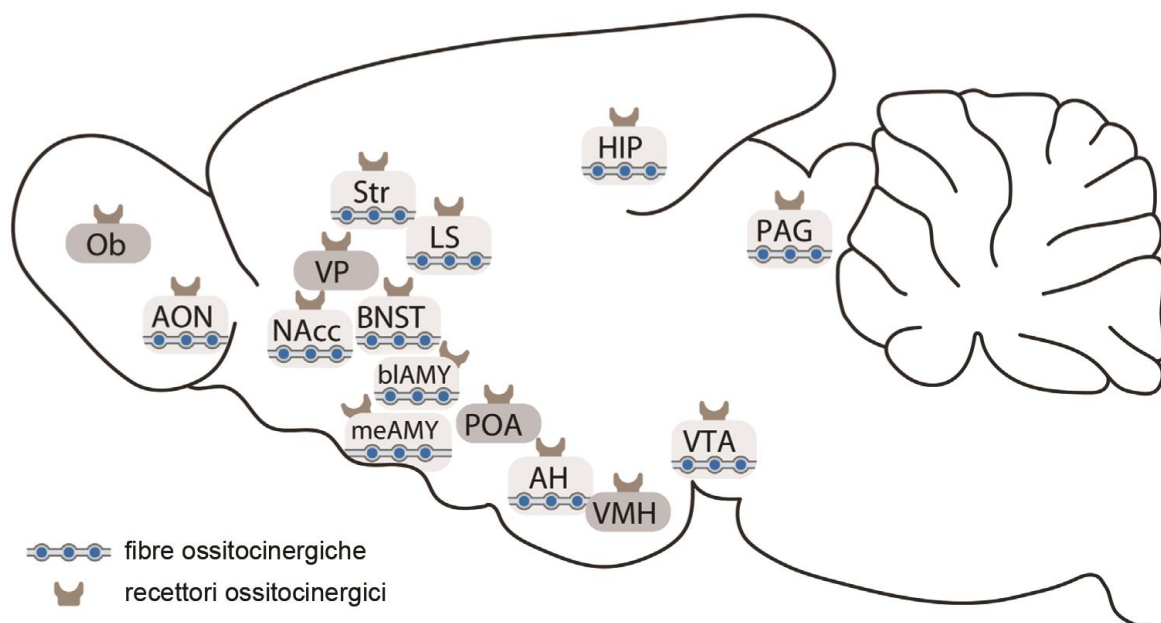
Alterazioni a carico della neurotrasmissione ossitocinergica a livello centrale sembrano inoltre essere associate a differenti patologie neuropsichiatriche tra cui la depressione, la schizofrenia, l'autismo, l'ansia, l'anoressia e la bulimia nonché alla tolleranza e alla dipendenza (Baskerville and Douglas, 2010; Love, 2014; Sarnyai and Kovacs, 2014; Guastella et al., 2015).

### **1.5.1. I RECETTORI OSSITOCINERGICI**

Il recettore ossitocinergico è costituito da una catena polipeptidica di 388 o 389 residui amminoacidici, nel ratto e nell'uomo rispettivamente, e appartiene alla famiglia dei recettori a sette segmenti transmembranari associati a proteine G. Il legame dell'ossitocina al suo recettore determina una cascata di eventi intracellulari che culminano in una serie di risposte che comprendono un incremento nella frequenza di scarica neuronale (*firing*), il rilascio di neurotrasmettitore, la fosforilazione proteica ed il rilascio della muscolatura liscia. A differenza degli altri recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G, i recettori per l'ossitocina subiscono importanti fenomeni di *up-* e *down-regulation* cellula-specifici (Hazzard and Stormshak, 1997; Zanos et al., 2015) e, in alcuni tessuti, come l'utero, il rene, l'ipofisi ed il nucleo ventromediale dell'ipotalamo, la loro espressione è stimolata dagli estrogeni (Ostrowski et al., 1995; Quiñones-Jenab et al., 1997).

I pattern di espressione e localizzazione dei recettori ossitocinergici mostrano notevoli differenze tra le varie specie suggerendo che alcune delle attività esercitate da questo neuroormone siano specie-specifiche.

Nel ratto i recettori ossitocinergici sono abbondantemente espressi, a livello periferico, in ambo i sessi, nel tratto riproduttivo e nelle cellule mioepiteliali del tessuto mammario (Gimpl and Fahrenholz, 2001; Zhang et al., 2005). Questi recettori sono abbondantemente rappresentati anche a livello dell'intero Sistema Nervoso Centrale, dove sono spesso espressi a livello delle medesime regioni che ricevono afferenze ossitocinergiche (Figura 7), senza rilevanti differenze di distribuzione tra i due sessi. È stato però dimostrato che, indipendentemente dal ciclo estrale, nelle femmine di ratto si ha una ridotta densità dei siti di legame per l'ossitocina, rispetto a quanto riscontrato nei maschi, nella maggior parte delle aree cerebrali del prosencefalo coinvolte nella gratificazione (Dumais et al., 2013).



**Figura 7.** Distribuzione spaziale dei recettori ossitocinergici e degli assoni ossitocinergici nel cervello di ratto. Esiste una pressoché completa sovrapposizione tra i recettori e gli assoni ossitocinergici ad eccezione di quattro aree cerebrali - il bulbo olfattivo (Ob), il pallido ventrale (VP), l'area preottica mediale (POA) ed il nucleo ventromediale dell'ipotalamo (VMH) - che esprimono i recettori ossitocinergici ma non ricevono proiezioni ossitocinergiche dirette.

Abbreviazioni: AH= ipotalamo anteriore; AON= nucleo olfattivo anteriore; bIAMY= amigdala basolaterale; BNST= nucleo del letto della stria terminale; HIP= ippocampo; LS= setto laterale; NAcc= nucleus accumbens; meAMY= amigdala mediale; PAG= grigio periacqueduttale; Str= striato; VTA= area tegmentale ventrale (adattata da Grinevich et al., 2016).

Oltre che a livello del SON e del PVN, principali nuclei di origine del sistema ossitocinergico centrale, i recettori ossitocinergici si trovano espressi anche in alcune regioni della corteccia, nell'ippocampo, nel sistema limbico, nei Gangli della Base, nell'area preottica mediale, nei bulbi olfattivi, nell'amigdala e nel tronco encefalico (Freund-Mercier et al., 1994;

Yoshimura et al., 1993). L'RNA messaggero per i recettori dell'ossitocina è stato riscontrato in aree cerebrali che coincidono per la maggior parte con quelle a livello delle quali gli stessi recettori sono espressi (Yoshimura et al., 1993). I recettori ossitocinergici sono ampiamente espressi anche nei segmenti toracico e lombare del midollo spinale, a livello delle corna dorsali, della commessura dorsale grigia e della colonna intermedio-laterale (Veronneau-Longueville et al., 1999).

Tuttavia, l'immunopositività per l'ossitocina è stata riscontrata in un numero di regioni cerebrali ridotto rispetto all'ampia distribuzione cerebrale dei suoi recettori. Tale osservazione ha condotto, negli ultimi venti anni, ad ipotizzare l'esistenza di una profonda discrepanza tra la distribuzione delle fibre e dei recettori ossitocinergici all'interno di numerose aree cerebrali (Grinevich et al., 2016). A livello dell'amigdala e dei bulbi olfattivi, infatti, si osserva una elevata proporzione di recettori ossitocinergici rispetto alle afferenze ossitocinergiche da essi ricevute (Ferguson et al., 2001; Huber et al., 2005; Baskerville and Douglas, 2008). Tale ipotesi ha per lungo tempo supportato l'idea secondo la quale l'ossitocina rilasciata a livello centrale potesse diffondere in aree cerebrali distanti per esercitare la sua azione, agendo principalmente come neuromodulatore ad azione permissiva.

Recentemente però, mediante l'utilizzo di tecniche basate sull'impiego di vettori virali e del marker fluorescente Venus, *Knobloch e collaboratori* (2012) hanno dimostrato la presenza di proiezioni ossitocinergiche in tutte le principali aree del prosencefalo. La rilevazione di immunosegnale per l'ossitocina mediante l'impiego di tale marker fluorescente si è dimostrata limitata, così come riscontrato in lavori precedenti che impiegavano tecniche immunostochimiche classiche, a causa del basso contenuto di peptide presente in condizioni basali, ad indicare che la presenza dell'ossitocina a livello assonale sia legata allo stato di attivazione cellulare. Allo stesso modo, la rivelazione dei siti di legame recettoriale per l'ossitocina potrebbe dipendere dallo stato funzionale del sistema ossitocinergico. In regioni cerebrali in cui sono presenti elevate concentrazioni di ossitocina si potrebbe pertanto verificare una *down-regulation* dell'espressione recettoriale a livelli tali da renderli non rilevabili, come dimostrato ad esempio dal fatto che durante la lattazione, i recettori ossitocinergici sono rilevabili nel SON, PVN e nei nuclei accessori solo dopo la somministrazione in acuto di un antagonista recettoriale che ne prevenga la *down-regulation* (Freund-Mercier et al., 1994).

Ad oggi è pertanto evidente la completa sovrapposizione tra le aree che ricevono afferenze ossitocinergiche e quelle che ne esprimono i recettori: le regioni che esprimono i recettori ossitocinergici in quantità relativamente elevate ricevono una rilevante innervazione ossitocinergica. Un'apparente discrepanza è limitata esclusivamente a quattro regioni cerebrali: il bulbo olfattorio, il pallido ventrale, l'area preottica mediale ed il nucleo

ipotalamico ventromediale. Tali regioni esprimono infatti elevati livelli dei recettori per l'ossitocina ma non sembrano ricevere proiezioni ossitocinergiche dirette.



## 1.5.2. OSSITOCINA E ATTIVITÀ LOCOMOTORIA

### 1.5.2.1. ATTIVITÀ LOCOMOTORIA ED ESPLORAZIONE

Col termine attività locomotoria ci si riferisce al movimento da un luogo ad un altro. Nei roditori la locomozione è una delle più importanti componenti dell'attività esploratoria che, a sua volta, è una delle principali attività nel repertorio dell'attività spontanea dell'animale.

L'attività locomotoria e quella esploratoria sono entrambe coinvolte in molte funzioni fisiologiche e comportamentali e influenzate da molteplici fattori, sia estrinseci sia intrinseci.

Tra i fattori estrinseci figurano le condizioni ambientali (luce, temperatura, rumore) e la *novelty* (esposizione per la prima volta ad una situazione/ambiente nuovo). Quando esposto ad una situazione nuova, infatti, l'animale mostra interesse e paura; si possono pertanto manifestare, contemporaneamente, atteggiamenti di approccio, essendo la *novelty* il principale fattore scatenante il comportamento esploratorio, o di evitamento, quantomeno in fase iniziale.

Tra i fattori intrinseci figurano invece i ritmi circadiani (i ratti sono animali notturni e tendono ad essere considerevolmente più attivi durante le ore notturne e le prime ore del mattino), la privazione di acqua o cibo (un animale affamato può essere più attivo ed avere dunque una attività esploratoria più elevata rispetto ad un animale sazio), la precedente manipolazione da parte dell'operatore (ratti che non siano stati manipolati con regolarità dall'operatore hanno una più elevata tendenza ad immobilizzarsi rispetto a quelli sottoposti a manipolazione), l'età (i ratti anziani tendono ad essere meno attivi di quelli giovani), il genere (le femmine tendono ad essere più attive rispetto ai maschi), il ceppo e molti altri fattori.

In ambito sperimentale l'attività locomotoria basale viene generalmente valutata in specifiche arene (ad esempio un *open-field*), per brevi o intermittenti periodi di tempo (generalmente inferiori ad 1 ora), nelle quali è possibile misurare, manualmente o attraverso sistemi automatizzati, diversi parametri, tra cui la locomozione (attività orizzontale), l'esplorazione (attività verticale - o *rearing* - e object sniffing) e le stereotipie (movimenti non accompagnati da spostamenti).

Bisogna altresì sottolineare che il comportamento assunto dall'animale nell'*open-field* è considerato, nei roditori da laboratorio, un indicatore di emozionalità, in particolare di paura ed ansia (Prut and Belzung, 2003; Ramos and Mormede, 1998; Ramos et al., 2003; Nosek et al., 2008). Un'arena vuota, di ampie dimensioni e illuminata che sia sconosciuta all'animale, viene percepita da esso come un ambiente sgradevole e spaventoso ed il comportamento assunto dall'animale stesso riflette la sua reazione a tale evento stressogeno.

È ampiamente accettato che lo stress indotto dalla *novelty* e dall'illuminazione induce un comportamento simil-ansioso che si manifesta sotto forma di un'inibizione della locomozione

e del *rearing*; l'incremento di tali parametri indotto dalla somministrazione di farmaci a effetto ansiolitico efficaci in ambito clinico, come ad esempio gli agonisti pieni dei recettori per le benzodiazepine, è pertanto considerato un indice dell'abbassamento dei livelli di ansia (Carli et al., 1989; Ramos and Mormede, 1998; Prut and Belzung, 2003).

### 1.5.2.2. RUOLO DELL'OSSITOCINA NELL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA

Una serie di evidenze funzionali, ottenute mediante studi condotti sui roditori (topi e ratti), ha da tempo suggerito che l'ossitocina sia in grado di esercitare un'azione modulatoria sull'attività locomotoria. Alcuni di questi studi erano volti specificamente a indagare l'effetto dell'ossitocina sull'attività locomotoria mentre, in altri, tale azione veniva riportata collateralmente all'effetto esercitato dalla stessa in relazione ad altri aspetti funzionali o comportamentali.

Gli studi condotti su topi maschi a cavallo tra gli anni Settanta e gli anni Ottanta da *Delanoy e collaboratori* (1978) hanno dimostrato che la somministrazione intracerebroventricolare di ossitocina nel range di dosi 0.1-1 µg esercita un effetto dose dipendente che comprende, a basse dosi, iperattività e intenso *grooming* e, a dosi elevate, *scratching* stereotipato e *squeaking* mentre, successivamente, quelli di *Meisenberg* (1981) hanno riportato che, sempre nei topi maschi, a dosi comprese tra 10 ng e 31.25 µg la somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v.), ma non quella sottocutanea (s.c.), determina, alle dosi più alte, un leggero incremento dell'attività locomotoria senza influenzare il *rearing*.

Recentemente, in uno studio volto a valutare il potenziale dell'ossitocina nel trattamento dell'obesità e dell'iperfagia è stato invece dimostrato che la somministrazione intranasale di ossitocina (0.1, 1 e 10 µg/10 µl) è incapace di modificare l'attività locomotoria a tutte le dosi testate mentre, quella intraperitoneale (i.p.) (40 e 400 µg/kg) la riduce alla dose di 400 µg/kg (Maejima et al., 2015).

Nel ratto maschio è stato dimostrato che l'ossitocina è in grado di determinare una modificazione dei pattern dell'attività motoria spontanea. Utilizzando l'arena di un *open-field* è stato osservato che basse dosi di ossitocina (1-10 µg/kg s.c.) determinano un incremento della percentuale di tempo speso dall'animale al centro dell'arena rispetto a quello speso in periferia, senza modificazioni nell'attività locomotoria totale; dosi più alte (250-1000 µg/kg s.c.) determinano invece una riduzione dell'attività locomotoria totale senza alterazioni nel pattern dell'attività locomotoria all'interno dell'arena stessa. Mentre l'azione esercitata a basse dosi è simile a quella indotta da principi attivi ad azione ansiolitica, alte dosi di ossitocina esercitano un'azione simile a quella di principi attivi ad azione sedativa (Uvnäs-Moberg et al., 1992,1994). Gli effetti simil-ansiolitici dell'ossitocina, così come quelli sedativi, sono con molta probabilità legati a un'azione del neuropeptide a livello centrale, come

dimostrato dal fatto che sono osservabili anche in seguito alla somministrazione intracerebroventricolare. Inoltre, l'effetto ansiolitico indotto da questo neuropetide può essere bloccato dalla somministrazione a livello centrale (intracerebroventricolare) di diversi antagonisti dell'ossitocina (Ring et al., 2006; Waldherr and Neumann, 2007; Windle et al., 2006; Neumann et al., 2000).

Gli studi di *Klenerova e collaboratori* (2009) hanno portato a risultati simili dimostrando che nel ratto maschio basse dosi di ossitocina (0.05 mg/kg i.p.) determinano un incremento dell'attività locomotoria, persistente per diversi giorni, correlabile ad un effetto di tipo ansiolitico, mentre una dose più alta (1.0 mg/kg i.p.) determina una riduzione dell'attività locomotoria e del *rearing*. L'incremento dell'attività locomotoria è bloccato dalla somministrazione di diversi antagonisti dell'ossitocina (1.0 mg/kg i.p.) (L-368,899, atosiban e cpmProp-D-Tyr-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Orn-NH<sub>2</sub> dotato di una selettività 100 volte superiore) mentre la riduzione dell'attività esplorativa indotta dalla somministrazione di 1.0 mg/kg di ossitocina è antagonizzata solo parzialmente.

Oltre agli studi sopra riportati, che hanno indagato gli effetti della somministrazione in acuto di diverse dosi di ossitocina, altri studi hanno analizzato gli effetti indotti sull'attività locomotoria dalla somministrazione ripetuta di questo neuropetide.

*Crine e collaboratori* (1983) hanno infatti dimostrato che nel ratto maschio la somministrazione per 5 giorni consecutivi di ossitocina (0.055 - 0.220 µg/05 ml i.p.) determina, alla dose di 0.11 µg, un incremento statisticamente significativo dell'attività locomotoria generale e del *rearing*, suggerendo una capacità dell'ossitocina di indurre, in base alla dose somministrata, delle variazioni nell'attività locomotoria dovute, a loro volta, ad una modificazione nell'arousal piuttosto che nei livelli di emozionalità.

Lo studio di *Petersson e collaboratori* (1999) ha dimostrato invece che, a due giorni di distanza dal pretrattamento con ossitocina (1 mg/kg s.c. una volta al giorno per 5 giorni consecutivi), non è osservabile alcuna modificazione dell'attività locomotoria e della locomozione in avanti (*forward locomotion*) sebbene tale pretrattamento sia capace di potenziare le modificazioni indotte dalla somministrazione (sempre 2 giorni dopo il pretrattamento con ossitocina) di un agonista dei recettori  $\alpha_2$ -adrenergici, la clonidina (100 µg/kg s.c.). Quello che si osserva nello specifico è una maggiore riduzione dell'attività locomotoria e un più marcato incremento della *forward locomotion* in risposta alla clonidina, rispetto agli animali pretrattati con la sola soluzione fisiologica. Tale effetto suggerisce che il pretrattamento con ossitocina è in grado di aumentare la responsività dei recettori  $\alpha_2$ -adrenergici del sistema nervoso centrale.

Nel ratto il sistema ossitocinergico è sessualmente dimorfico. Le femmine mostrano una minore densità di siti di legame per l'ossitocina in diverse aree cerebrali, tra cui il caudato-putamen dorsale (Dumais et al., 2013) e, sebbene l'ossitocina regoli i medesimi

comportamenti in entrambi i sessi (accoppiamento, legame sociale), nelle femmine gli effetti indotti sono tipicamente più intensi (Cushing et al., 2001; Insel and Young, 2001).

Studi condotti su animali ovariectomizzati hanno dimostrato che nelle femmine di ratto la dose necessaria all'induzione di un incremento dell'attività al centro dell'arena di un *open-field* è pari a 100 µg/kg s.c., rispetto alle dosi di 1-10 µg/kg s.c. che nei maschi sono sufficienti a indurre il medesimo effetto, mentre la dose di 1000 µg/kg s.c. induce sedazione in ambo i sessi. Nelle femmine, inoltre, gli effetti esercitati dall'ossitocina sull'attività locomotoria spontanea dipendono dai livelli degli ormoni sessuali steroidei femminili (Petersson et al., 1998).

Recentemente, in uno studio di *Zhou e collaboratori* (2015) volto a comparare gli effetti dose-risposta della somministrazione in acuto di ossitocina (0.1, 0.3, 1 e 3 mg/kg i.p.) sull'attività locomotoria indotta dalla *novelty* in ratti maschi e in femmine liberamente ciclanti, è stato dimostrato che, quando l'osservazione comportamentale avviene dopo 30 minuti dalla somministrazione dell'ossitocina, nelle femmine questo neuropeptide è in grado di sopprimere l'attività locomotoria a dosi più basse rispetto a quelle necessarie nei maschi (nei quali solo la dose di 3 mg/kg i.p. è efficace). Questo stesso gruppo di ricerca, in uno studio successivo (Leong et al., 2015) ha invece dimostrato che, entro 30 minuti dalla sua somministrazione, l'ossitocina, alle dosi di 0.3, 1 e 3 mg/kg i.p. per le femmine e 0.1, 0.3, 1 e 3 mg/kg i.p. per i maschi, è in grado di determinare una riduzione dell'attività locomotoria di pari entità in ambo i sessi.

In contrasto a quanto sino ad ora riportato, *Petersson e collaboratori* (2005) hanno riscontrato che la somministrazione subcronica di ossitocina per via sottocutanea o intravaginale (1 mg/kg s.c. o 100 µg/kg i.vag.) una volta al giorno per 10 giorni è in grado di determinare, in ratti ovariectomizzati, un incremento della *forward locomotion* mentre l'attività locomotoria totale aumenta solo in seguito alla somministrazione per via sottocutanea.

Dal momento che l'ossitocina agisce come potente modulatore dei processi di gratificazione, non solo naturali ma anche legati all'assunzione di sostanze d'abuso, attraverso l'interazione a livello centrale con il sistema dopaminergico mesolimbico (van Heuven-Nolsen et al., 1984; Versteeg, 1982), diversi studi presenti in letteratura si sono focalizzati sull'effetto esercitato da questo neuropeptide sulle modificazioni dell'attività locomotoria indotte dalla somministrazione di sostanze d'abuso come la cocaina e la anfetamina.

Agli inizi degli anni Novanta *Kovacs e collaboratori* (1990) hanno osservato che nel topo maschio l'ossitocina (1.0 e 5.0 µg/kg s.c.), pur non essendo di per se capace di indurre modificazioni nell'attività locomotoria, è in grado di antagonizzare parzialmente l'iperattività indotta dalla somministrazione in acuto di cocaina grazie alla capacità di influenzare la neurotrasmissione dopaminergica nel nucleus accumbens ma non nel nucleo caudato.

*Sarnyai e collaboratori* (1991) hanno invece evidenziato che nel ratto maschio la somministrazione sottocutanea o intracerebroventricolare di ossitocina è in grado di attenuare i comportamenti stereotipati indotti dalla cocaina (*sniffing*) agendo probabilmente a livello di alcune aree cerebrali del prosencefalo basale, tra cui il nucleus accumbens e il tubercolo olfattorio.

In uno studio comparativo, condotto sul ratto, *Leong e collaboratori* hanno osservato che la somministrazione in acuto di ossitocina (0.1, 0.3, 1.0 e 3.0 mg/kg) è in grado di attenuare l'incremento dell'attività basale indotto dalla somministrazione di cocaina in maniera significativa nelle femmine, nelle quali la cocaina stessa determina un incremento dell'attività basale più pronunciato (van Haaren and Meyer 1991; Walker et al., 2001), ma non nei maschi.

*Qi e collaboratori* (2008) hanno invece dimostrato che, nel topo maschio, la somministrazione di ossitocina (0.1, 0.5 e 2.5 µg i.c.v.), sebbene sia di per se priva di effetti sull'attività locomotoria, inibisce in maniera dose-dipendente l'iperattività indotta dalla somministrazione in acuto di metanfetamina. Tale effetto è probabilmente mediato dai recettori ossitocinergici, essendo antagonizzato completamente dalla somministrazione di una antagonista selettivo per i recettori dell'ossitocina (atosiban 2.0 µg i.c.v.), attraverso un'alterazione del turnover della dopamina nelle aree mesolimbiche. Nel ratto maschio è stato invece dimostrato che l'ossitocina (0.3 e 1 mg/kg i.p.) determina una massiccia riduzione dell'iperattività e del *rearing* indotto dalla somministrazione in acuto di metanfetamina fino a valori simili a quelli degli animali trattati con la sola metanfetamina (Carson et al., 2010).

### 1.5.3. OSSITOCINA, SOSTANZA NERA E MALATTIA DI PARKINSON

Come precedentemente esposto, la Sostanza Nera fa parte del circuito dei Gangli della Base, implicato nel controllo motorio, e la degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali, i cui corpi cellulari sono localizzati nella *pars compacta* della Sostanza Nera, è responsabile dei disturbi motori associati alla Malattia di Parkinson.

La Sostanza Nera è anche una delle aree cerebrali che ricevono proiezioni e terminali ossitocinergici dai neuroni parvocellulari del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (Adan et al., 1995; Mai et al., 1993; Sofroniev, 1983; Zimmerman et al., 1984).

Studi di ibridazione *in situ* condotti sul ratto hanno inoltre dimostrato la presenza dell'RNA messaggero per i recettori ossitocinergici a livello della porzione mediale della *pars compacta* (Vaccari et al., 1998) mentre, studi di immunostochimica condotti sull'uomo hanno dimostrato l'espressione del tradotto proteico a livello della *pars compacta* ma non della *pars reticulata* (Loup et al., 1989,1991). In particolare, nell'uomo, a differenza di altre specie, la densità dei siti di legame per l'ossitocina nella *pars compacta* è particolarmente elevata suggerendo, non solo che i neuroni dopaminergici nigrostriatali possano essere un target dell'ossitocina ma anche che il sistema ossitocinergico possa essere coinvolto nelle funzioni, motorie e non-motorie, dei Gangli della Base.

L'ipotalamo è una delle aree cerebrali comunemente colpite nella Malattia di Parkinson e, nel 1994, *Purba e collaboratori* hanno dimostrato, sempre mediante tecniche immunostochimiche, che nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo di pazienti affetti da questa patologia era osservabile una riduzione statisticamente significativa (pari a circa il 22%) del numero di corpi cellulari ossitocinergici, ma non di quelli dopaminergici, suggerendo in tal modo un coinvolgimento del sistema ossitocinergico in questo disturbo.

La possibile azione a livello della Sostanza Nera è stata indagata già alla fine degli anni Settanta quando *Shultz e collaboratori* (1979) hanno studiato l'effetto dell'iniezione intracerebroventricolare di ossitocina (50 e 100 ng/2 µl) e del suo tripeptide C-terminale propil-leucil-glicinammide (PLG) (50 ng/2 µl) in ratti lesionati unilateralmente nella Sostanza Nera con 6-idrossi dopamina. Questi due peptidi, quando iniettati intracerebroventricularmente, sono in grado di determinare, al pari dell'amfetamina, una rotazione ipsilaterale (omolaterale alla lesione – per una spiegazione più dettagliata del comportamento rotatorio vedere il Capitolo Supplementare a pagina 70) mentre la microiniezione nel lato non lesionato della Sostanza Nera (OXY 5.0 ng/1 µl; PLG 2.5 ng/1 µl) non induce alcun effetto. Questi risultati hanno suggerito che i due peptidi agiscano mediante un'attivazione presinaptica dei terminali dopaminergici a livello dello striato ma non a livello del corpo cellulare dei neuroni dopaminergici nigrostriatali.

Poiché il potenziale trofico e citoprotettivo dell'ossitocina è stato dimostrato mediante l'utilizzo di numerosi modelli sperimentali in molti studi *in vivo* ed *in vitro* (Iseri et al., 2005; Ceanga et al., 2010; Alizadeh et al., 2012; Bakos et al., 2012; Erbas et al., 2012; Leuner et al., 2012) più recentemente l'ossitocina è stata studiata per il suo potenziale effetto neuroprotettivo in un modello animale di Parkinson indotto dalla somministrazione del pesticida rotenone.

In particolare, in ratti sottoposti a iniezione monolaterale di rotenone nella *pars compacta* della Sostanza Nera e nell'Area Ventrale Tegmentale, il trattamento cronico (20 giorni) con ossitocina (160 µg/kg/giorno i.p.) è in grado di inibire significativamente le rotazioni ipsilaterali indotte dal trattamento sistemico con apomorfina (2 mg/kg). Inoltre l'ossitocina è in grado di esercitare un effetto citoprotettivo nei confronti del danno a carico dei neuroni dopaminergici striatali indotto dal rotenone grazie alla capacità di inibire le vie dell'apoptosi (soppressione dell'immuno-espressione di Bax, caspasi-3, caspasi-8 e incremento di quella di Bcl-2 e della Tirosina Idrossilasi). Questi risultati hanno portato a ipotizzare che l'ossitocina possa agire come agente neuroprotettivo e possa ridurre la morte neuronale a livello striatale, grazie alle sue proprietà antiinfiammatorie, antiapoptotiche e antiossidanti, e per i suoi effetti trofici (Erbas et al., 2012). Inoltre, il trattamento sistemico con ossitocina è in grado di sopprimere l'attività elettrica oscillatoria anomala che si registra nello striato in seguito alla lesione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali indotta dal rotenone (Erbas et al., 2013). Sembra infatti che l'attività elettrica oscillatoria nei Gangli della Base sia essenziale nell'elaborazione del movimento volontario in condizioni fisiologiche e che, nella Malattia di Parkinson, subisca delle alterazioni patologiche (Brown, 2003,2006) che possono essere ripristinate dal trattamento con farmaci attivi sul sistema dopaminergico (Kühn et al. 2006).

## **2. SCOPO DELLA RICERCA**



Le numerose evidenze sperimentali riportate nella letteratura scientifica sembrano suggerire, attraverso studi condotti sui roditori, che l'ossitocina eserciti un'azione modulatoria sull'attività locomotoria agendo nel Sistema Nervoso Centrale. Tuttavia, ben poco è noto a riguardo delle aree cerebrali a livello delle quali l'ossitocina agirebbe per esercitare tale azione modulatoria.

La presenza di proiezioni afferenti ossitocinergiche alla Sostanza Nera, provenienti dalla porzione parvocellulare del Nucleo Paraventricolare dell'ipotalamo, e di recettori ossitocinergici ed RNA messaggero per i recettori ossitocinergici nella Sostanza Nera umana e di ratto, rispettivamente, suggeriscono tuttavia che questo nucleo possa essere un putativo sito d'azione. Inoltre, in pazienti affetti dalla Malattia di Parkinson, una patologia neurodegenerativa del movimento caratterizzata dalla degenerazione dei corpi cellulari dei neuroni dopaminergici che dalla Sostanza Nera proiettano allo striato dorsale, è stata osservata una significativa degenerazione del numero di neuroni ossitocinergici del Nucleo Paraventricolare dell'ipotalamo.

Allo scopo di studiare il ruolo esercitato dalle afferenze ossitocinergiche alla Sostanza Nera sull'attività locomotoria, si è deciso di combinare degli studi di immunohistochimica in fluorescenza, comportamentali e di lesione. L'attività locomotoria orizzontale e verticale sono state studiate, in ratti maschi Sprague Dawley, in seguito:

- alla manipolazione farmacologica del sistema ossitocinergico nigrale, ottenuta mediante la somministrazione, per via centrale o sistemica, di ossitocina esogena o, per via centrale, di un antagonista selettivo per i recettori dell'ossitocina;
- alla distruzione delle cellule nigrali che esprimono i recettori ossitocinergici, ottenuta mediante l'impiego di un nuovo agente citotossico costituito da un coniugato tra l'ossitocina e la tossina *saporina*.

Mediante tecniche di immunofluorescenza singola e multipla è stata verificata la presenza e la localizzazione delle proiezioni ossitocinergiche nigrali ed è stato studiato l'effetto indotto dall'agente citotossico sul sistema dopaminergico e su quelli GABAergico e glutammatergico.

### **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1. ANIMALI**

Per la realizzazione degli esperimenti sono stati impiegati ratti maschi Sprague Dawley (250-300 g all'inizio degli esperimenti) acquistati dalla Harlan Nossan (Correzzana, Italia).

Gli animali sono stati stabulati in numero di 4 per gabbia (38 x 60 x 20 cm) e, prima degli esperimenti, sono stati sottoposti ad un periodo di abituazione di 10 giorni, presso lo stabulario del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Cagliari, in condizioni ambientali controllate (temperatura: 24 °C; umidità relativa: 60%; cicli luce/buio di 12 ore, con illuminazione dalle ore 8:00 alle ore 20:00) e acqua e cibo *ad libitum*.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti tra le ore 10:00 e le ore 14:00, secondo quanto indicato dalla Direttiva della Comunità Europea del 22 Settembre 2010 (2010/63/EU) e dalla Legislazione Italiana (D.L. 4 Marzo, 2014, n. 26), dopo approvazione da parte del Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università degli Studi di Cagliari.

### **3.2. FARMACI E PEPTIDI**

L'ossitocina è stata acquistata dalla Sigma Aldrich (S. Louis, MO, USA); la  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  dalla Bachem AG (Bubendorf, CH). I coniugati Ossitocina-Saporina (OXY-SAP) e Bianco-Saporina (BLANK-SAP) sono stati acquistati dalla Advanced Targeting System (Bemmel, The Netherlands). Tutti gli altri reagenti sono stati ottenuti da fonti disponibili in commercio.

### **3.3. TRATTAMENTI FARMACOLOGICI**

#### **3.3.1. SOMMINISTRAZIONI PER VIA SISTEMICA**

Le somministrazioni per via sistemica sono state effettuate per via intraperitoneale (i.p.) in un volume di 3 ml/kg di peso corporeo.

#### **3.3.2. SOMMINISTRAZIONI NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

Le somministrazioni a livello del Sistema Nervoso Centrale (*in loco* - Sostanza Nera - o per via intracerebroventricolare - i.c.v.) sono state effettuate, come di seguito riportato in dettaglio, mediante l'impianto cronico di cannule guida in acciaio inox. La somministrazione in ciascun sito di iniezione è avvenuta attraverso cannule interne rimovibili, in acciaio inox, inserite all'interno delle cannule guida per il tempo necessario alla corretta somministrazione delle soluzioni.

### **3.3.2.1. IMPIANTO DELLE CANNULE GUIDA**

Le cannule guida sono state impiantate, mediante chirurgia stereotassica (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA), bilateralmente nella Sostanza Nera (coordinate: 5.3 mm posteriore, 2.0 mm laterale rispetto al bregma e 2.0 mm ventrale alla dura madre), o unilateralmente nel ventricolo laterale (coordinate: 1.0 mm posteriore, 1.5 mm laterale rispetto al bregma e 2.0 mm ventrale alla dura madre) (Paxinos and Watson, 2007).

In breve i ratti, sotto anestesia con isoflurano (1.5-2%, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), sono stati posizionati in un apparato stereotassico (Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA) e sulla cute del cranio, in corrispondenza della linea mediana, è stata eseguita un'incisione longitudinale di approssimativamente 1.5-2.0 cm di lunghezza. La porzione di teca cranica esposta è stata pulita ed asciugata e, sulla sua superficie, sono stati realizzati cinque fori: uno in corrispondenza dell'area di impianto (Paxinos & Watson, 2007) nel quale è stata inserita la cannula guida in acciaio inox e quattro laterali nei quali sono state inserite delle viti in acciaio inossidabile per il fissaggio dell'impianto. Dopo il corretto posizionamento della cannula guida la teca cranica è stata accuratamente asciugata e, tanto le viti di fissaggio quanto la base della cannula guida, sono stati ricoperti con cemento dentale acrilico al fine di fissare l'impianto alla teca cranica. Dopo completa asciugatura del cemento dentale, l'incisione chirurgica è stata suturata con filo da sutura e l'estremità superiore della cannula guida è stata chiusa con un apposito tappo al fine di evitarne l'ostruzione sino al momento della somministrazione delle soluzioni.

Durante il periodo di recupero dalla chirurgia (una settimana) gli animali sono stati stabulati singolarmente in gabbie di Plexiglas trasparenti (48 x 30 x 30 cm) con acqua e cibo *ad libitum*.

### **3.3.2.2. MICROINIEZIONI NELLA SOSTANZA NERA E NEL VENTRICOLO LATERALE**

Le microiniezioni sono state eseguite mediante l'ausilio di una cannula interna, di diametro 28 G, che si estendeva di 6.0 mm e 1.0 mm oltre l'estremità della cannula guida, per la Sostanza Nera ed il ventricolo laterale, rispettivamente (Paxinos and Watson, 2007). La cannula interna è stata connessa, attraverso un tubo di polietilene, ad una siringa Hamilton da 10 µL guidata da una pompa da infusione CMA/100 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Le microiniezioni sono state eseguite nell'arco di 2 minuti ad un flusso costante e, al termine dell'iniezione, la cannula interna è stata lasciata nel sito di iniezione per 30 secondi, in modo da favorire la diffusione ottimale della soluzione iniettata.

### **3.3.3. TRATTAMENTI EFFETTUATI**

#### **3.3.3.1. SOMMINISTRAZIONE INTRAPERITONEALE DI OSSITOCINA**

L'ossitocina (0.5, 50 e 2000 µg), disciolta in soluzione fisiologica, o la sola soluzione fisiologica, sono state somministrate per via intraperitoneale (i.p.) in un volume di 3 ml/kg di peso corporeo (n=6 animali per gruppo).

#### **3.3.3.2. SOMMINISTRAZIONE INTRAPERITONEALE DI OSSITOCINA ACCOPPIATA ALLA SOMMINISTRAZIONE INTRACEREBROVENTRICOLARE DI $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8-$ VASOTOCINA**

L'antagonista dei recettori dell'ossitocina  $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina, disciolto in soluzione fisiologica, o la sola soluzione fisiologica, sono stati somministrati per via intracerebroventricolare (i.c.v.) 10 minuti prima della somministrazione intraperitoneale di ossitocina (2000 µg/kg), o della sola soluzione fisiologica, alla dose di 10 µg per ratto, in un volume di 10 µL (n=6 animali per gruppo).

#### **3.3.3.3. SOMMINISTRAZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA NELLA SOSTANZA NERA**

L'ossitocina (50, 100 o 200 ng per sito di iniezione), disciolta in soluzione fisiologica, o la sola soluzione fisiologica, sono state somministrate bilateralmente nella Sostanza Nera, in un volume di 0.3 µL per sito di iniezione (n=6 animali per gruppo).

#### **3.3.3.4. SOMMINISTRAZIONE BILATERALE DI $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8-$ VASOTOCINA NELLA SOSTANZA NERA O UNILATERALE NEL VENTRICOLO LATERALE**

L'antagonista dei recettori dell'ossitocina  $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina, disciolto in soluzione fisiologica, o la sola soluzione fisiologica, sono stati somministrati bilateralmente nella Sostanza Nera alla dose di 2 µg per sito, in un volume di 0.3 µl per sito oppure unilateralmente nel ventricolo laterale alla dose di 10 µg per ratto in un volume di 10 µL (n=6 animali per gruppo).

### **3.3.3.5. INIEZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA**

Gli animali, dopo essere stati anestetizzati con isoflurano (1.5-2%, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), sono stati sottoposti mediante chirurgia stereotassica (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) all'iniezione bilaterale, in modo randomizzato, di un volume di 0.3  $\mu$ L per sito di iniezione di Ossitocina Saporina (OXY-SAP, 60 ng/ $\mu$ L/sito), Bianco-Saporina (BLANK-SAP, 60 ng/ $\mu$ L/sito) disciolte in tampone fosfato salino (PBS, pH 7.4) o veicolo (PBS).

In breve, l'OXY-SAP è una citotossina ottenuta attraverso la coniugazione dell'ossitocina con la *saporina*, una proteina in grado di disattivare i ribosomi, estratta dai semi della pianta *Saponaria Officinalis*. Quando coniugata all'ossitocina, la saporina viene riconosciuta dalle cellule che esprimono i recettori dell'ossitocina alla superficie della membrana cellulare, internalizzata e liberata a livello citoplasmatico. All'interno della cellula la saporina inattiva i ribosomi bloccando la sintesi proteica e causando la morte cellulare. Il BLANK-SAP invece, nel quale la saporina è coniugata con un peptide la cui sequenza non riconosce alcun target biologico, costituisce un composto privo di attività biologica che funziona da controllo interno. Le dosi di OXY-SAP e BLANK-SAP utilizzate in questo lavoro di tesi sono state scelte in riferimento al recente lavoro di *Baskin e collaboratori* (2010).

Le soluzioni di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS sono state iniettate bilateralmente nella Sostanza Nera (coordinate: 5.3 mm posteriore, 2.0 mm laterale rispetto al bregma e 8.0 mm ventrale alla dura madre) (Paxinos and Watson, 2007), mediante una siringa Hamilton con ago di diametro 28 G, nell'arco di 3 minuti (100 nL/min) per ciascun sito di iniezione. Al termine dell'iniezione l'ago è stato lasciato nel sito di iniezione per 2 minuti, in modo da favorire la diffusione ottimale delle soluzioni iniettate.

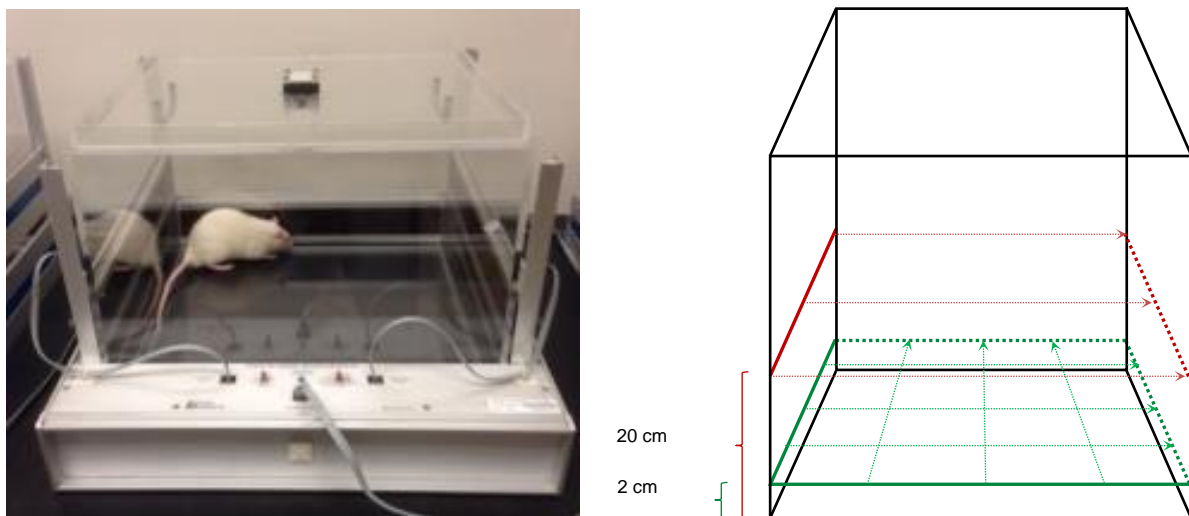
Dopo l'iniezione di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS gli animali sono stati monitorati e pesati quotidianamente per valutarne le condizioni generali di salute (alimentazione, idratazione, distress, etc. ...)

### **3.4. ATTIVITÀ LOCOMOTORIA**

Prima dell'inizio degli esperimenti, gli animali sono stati manipolati quotidianamente per almeno una settimana, in modo da ridurre lo stress associato alla manipolazione durante ciascuna sessione di test. Al termine di questo periodo, ciascun animale è andato incontro ad un'ulteriore sessione di abituazione, della durata di 2 ore, all'interno dell'apparato impiegato per la misurazione dell'attività locomotoria. Tale sessione aveva lo scopo di eliminare l'influenza degli effetti indotti dalla *novelty* (esposizione per la prima volta ad una situazione/ambiente nuovo) della procedura sperimentale e dell'apparato impiegato nelle sessioni di test.

Per ciascun animale l'attività locomotoria è stata misurata mediante un Digiscan Animal Activity Analyzer (Omnitec Electronics, Columbus, Ohio) in condizioni ambientali standardizzate (stanza insonorizzata e illuminazione pari a 30 lux).

Questo apparato è costituito da un'arena a base quadrata (43 x 43 x 63 cm) dotata di 3 set di fotocellule. Ciascun set comprende 16 fotocellule poste a 2.5 cm di distanza l'una dall'altra. Due dei set di fotocellule sono orientati ortogonalmente l'uno rispetto all'altro e proiettano i raggi infrarossi parallelamente rispetto al piano individuato dal pavimento dell'arena ad un'altezza di 2 cm da esso. Il terzo set di fotocellule, anch'esso orientato parallelamente al pavimento dell'arena, è dotato di altezza regolabile ed è stato posizionato ad un'altezza di 20 cm sulla base dell'altezza media degli animali in posizione eretta (Figura 8).



**Figura 8.** Digiscan Animal Activity Analyzer: a sinistra viene mostrata una foto dell'apparato utilizzato per la misurazione dell'attività locomotoria durante le sessioni di test; a destra è riportata una rappresentazione schematica dell'apparato nella quale è indicato il posizionamento dei set di fotocellule e la direzione nella quale sono proiettati i raggi infrarossi.

L'attività motoria orizzontale e quella verticale sono state valutate misurando il numero totale di interruzioni consecutive dei raggi infrarossi proiettati dalle fotocellule ("conte"). In ciascuna sessione di test la registrazione dell'attività locomotoria ha avuto inizio a partire dal posizionamento dell'animale all'interno dell'arena e la registrazione è stata effettuata ogni 5 minuti per un tempo complessivo di 30 o 60 minuti, a seconda dello specifico esperimento condotto.

Negli esperimenti che prevedevano la somministrazione per via intraperitoneale dell'ossitocina (o della sola soluzione fisiologica) singolarmente o in combinazione alla somministrazione per via intracerebroventricolare dell'antagonista dei recettori per l'ossitocina (o della sola soluzione fisiologica) gli animali sono stati introdotti nell'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria 30 minuti dopo l'iniezione intraperitoneale e l'attività locomotoria è stata registrata per 30 minuti.

Negli esperimenti che prevedevano la somministrazione in loco, nella Sostanza Nera, dell'ossitocina (o della sola soluzione fisiologica) o dell'antagonista dei recettori per l'ossitocina (o della sola soluzione fisiologica) gli animali sono stati introdotti nell'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria 10 minuti dopo l'iniezione e l'attività locomotoria è stata registrata per 60 minuti.

Negli esperimenti nei quali l'OXY-SAP, il BLANK-SAP o la PBS sono stati iniettati in loco nella Sostanza Nera, al momento dell'esperimento gli animali sono stati spostati dalla gabbia di stabulazione all'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria e l'attività locomotoria è stata registrata per 30 minuti.

### **3.5. ISTOLOGIA**

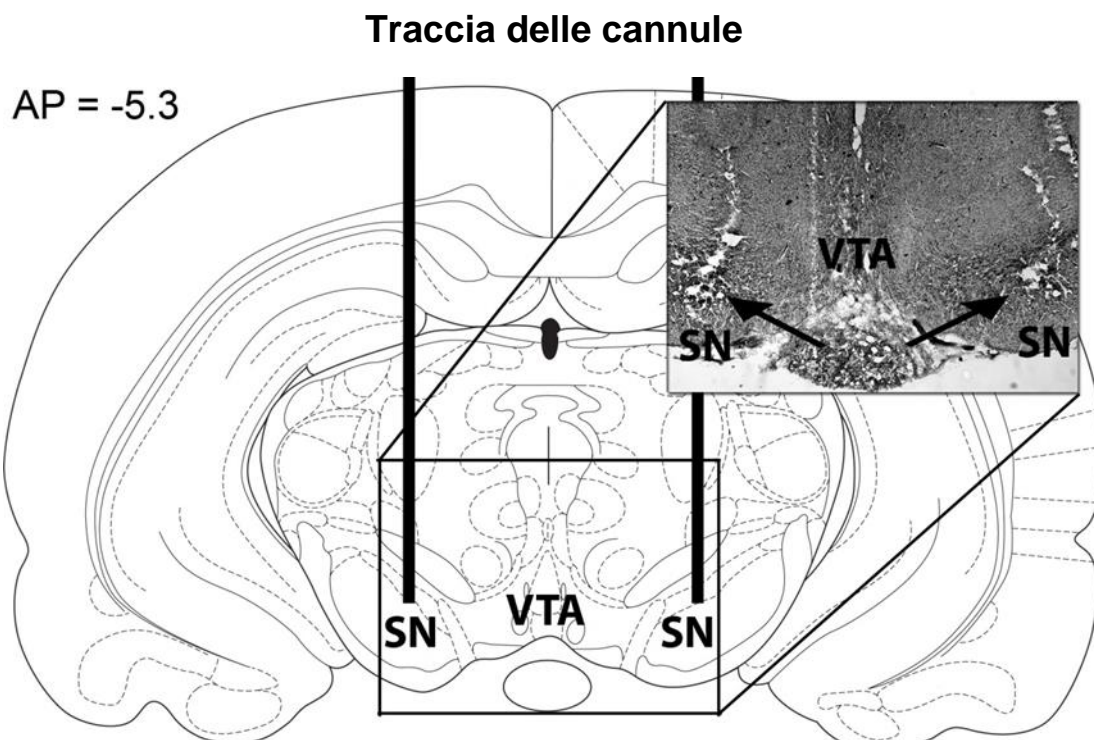
Negli esperimenti nei quali le microiniezioni sono state effettuate nella Sostanza Nera, gli animali sono stati sacrificati per decapitazione, i cervelli sono stati rapidamente rimossi e fissati per immersione in una soluzione di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato (Immunofix, Bio-Optica, Milano, Italia), per 12-15 giorni.

Al fine di localizzare l'esatta posizione, all'interno della Sostanza Nera, delle estremità di entrambe le cannule da microiniezione, con l'ausilio di un criostato sono state preparate delle sezioni coronali di tessuto cerebrale dello spessore di 40  $\mu\text{m}$ . Queste ultime sono state quindi colorate con Rosso Neutro e analizzate con un microscopio a contrasto di fase. La posizione delle estremità di entrambe le cannule da microiniezione è stata localizzata seguendone le tracce attraverso una serie di sezioni cerebrali consecutive (Figura 9).

Negli esperimenti nei quali le microiniezioni sono state effettuate nel ventricolo laterale, prima del sacrificio per decapitazione, gli animali hanno ricevuto un'iniezione i.c.v. di blu di metilene (10  $\mu\text{L}$ ). Dopo il sacrificio i cervelli sono stati rapidamente rimossi e sottoposti ad una rapida ispezione visiva, al fine di verificare l'esatto posizionamento della cannula interna nel ventricolo laterale. Per l'analisi statistica dei risultati sono stati considerati solo gli animali nei quali l'estremità delle cannule era posizionata correttamente, bilateralmente nella Sostanza Nera o unilateralmente nel ventricolo laterale.

Negli esperimenti che prevedevamo l'iniezione bilaterale di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS nella Sostanza Nera, subito dopo l'ultima sessione sperimentale gli animali sono stati sottoposti alle procedure sperimentali descritte in dettaglio nel paragrafo successivo, e utilizzati per gli esperimenti di Immunoistochimica. Anche in questo caso, sono stati inclusi nell'analisi dei dati solo gli animali nei quali l'estremità dell'ago della siringa era posizionata correttamente bilateralmente nella Sostanza Nera.





**Figura 9.** Rappresentazione schematica di una sezione coronale del cervello di ratto nella quale è indicata la localizzazione dei siti utilizzati per le microiniezioni nella Sostanza Nera. La foto relativa al riquadro in figura mostra una sezione di tessuto colorata con Rosso Neutro nella quale sono visibili, bilateralmente nella Sostanza Nera, le tracce delle cannule interne utilizzate per le microiniezioni (indicate dalla frecce nere).

Abbreviazioni: SN= Sostanza Nera; VTA= Area Tegmentale Ventrale

### **3.6. IMMUNOISTOCHEMICA**

#### **3.6.1. PREPARAZIONE DEI TESSUTI**

Dopo anestesia mediante cloralio idrato (400 mg/kg i.p.), ciascun animale è stato sottoposto a perfusione transcardiaca, per circa 20 minuti, con una soluzione di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.2–7.4, 4 °C). I cervelli sono stati rapidamente rimossi dalla teca cranica e immersi per 48 ore in una soluzione criopreservante di tampone fosfato salino (PBS, 0.01 mol/l PO<sub>4</sub>, pH 7.2–7.4, 0.15 mol/l NaCl) contenente 70 g/L di saccarosio e 0.1 g/L di NaN<sub>3</sub>. Ciascun cervello è stato quindi posizionato all'interno di uno stampo in alluminio di opportune dimensioni, immerso in un mezzo di inclusione appropriato (Cocco et al. 2003) e sottoposto a congelamento rapido. I blocchetti così preparati sono stati conservati nella fase gassosa di un contenitore dewar per l'azoto liquido, fino al giorno del criosezionamento.

Utilizzando un criomicrotomo (Microm HM-560, Walldorf, Germania; temperatura di taglio -32 °C) l'intera Sostanza Nera (da A.P. ~ -6.5 a A.P. ~ -4.5) è stata tagliata in sezioni dello spessore di 10 µm. Le sezioni così ottenute sono state posizionate in vetrini porta-oggetto ricoperti di polilisina al fine di consentire la successiva fase di immunocolorazione.

### **3.6.2. IMMUNOCOLORAZIONI**

Per lo studio della distribuzione, in condizioni fisiologiche, delle fibre ossitocinergiche in prossimità dell'area della Sostanza Nera impiegata per la realizzazione delle microiniezioni (5.3 mm posteriore rispetto al bregma) sono stati impiegati animali che non erano stati sottoposti ad alcuna procedura chirurgica. A tale scopo sono state eseguite delle doppie immunocolorazioni per la Tirosina Idrossilasi, l'enzima catalizzante la tappa limitante la sintesi della dopamina (anticorpo monoclonale anti-TH prodotto in topo: Sigma-Aldrich, Milano, Italia, T2928; 1:1000) e per l'ossitocina (anticorpo monoclonale anti-ossitocina prodotto in Guinea-pig: Abcam, Cambridge, UK, ab51637; 1:400).

Negli animali che sono andati incontro ad iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS, al fine di studiare l'effetto esercitato da ciascuno degli agenti iniettati sui sistemi dopaminergico, GABAergico e glutamatergico, sono stati impiegati specifici anticorpi primari. Nel caso del sistema dopaminergico e di quello GABAergico gli anticorpi impiegati erano diretti contro gli enzimi catalizzanti la tappa limitante la sintesi dei loro rispettivi neurotrasmettitori: la Tirosina Idrossilasi per la dopamina e la Glutammato Decarbossilasi (GAD) per l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA). Per lo studio del sistema glutamatergico sono stati invece impiegati anticorpi diretti contro i trasportatori vescicolari per il glutammato dei quali esistono tre diverse isoforme: VGLuT1, VGLuT2 e VGLuT3. In particolare, dal momento che il VGLuT1 ed il VGLuT2 sono espressi su terminali neuronali che utilizzano glutammato come neurotrasmettitore mentre il VGLuT3 è espresso su terminali non glutamatergici nei quali il glutammato potrebbe svolgere un'azione modulatoria, sono state studiate tutte e tre le isoforme.

A tale scopo, per ciascuno degli animali che sono andati incontro ad iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS, sono state selezionate sezioni consecutive comprese entro  $\pm 300 \mu\text{m}$  dal sito di iniezione (area corrispondente a quella direttamente interessata dalla diffusione delle soluzioni iniettate) che sono state impiegate per la realizzazione di singole immunocolorazioni per la Tirosina Idrossilasi (TH) (anticorpo policlonale anti-TH prodotto in gallina: Millipore, Darmstadt, Germania, ab9702; 1:1500) o la Glutammato Decarbossilasi (GAD) (anticorpo monoclonale anti-GAD prodotto in topo: DSHB, Iowa City, Iowa, GAD-6-c; 1:1500) oppure di doppie immunocolorazioni per il TH e una delle tre isoforme dei trasportatori vescicolari per il glutammato (VGLuT1, VGLuT2 o VGLuT3) (anticorpi monoclonali anti- VGLuT1, VGLuT2 o VGLuT3 prodotti in topo: neuroMAB, Davis, CA, 75-066, 75-067, 75-073; 1:300).

Lo studio degli effetti indotti dagli agenti iniettati sui sistemi dopaminergico e GABAergico è stato esteso anche alle porzioni rostrale e caudale della Sostanza Nera. A tale scopo due sezioni consecutive ogni  $300 \mu\text{m}$ , derivanti dalla porzione di Sostanza Nera eccedente quella a  $\pm 300 \mu\text{m}$  dal sito di iniezione, sono state sottoposte a singola immunocolorazione per la Tirosina Idrossilasi o la Glutammato Decarbossilasi, rispettivamente.

In breve, per la realizzazione delle immunocolorazioni, le sezioni sono state immerse (45 minuti) in una soluzione di PBS contenente lo 0.1% di Triton X-100, quindi sottoposte a dei lavaggi in PBS (3 lavaggi da tre minuti ciascuno) e incubate per tutta la notte con l'opportuno anticorpo primario o miscela di anticorpi primari.

Le sezioni sono state successivamente sottoposte ai lavaggi in PBS e incubate (75 minuti) con gli specifici anticorpi secondari selettivi per la specie nella quale è prodotto ciascun anticorpo primario, prodotti in asino e coniugati con un fluorocromo (Cy-3 o Alexa-488) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Le sezioni sono state ancora una volta sottoposte ai lavaggi in PBS e ricoperte con una soluzione di PBS e glicerolo, contenente lo 0.02% di  $\text{NaN}_3$ , per consentire la chiusura dei vetrini con il vetrino coprioggetto.

I vetrini così preparati sono stati osservati e fotografati mediante microscopi a fluorescenza (BX41 e BX5, Olympus, Milano, Italia) accoppiati a macchine fotografiche digitali (Fuji S3 e S5 Pro, Fujifilm, Milano, Italia).

Gli anticorpi primari e secondari sono stati diluiti in una soluzione di PBS contenente 30 ml/L di siero di asino, 30 ml/L di siero di ratto e 0.02 g/L  $\text{NaN}_3$ , al fine di prevenire il legame non specifico degli anticorpi impiegati. I controlli di routine hanno previsto inoltre, per ciascuno dei tessuti impiegati, l'impiego di controlli negativi e, nel caso delle doppie immunocolorazioni, prove di cross-reattività che prevedono, rispettivamente, la sostituzione dell'anticorpo primario con la sola soluzione impiegata per la diluizione dello stesso e l'impiego di ciascun anticorpo primario con il proprio specifico anticorpo secondario e con quello selettivo per l'anticorpo primario con il quale è stato impiegato nella doppia immunocolorazione. Tutte le immunocolorazioni sono state valutate da due diversi osservatori che non erano a conoscenza dello specifico trattamento somministrato.

### **3.7. STATISTICA**

I dati relativi all'attività locomotoria orizzontale e verticale sono stati riportati sia come conte parziali relative ad intervalli consecutivi della durata di 5 minuti, sia come conte totali relative all'intera durata dell'esperimento (30 o 60 minuti a seconda dello specifico esperimento).

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA ad una via considerando il fattore generale "dose" o "trattamento" (a seconda dello specifico esperimento), o mediante ANOVA a due vie considerando come fattore *between-subjects* il fattore "dose" o "trattamento" (a seconda dello specifico esperimento) e come fattore *within-subjects* il fattore generale "tempo" (indicato ad esempio come "intervallo di 5 minuti" o "tempo del trattamento").

Nel caso in cui l'ANOVA ad una o a due vie abbia rilevato effetti significativi dei fattori principali o di interazione fra gli stessi, sono state eseguite delle comparazioni *post hoc* per gruppi appaiati utilizzando il test di Bonferroni al fine di rilevare le singole fonti di significatività.

Per l'analisi statistica sono stati impiegati GraphPad (GraphPad versione 5.00 per Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) e Statistica (Statistica, v. 12, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA; 2012, <http://www.statsoft.com>). I dati analizzati sono stati considerati significativi per valori di  $P < 0.05$ .

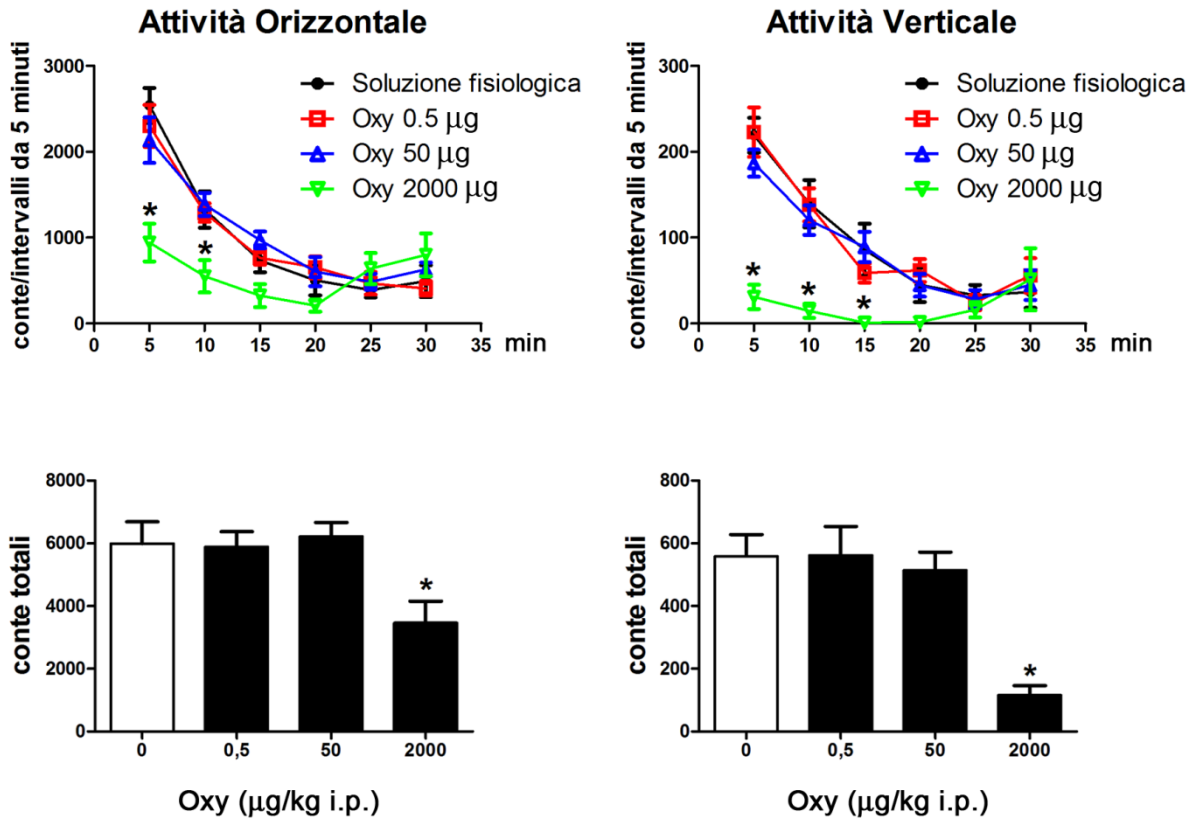
## **4. RISULTATI**

#### **4.1. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE INTRAPERITONEALE DI OSSITOCINA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CURVE DOSE-RISPOSTA E ANTAGONISMO DA PARTE DELLA $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-VASOTOCINA}$**

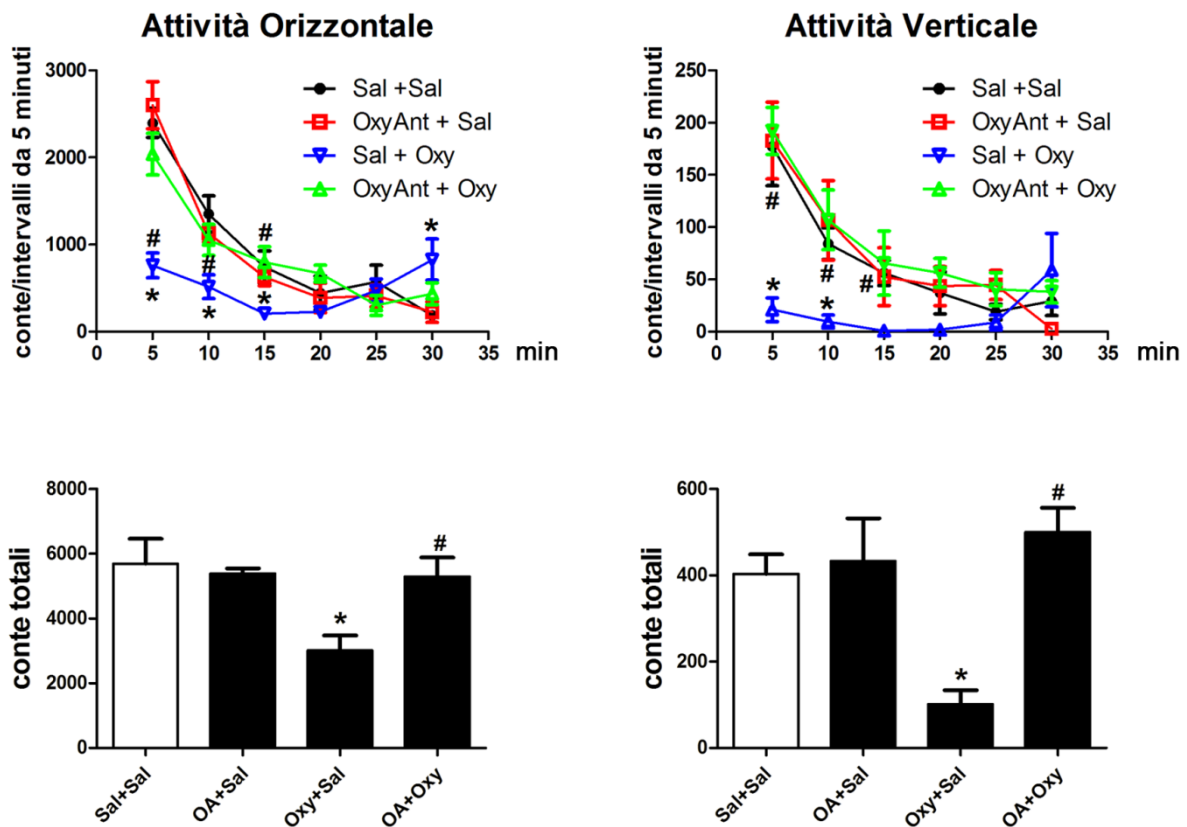
Come mostrato in Figura 10, in ratti maschi Sprague Dawley, la somministrazione intraperitoneale di ossitocina (0.5-2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) determina una riduzione dose-dipendente dell'attività locomotoria, sia orizzontale sia verticale. L'effetto è stato osservato alla dose di 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ma non a quelle di 0.5 o 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , era più pronunciato nei primi 15 minuti del test e tendeva a scomparire nei successivi 15 minuti, durante i quali i valori relativi all'attività locomotoria registrati diventavano simili a quelli degli animali trattati con il solo veicolo. L'ANOVA ad una via delle conte totali dell'attività locomotoria orizzontale e verticale ha messo in evidenza un effetto significativo del trattamento, confermato dall'ANOVA a due vie per misure ripetute per gli intervalli consecutivi da 5 minuti ( $F(3,100)=4,49$  e  $10,65$ ,  $P<0.05$  e  $P<0.001$ ), che ha messo anche in evidenza un effetto significativo degli intervalli da 5 minuti ( $F(5,100)=66,21$  e  $42,57$ , entrambi con  $P<0.001$ ) ed un'interazione significativa TRATTAMENTO X INTERVALLI DA 5 MINUTI ( $F(15,100)=5,25$  e  $5,04$ , entrambi con  $P<0.001$ ) sia per l'attività orizzontale sia per quella verticale, rispettivamente.

Inoltre, il confronto *post hoc* ha messo in evidenza differenze altamente significative, sia nell'attività locomotoria orizzontale sia nell'attività locomotoria verticale, tra gli animali trattati con 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  di ossitocina e quelli trattati con la soluzione fisiologica nei primi tre intervalli consecutivi da 5 minuti ( $P<0.05$  –  $P<0.001$ ). Tale differenza manteneva la significatività anche quando venivano considerate le conte totali relative all'intero esperimento (conte totali,  $P<0.05$ ) (vedere la Figura 10 per i singoli punti di significatività statistica).

Come mostrato in Figura 11, l'effetto inibitorio esercitato dalla somministrazione intraperitoneale di 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  di ossitocina sull'attività locomotoria orizzontale e verticale, è stato completamente antagonizzato dal trattamento intracerebroventricolare con 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dell'antagonista selettivo per i recettori dell'ossitocina  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ , 10 minuti prima della somministrazione intraperitoneale di ossitocina. La dose di antagonista impiegata è di per se incapace di indurre modificazioni nell'attività locomotoria basale. L'ANOVA a una via delle conte totali dell'attività locomotoria orizzontale e verticale ha messo in evidenza un effetto significativo del trattamento, confermato dall'ANOVA a due vie per misure ripetute per gli intervalli consecutivi da 5 minuti ( $F(3,100)=5,19$  e  $7,71$  entrambi con  $P<0.001$ ), che ha anche messo in evidenza un significativo effetto degli intervalli da 5 minuti ( $F(5,100)=70,41$  e  $19,49$ , entrambi con  $P<0.001$ ) ed un'interazione significativa TRATTAMENTO X INTERVALLI DA 5 MINUTI ( $F(15,100)=7,32$  e  $2,86$ , entrambi con  $P<0.001$ ) sia per l'attività locomotoria orizzontale sia per quella verticale. Infine, i confronti *post hoc* hanno messo in evidenza differenze significative, sia nell'attività locomotoria orizzontale sia nell'attività locomotoria verticale, tra gli animali trattati con la combinazione



**Figura 10.** Attività locomotoria orizzontale e verticale in ratti maschi sottoposti a somministrazione intraperitoneale di ossitocina: curve dose-risposta. Ciascun animale è stato introdotto singolarmente nell'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria 30 minuti dopo la somministrazione intraperitoneale di ossitocina (Oxy, 0,5, 50 e 2000 µg/kg) e l'attività locomotoria è stata registrata per 30 minuti (6 intervalli consecutivi da 5 minuti). I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM delle conte relative ai 6 intervalli consecutivi da 5 minuti di 6 ratti per gruppo, o come media  $\pm$  SEM delle conte totali relative all'intera durata dell'esperimento. \* $P < 0.05$  rispetto agli animali trattati con la sola soluzione fisiologica (ANOVA ad una o a due vie seguite dal test post hoc di Bonferroni).



**Figura 11.** Antagonismo dell'effetto inibitorio esercitato dall'ossitocina sull'attività locomotoria orizzontale e verticale, da parte dell'antagonista selettivo per i recettori dell'ossitocina  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  (OxyAnt - OA). La  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  (2  $\mu\text{g}$ ) o la sola soluzione fisiologica (Sal, 10  $\mu\text{l}$ ) sono state somministrate per via intracerebroventricolare (i.c.v.) e 10 minuti dopo, l'ossitocina (Oxy, 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o la sola soluzione fisiologica sono state somministrate per via intraperitoneale (i.p.). Ciascun animale è stato introdotto singolarmente nell'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria 30 minuti dopo la somministrazione intraperitoneale di ossitocina o di soluzione fisiologica e l'attività locomotoria è stata registrata per 30 minuti (6 intervalli consecutivi da 5 minuti). I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM delle conte relative ai 6 intervalli consecutivi da 5 minuti di 6 ratti per gruppo, o come media  $\pm$  SEM delle conte totali relative all'intera durata dell'esperimento. \* $P < 0.05$  rispetto agli animali trattati con la sola soluzione fisiologica; # $P < 0.05$ , OA i.c.v. + Oxy i.p. rispetto agli animali trattati con la combinazione soluzione fisiologica i.c.v. + Oxy i.p. (ANOVA ad una o a due vie seguite dal test *post hoc* di Bonferroni).



*antagonista dei recettori per l'ossitocina (i.c.v.) + ossitocina (i.p.)* e quelli trattati con la combinazione *soluzione fisiologica (i.c.v.) + ossitocina (i.p.)* (intervalli da 5 minuti,  $P < 0.05$  –  $P < 0.001$ ; conte totali,  $P < 0.05$  e  $P < 0.01$ ) sia per l'attività orizzontale sia per quella verticale, rispettivamente. Nessuna differenza significativa è stata invece messa in evidenza tra gli animali trattati con la combinazione *antagonista dei recettori per l'ossitocina (i.c.v.) + ossitocina (i.p.)* o *soluzione fisiologica (i.p.)* e quelli trattati con la combinazione *soluzione fisiologica (i.c.v.) + soluzione fisiologica (i.p.)* (intervalli da 5 minuti, conte totali, entrambi con  $P > 0.05$ ) (vedere la Figura 11 per i singoli punti di significatività statistica).

#### **4.2. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CURVE DOSE-RISPOSTA**

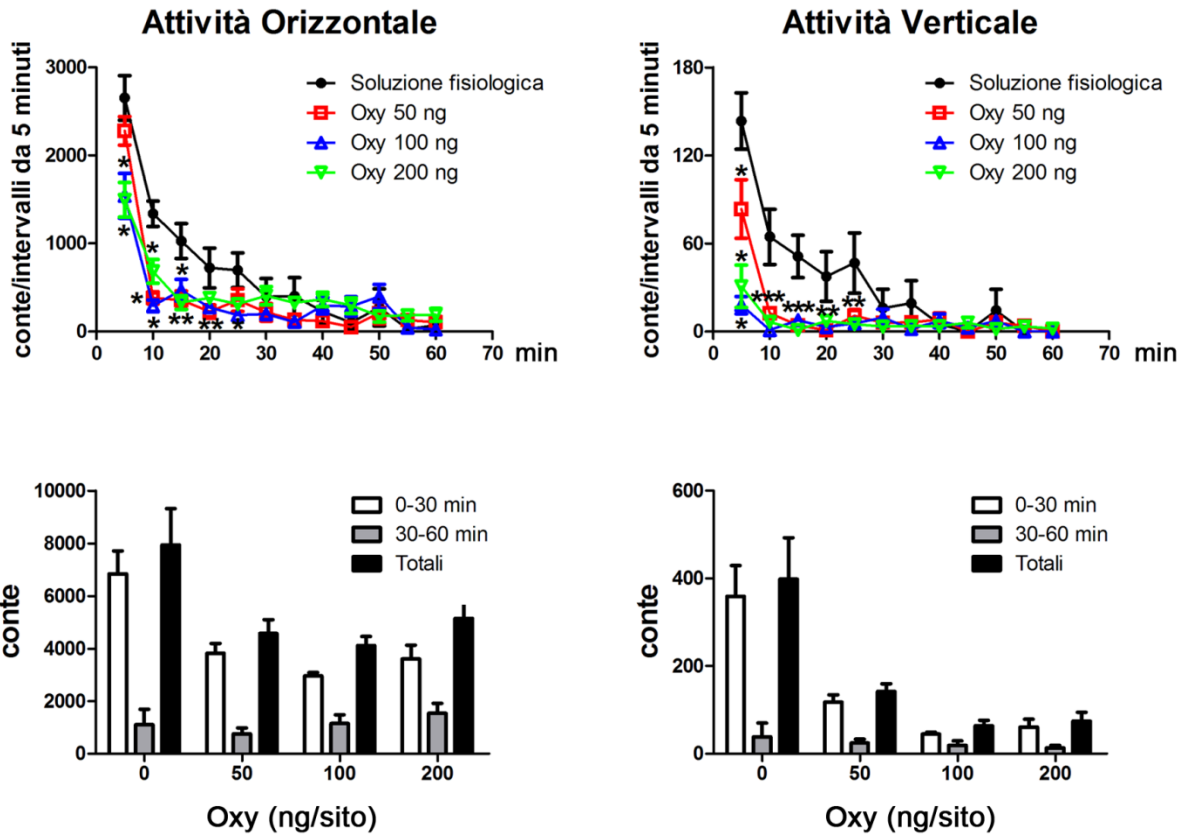
Come mostrato in Figura 12, in ratti maschi Sprague Dawley, la somministrazione bilaterale di ossitocina nella Sostanza Nera (50-200 ng), riduce l'attività locomotoria, sia orizzontale sia verticale, in maniera dose-dipendente. L'insorgenza dell'effetto era immediata e l'azione si manteneva nei 25-30 minuti successivi alla somministrazione. Dopo questo intervallo di tempo non era riscontrabile alcuna differenza tra gli animali trattati con l'ossitocina e quelli trattati con la sola soluzione fisiologica, anche a causa della riduzione dell'attività locomotoria che si manifesta negli animali trattati con la sola soluzione fisiologica.

L'ANOVA a due vie delle conte parziali relative agli intervalli consecutivi da 5 minuti e delle conte totali dell'attività locomotoria orizzontale e verticale ha messo in evidenza un effetto significativo del trattamento ( $[F(3,220)=3,93$  e  $9,82$ ,  $P < 0.05$  e  $P < 0.001$ ] e del tempo [intervalli da 5 minuti,  $F(11,220)=101,2$  e  $25,82$ , entrambi con  $P < 0.001$ ; conte totali:  $F(2,40)=188,6$  e  $57,7$ , entrambi con  $P < 0.001$ ] ed un'interazione significativa TRATTAMENTO X TEMPO [intervalli da 5 minuti,  $F(33,220)=5,11$  e  $6,02$ , entrambi con  $P < 0.001$ ; conte totali:  $F(6,40)=9,94$  e  $15,69$ , entrambi con  $P < 0.001$ ] sia per l'attività locomotoria orizzontale sia per quella verticale.

I test *post hoc* hanno messo in evidenza che, qualora venissero considerati gli intervalli consecutivi da 5 minuti nei primi 20-25 minuti di test, gli animali trattati con ossitocina alle dosi di 100 e 200 ng mostravano differenze altamente significative nell'attività locomotoria orizzontale e verticale rispetto agli animali trattati con la sola soluzione fisiologica ( $P < 0.05$  -  $P < 0.001$ ).

Sebbene l'ossitocina sia in grado di determinare un'inibizione dell'attività locomotoria orizzontale e verticale già alla dose di 50 ng/sito/ratto (conte totali, 50 ng vs salina  $P < 0.01$ ), l'effetto inibitorio di tale dose sull'attività locomotoria orizzontale si manifesta solo 10 minuti dopo la somministrazione ( $P < 0.01$ ) a differenza di quanto osservato per le dosi di 100 e 200 ng.

Nonostante ciò la dose di 50 ng/sito/ratto ha mostrato un'efficacia nell'inibire l'attività locomotoria orizzontale totale nei primi 30 minuti del test (conte totali, tutte le  $P > 0.05$  per il



**Figura 12.** Attività locomotoria orizzontale e verticale in ratti maschi sottoposti a somministrazione bilaterale di ossitocina nella Sostanza Nera: curve dose-risposta. Ciascun animale è stato introdotto singolarmente nell'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria 10 minuti dopo la somministrazione bilaterale nella Sostanza Nera di ossitocina (Oxy, 50, 100 e 200 ng/sito di iniezione) e l'attività locomotoria è stata registrata per 60 minuti (12 intervalli consecutivi da 5 minuti). I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM delle conte relative ai 12 intervalli consecutivi da 5 minuti di 6 ratti per gruppo, o come media  $\pm$  SEM delle conte totali relative ai primi e ai secondi 30 minuti e all'intera durata dell'esperimento. \* $P < 0.05$  rispetto agli animali trattati con la sola soluzione fisiologica (ANOVA a due vie seguite dal test post hoc di Bonferroni).

confronto tra le tre dosi) simile a quella delle dosi più alte.

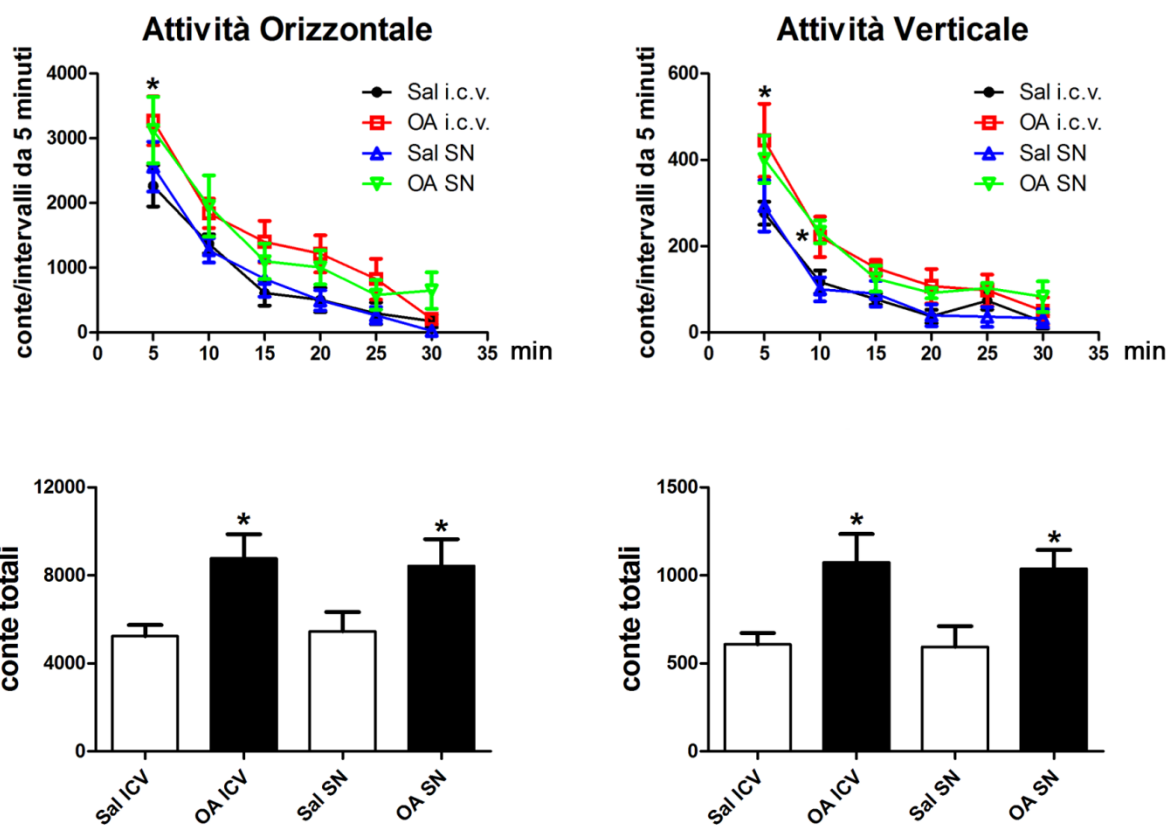
Infine, i quattro gruppi sperimentali non hanno mostrato alcuna differenza significativa nei valori di attività locomotoria orizzontale e verticale dopo i primi 30 minuti di test (conte totali, tutte le  $P > 0.05$ ) (vedere la Figura 12 per i singoli punti dotati di significatività statistica).

#### **4.3. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE BILATERALE DI $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-VASOTOCINA NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA$**

Come mostrato in Figura 13, in ratti maschi Sprague Dawley, la somministrazione bilaterale di  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  nella Sostanza Nera alla dose di 2  $\mu\text{g/sito}$ , determina un incremento dell'attività locomotoria orizzontale e verticale del 50% e 75%, rispettivamente, in confronto agli animali trattati con la sola soluzione salina. Risultati simili sono stati ottenuti quando l'antagonista era iniettato per via intracerebroventricolare alla dose di 10  $\mu\text{g/ratto}$ . In entrambe le condizioni sperimentali (2  $\mu\text{g/sito}$  nella Sostanza Nera o 10  $\mu\text{g/ratto}$  i.c.v.), l'insorgenza dell'effetto era immediata e l'azione si manteneva per 25-30 minuti.

L'ANOVA ad una via delle conte totali relative all'attività locomotoria orizzontale e verticale ha messo in evidenza un effetto significativo del trattamento, confermato dall'ANOVA a due vie per misure ripetute delle conte parziali relative agli intervalli consecutivi da 5 minuti ( $[F(3,100)=3,80$  e  $5,00$ ,  $P < 0.05$  e  $P < 0.01$ ] che ha anche messo in evidenza un effetto significativo degli intervalli da 5 minuti [ $F(5,100)=59,78$  e  $52,36$ , entrambi con  $P < 0.001$ ] sia per l'attività locomotoria orizzontale sia per quella verticale.

Inoltre, il test *post hoc* ha messo in evidenza che gli animali trattati con  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  per via intracerebroventricolare non mostrano differenze statisticamente significative rispetto a quelli sottoposti ad iniezione bilaterale di  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  nella Sostanza Nera (tutte le  $P > 0.05$ ) (vedere la Figura 13 per i singoli punti dotati di significatività statistica).



**Figura 13.** Attività locomotoria orizzontale e verticale in ratti maschi sottoposti alla somministrazione dell'antagonista selettivo per i recettori dell'ossitocina  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  (OA) unilateralmente nel ventricolo laterale (i.c.v.) o bilateralmente nella Sostanza Nera. Ciascun animale è stato introdotto singolarmente nell'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria 10 minuti dopo la somministrazione unilaterale nel ventricolo laterale della  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  (10  $\mu\text{g}$  i.c.v.) o della sola soluzione fisiologica (10  $\mu\text{l}$  i.c.v.) o alla somministrazione bilaterale nella Sostanza Nera (OA: 2  $\mu\text{g}$ /sito; soluzione fisiologica: 0.3  $\mu\text{l}$ /sito) e l'attività locomotoria è stata registrata per 30 minuti (6 intervalli consecutivi da 5 minuti). I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM delle conte relative ai 6 intervalli consecutivi da 5 minuti di 6 ratti per gruppo, o come media  $\pm$  SEM delle conte totali relative all'intera durata dell'esperimento. \* $P < 0.05$  rispetto agli animali trattati con la sola soluzione fisiologica (ANOVA ad una o a due vie seguite dal test post hoc di Bonferroni).

#### **4.4. EFFETTO DELL'INIEZIONE BILATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CONFRONTO CON L'EFFETTO INDOTTO DAL BIANCO-SAPORINA E DALLA PBS**

Come mostrato in Figura 14, in ratti maschi Sprague Dawley, l'iniezione bilaterale di OXY-SAP nella Sostanza Nera (60 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L/sito) determina, 28 giorni dopo l'iniezione, un incremento dell'attività locomotoria orizzontale (pari a circa il 50%) ma non di quella verticale, quando comparata con l'iniezione di BLANK-SAP (60 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L/sito) e di PBS (0,3  $\mu$ L/sito) [ANOVA a due vie dei dati relativi agli intervalli consecutivi da 5 minuti, attività orizzontale: trattamento,  $F(2,75)=16,30$ ,  $P<0.001$ , intervalli da 5 minuti,  $F(5,75)=72,94$ ,  $P<0.001$ , TRATTAMENTO X INTERVALLI DA 5 MINUTI,  $F(10,75)=1,77$ ,  $P>0.05$ ; attività verticale, trattamento,  $F(2,75)=2,84$ ,  $P>0.05$ , intervalli da 5 minuti,  $F(5,75)=32,21$ ,  $P<0.001$ , TRATTAMENTO X INTERVALLI DA 5 MINUTI,  $F(10,75)=2,16$ ,  $P<0.05$ ].

Un incremento dei valori relativi all'attività locomotoria orizzontale, ma non verticale, è stato riscontrato anche comparando i dati relativi agli animali sottoposti ad iniezione con OXY-SAP 28 giorni dopo l'iniezione e quelli relativi agli stessi animali prima dell'iniezione o 14 giorni dopo essa [ANOVA a due vie dei dati relativi agli intervalli consecutivi da 5 minuti, attività orizzontale, tempo dal trattamento,  $F(2,75)=7,67$ ,  $P<0.01$ , intervalli da 5 minuti  $F(5,75)=51,48$ ,  $P<0.001$ , tempo dal TRATTAMENTO X INTERVALLI DA 5 MINUTI,  $F(10,75)=1,43$ ,  $P>0.05$ ; attività verticale, tempo dal trattamento,  $F(2,75)=1,59$ ,  $P>0.05$ ; intervalli da 5 minuti,  $F(5,75)=21,51$ ,  $P<0.001$ , TEMPO DAL TRATTAMENTO X INTERVALLI DA 5 MINUTI,  $F(10,75)=1,21$ ,  $P>0.05$ ].

I risultati sopra riportati sono ulteriormente confermati dall'ANOVA a due vie delle conte totali relative all'attività locomotoria [attività orizzontale, trattamento,  $F(2,30)=2,21$ ,  $P>0.05$ , tempo dal trattamento,  $F(2,30)=1,14$ ,  $P>0.05$ , TRATTAMENTO X TEMPO DAL TRATTAMENTO,  $F(4,30)=5,40$ ,  $P<0.01$ ; attività verticale, trattamento,  $F(2,30)=0,71$ ,  $P>0.05$ , tempo dal trattamento,  $F(2,30)=6,20$ ,  $P<0.01$ , TRATTAMENTO X TEMPO DAL TRATTAMENTO,  $F(4,30)=1,60$ ,  $P>0.05$ ].

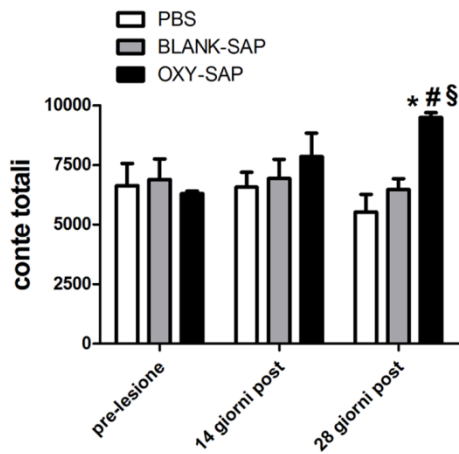
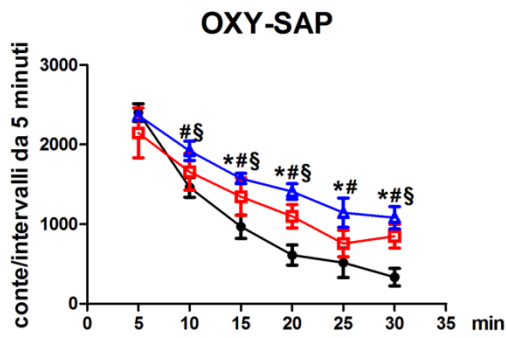
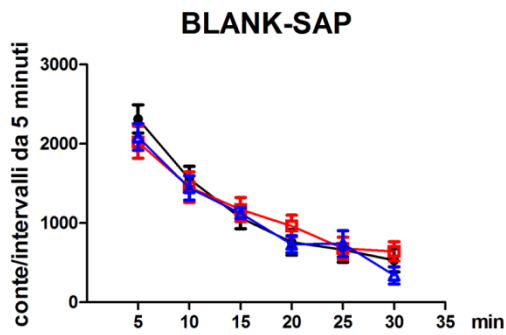
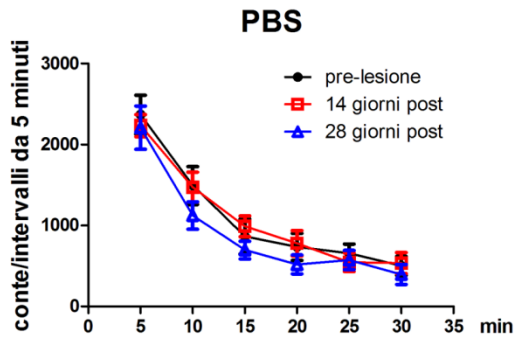
In accordo con questo, l'incremento dell'attività orizzontale, ma non di quella verticale, è stato osservato 28 giorni dopo l'iniezione, ma non prima di essa e 14 giorni dopo essa, comparando i dati ottenuti dagli animali sottoposti ad iniezione con OXY-SAP e quelli ottenuti dagli animali sottoposti ad iniezione con BLANK-SAP e PBS. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata invece osservata confrontando tra loro i dati dell'attività locomotoria orizzontale ottenuti dagli animali sottoposti ad iniezione con BLANK-SAP e PBS, prima dell'iniezione e a 14 e 28 giorni dopo essa [test *post hoc* di Bonferroni, tutte le  $P>0.05$ ].

A differenza di quanto osservato negli animali trattati con OXY-SAP, i test *post hoc* hanno messo in evidenza che gli animali trattati con BLANK-SAP e PBS mostravano una marcata tendenza alla riduzione dei valori di attività locomotoria verticale lungo il test. In accordo con questo, i valori di attività locomotoria verticale registrati negli animali sottoposti a trattamento

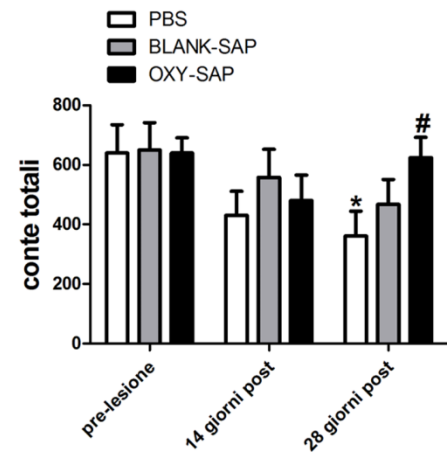
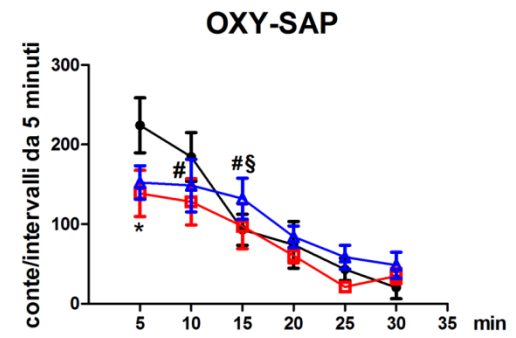
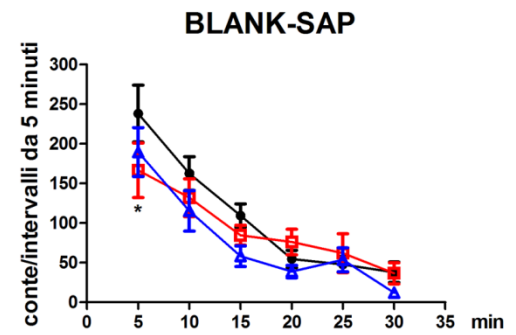
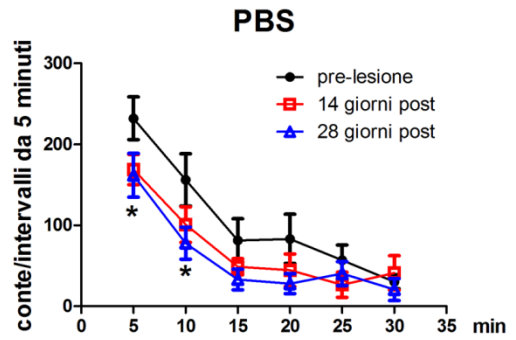
con PBS a 28 giorni dall'iniezione, erano significativamente più bassi rispetto ai corrispondenti valori registrati nello stesso gruppo prima dell'iniezione [test *post hoc* di Bonferroni,  $P < 0.05$ ] e rispetto a quelli registrati, sempre a 28 giorni dall'iniezione, negli animali sottoposti a trattamento con OXY-SAP ma non con BLANK-SAP [test *post hoc* di Bonferroni,  $P < 0.05$  e  $P > 0.05$ , rispettivamente].

**Figura 14.** Attività locomotoria orizzontale e verticale in ratti maschi sottoposti all'iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di Ossitocina-Saporina (OXY-SAP), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) o tampone fosfato salino (PBS). Ciascun animale è stato introdotto singolarmente nell'apparato per la misurazione dell'attività locomotoria subito dopo l'iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP (0.3  $\mu\text{L}/\text{sito}$ , 60 ng/ $\mu\text{L}$ ), BLANK-SAP (0.3  $\mu\text{L}/\text{sito}$ , 60 ng/ $\mu\text{L}$ ) o PBS (0.3  $\mu\text{L}/\text{sito}$ ) e l'attività locomotoria è stata registrata per 30 minuti (6 intervalli consecutivi da 5 minuti). L'attività locomotoria è stata registrata prima (pre-iniezione) e 14 e 28 giorni dopo l'iniezione di OXY-SAP BLANK-SAP o PBS. I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM delle conte relative ai 6 intervalli consecutivi da 5 minuti di 6 ratti per gruppo, o come media  $\pm$  SEM delle conte totali relative all'intera durata dell'esperimento. \* $P < 0.05$  rispetto agli animali trattati con la sola PBS; # $P < 0.05$ , rispetto agli animali trattati con il BLANK-SAP; § $P < 0.05$ , rispetto ai corrispondenti valori pre-iniezione (ANOVA a due vie seguite dal test *post hoc* di Bonferroni).

## Attività Orizzontale



## Attività Verticale



#### 4.5. IMMUNOISTOCHIMICA

Nelle sezioni adiacenti al sito di iniezione (A.P.~ -5.30; Paxinos & Watson, 2007), in condizioni fisiologiche, le proiezioni afferenti ossitocinergiche si osservano quasi esclusivamente nella *pars compacta* della Sostanza Nera mentre sono quasi completamente assenti nella *pars reticulata*. Le afferenze ossitocinergiche sono distribuite dorsalmente rispetto allo strato di neuroni dopaminergici della *pars compacta* della Sostanza Nera e all'interno di quest'ultimo, con una densità maggiore nelle porzioni mediale e centrale (Figura 15, A, B e C) e lievemente inferiore nella *pars lateralis* (dati non mostrati). Entro lo spessore della *pars compacta* della Sostanza Nera, le proiezioni ossitocinergiche corrono in prossimità dei dendriti e dei corpi cellulari dopaminergici impingendo occasionalmente sui corpi cellulari dopaminergici (Figura 15, D,E e F).

Ventotto giorni dopo l'iniezione bilaterale nella Sostanza Nera l'OXY-SAP (Figura 16, E) ha determinato, rispetto alla PBS (Figura 16, A), una riduzione dell'immunopositività per il TH a livello dei corpi cellulari dopaminergici (~ 50-80%) e dei dendriti che da essi si portano alla *pars reticulata* della Sostanza Nera (~ 60-90%). In prossimità del sito di iniezione la riduzione nell'immunoreattività per il TH era generalmente molto più marcata a livello della *pars reticulata* mentre, a livello della *pars compacta* e della *pars lateralis*, era ancora osservabile qualche corpo cellulare e dendrita dopaminergico residuo. Inoltre, la riduzione dell'immunoreattività per il TH era ancora evidente, sebbene meno pronunciata, nelle sezioni più distanti dal sito di iniezione (dati non mostrati).

Il BLANK-SAP (Figura 16, C), quando confrontato con la PBS (Figura 16, A), era anch'esso in grado di determinare, in alcuni dei casi osservati, una lieve riduzione dell'immunopositività per il TH (~5-10%) osservabile principalmente a livello della porzione ventrolaterale della *pars reticulata*.

Non è stata osservata nessuna evidente riduzione dell'immunopositività per il GAD in seguito all'iniezione bilaterale di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS, in nessuno dei casi esaminati (Figura 16, F, D e B, rispettivamente).

Ventotto giorni dopo l'iniezione bilaterale nella Sostanza Nera l' OXY-SAP ha determinato una riduzione dell'immunoreattività per le tre isoforme dei trasportatori vescicolari del glutammato (VGluT1, VGluT2 e VGluT3), di entità diversa per ciascuna isoforma, sia nella *pars compacta* sia nella *pars reticulata* della Sostanza Nera (dove si trovano generalmente espressi, a livello di entrambe le parti, come descritto nelle didascalie delle Figure 17, 18 e 19).

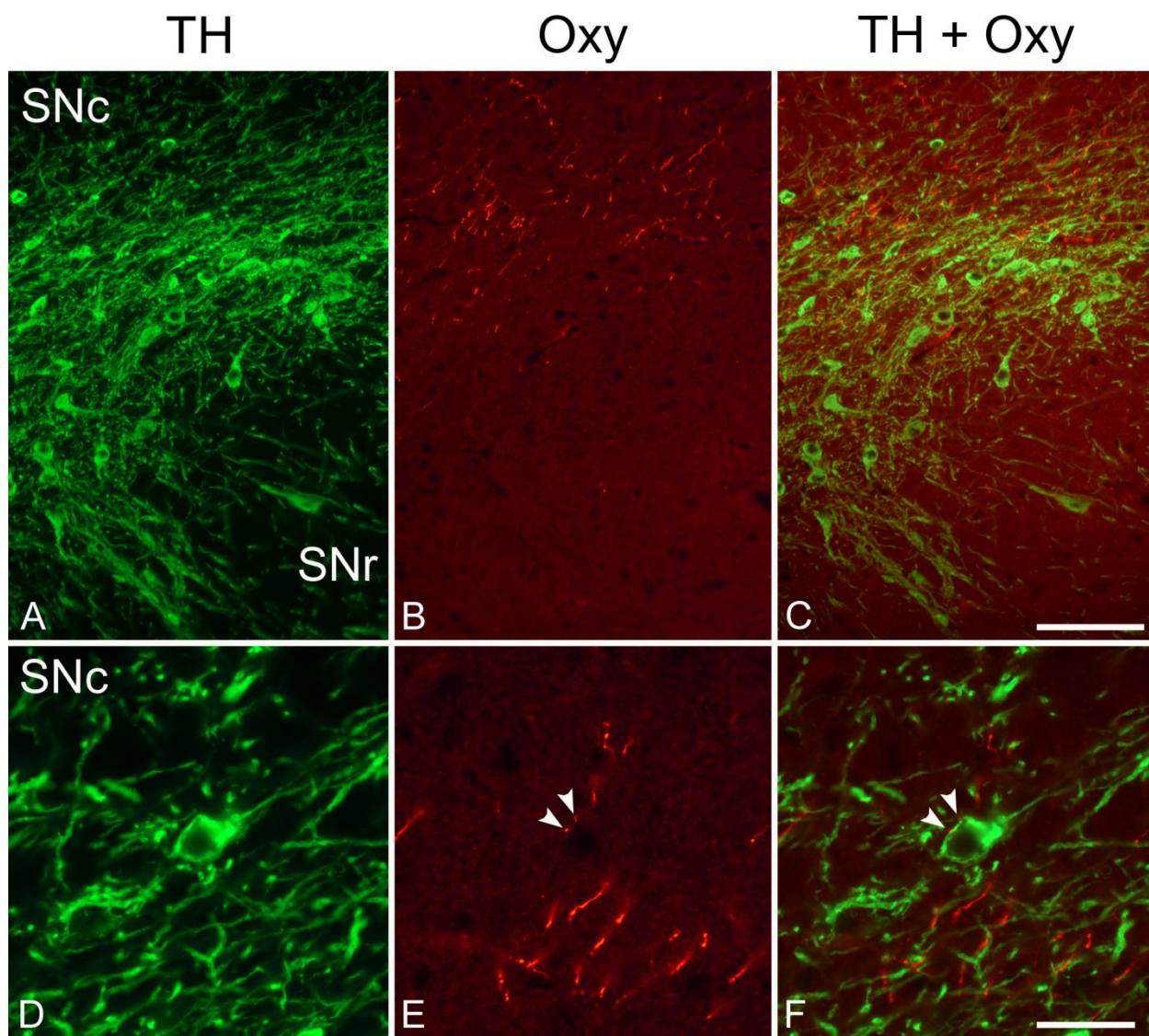
In particolare, la riduzione dell'immunoreattività per il VGluT1 (Figura 17, H) era più pronunciata nella *pars reticulata* (~70-85%) e meno nella *compacta* (~60%), e si manifestava in parallelo alla concomitante riduzione dell'immunoreattività per il TH (freccie in Figura 17, G e H e didascalia). Una notevole riduzione dell'immunoreattività per il VGluT2 (Figura 18, H) ed il VGluT3 (Figura 19, H) (>80% per entrambi) era osservabile sia nella *pars compacta* sia nella *pars reticulata*. In



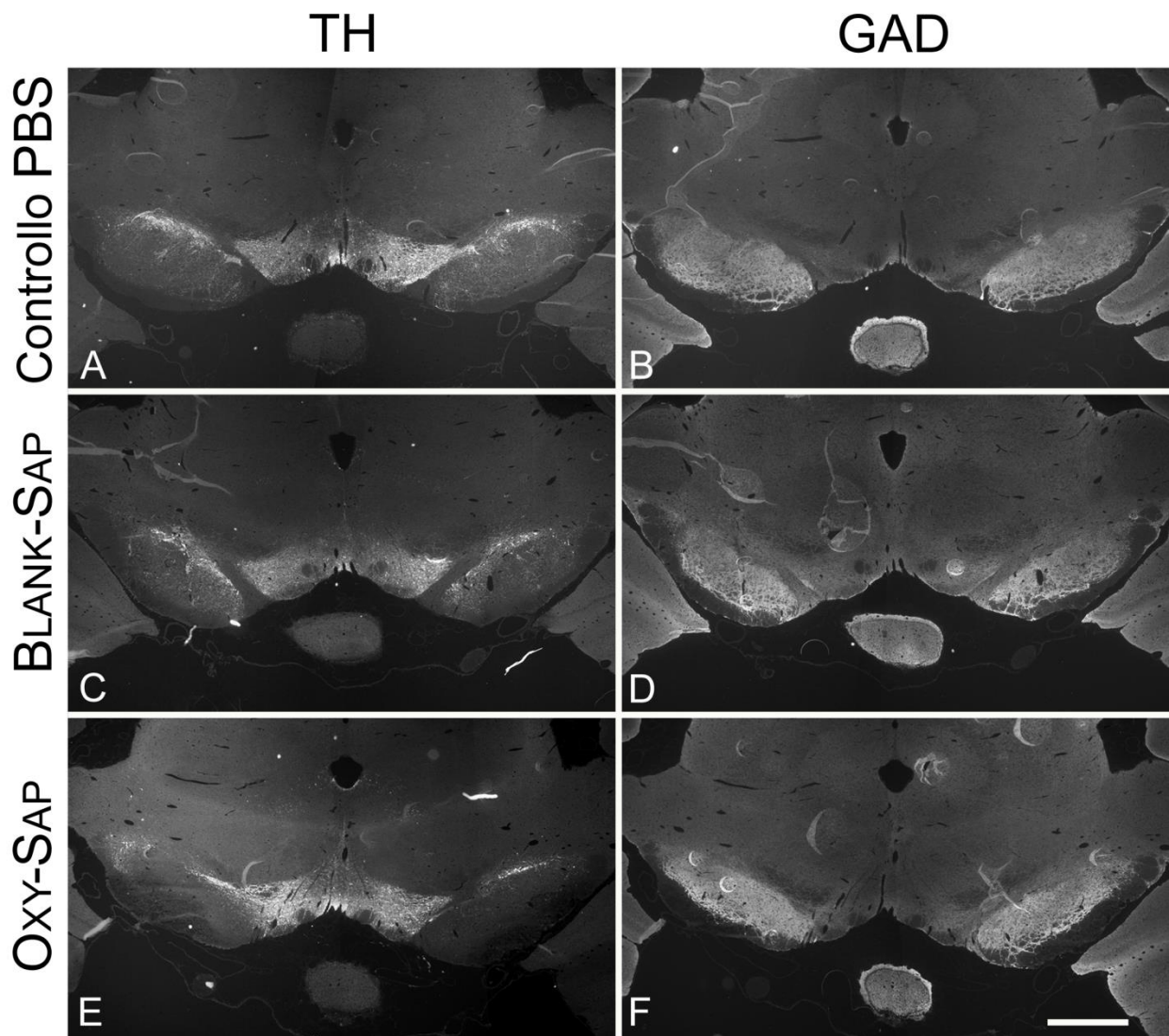
particolare, mentre una piccola quota di immunoreattività residua era osservabile nel caso del VGluT3 (<10%) nel caso del VGluT2 si osservava di frequente una quasi totale assenza di immunoreattività residua.

La riduzione dell'immunoreattività per il VGluT1 era particolarmente evidente quando comparata con quella indotta dal BLANK-SAP (Figura 17, E) che, rispetto al PBS (Figura 17, B) induceva solo una modesta riduzione dell'immunoreattività per il VGluT1 (~5%), principalmente a livello della *pars reticulata* della Sostanza Nera.

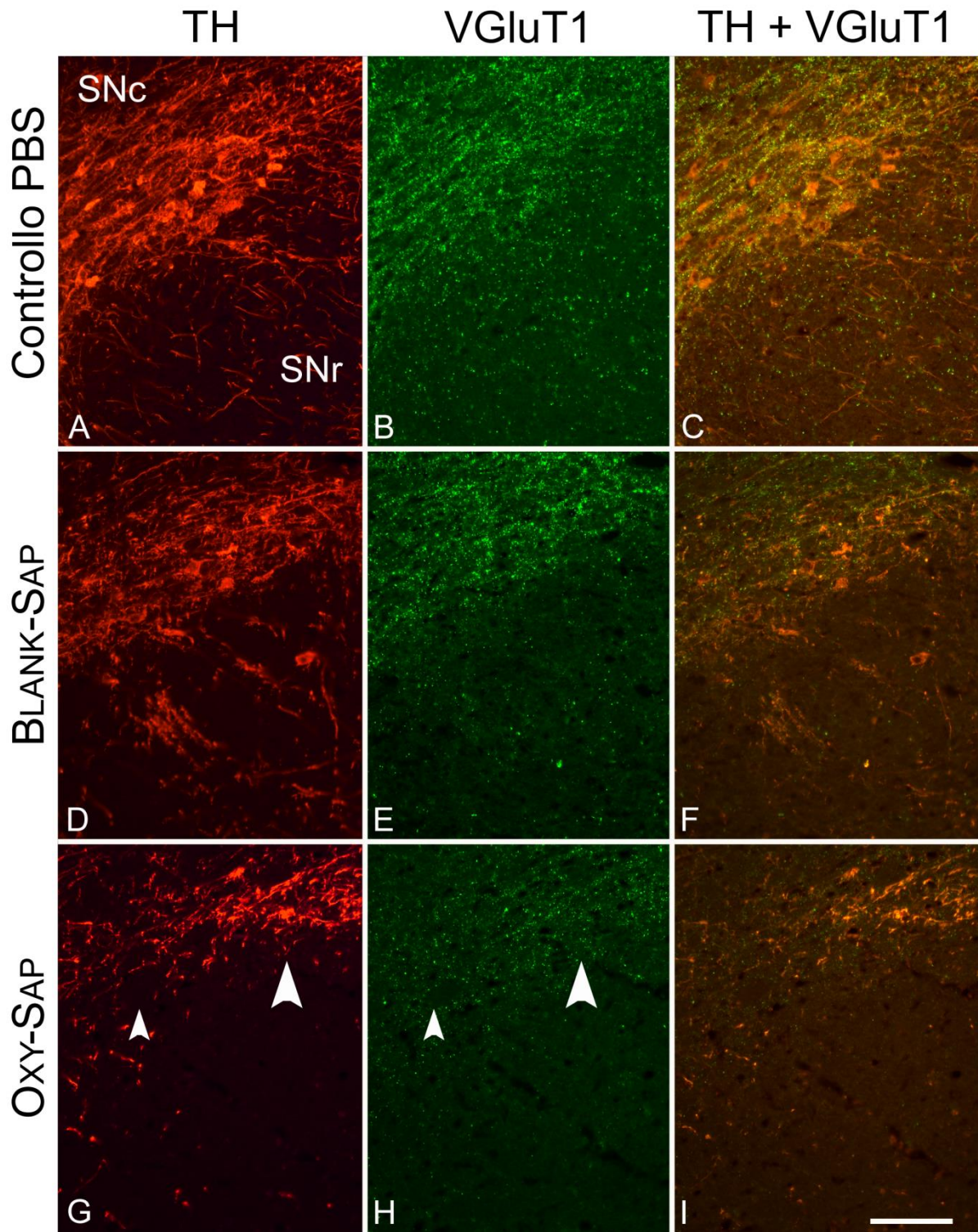
A differenza di quanto osservato per il VGluT1, il BLANK-SAP ha determinato però una evidente riduzione dell'immunoreattività per il VGluT2 (Figura 18, E) ed il VGluT3 (Figura 19, E) (VGluT2>VGluT3, ~ 35-45%) se paragonato al PBS (Figura 18, B e Figura 19, B, rispettivamente).



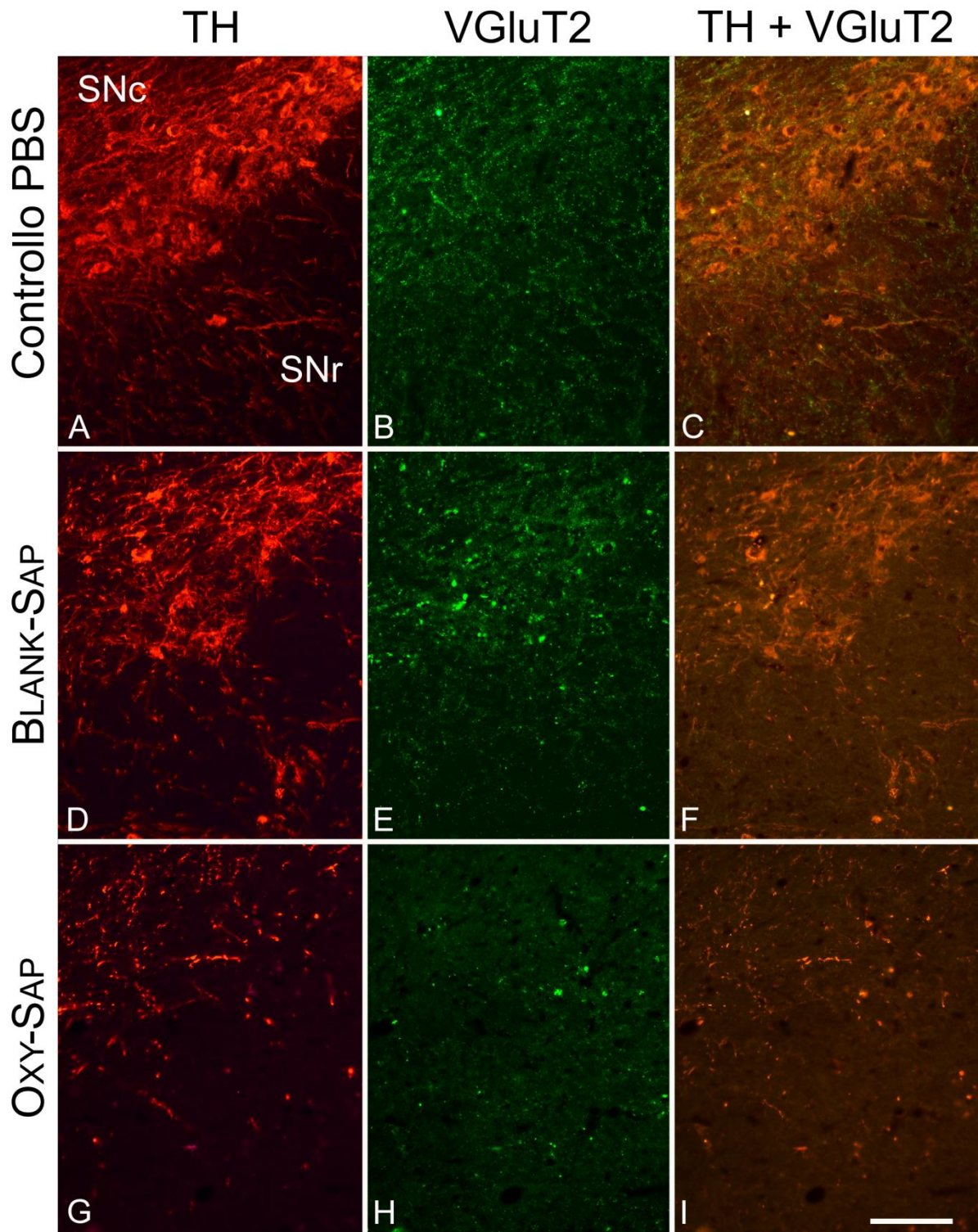
**Figura 15.** Proiezioni ossitocinergiche afferenti alla Sostanza Nera: sezioni corrispondenti all'area in cui sono state effettuate le microiniezioni (A.P.  $\approx$  -5.40; Paxinos & Watson, 2007). In condizioni fisiologiche le fibre ossitocinergiche (Cy3: rosso) si osservano quasi esclusivamente nella *pars compacta* della Sostanza Nera (SNc), con una maggiore densità nella parte centrale (A, B e C). Le fibre ossitocinergiche sono distribuite dorsalmente rispetto allo strato di neuroni dopaminergici della SNc e all'interno di quest'ultimo, dove corrono in prossimità dei dendriti e dei corpi cellulari dopaminergici (TH: Tirosina Idrossilasi, Alexa-488: verde) (D, E e F). Ingrandimento in E ed F: fibra ossitocinergica che impinge (freccie in E ed F) con il soma di un neurone dopaminergico della SNc. Barra: A, B e C = 100  $\mu$ m; D, E e F: 25  $\mu$ m.



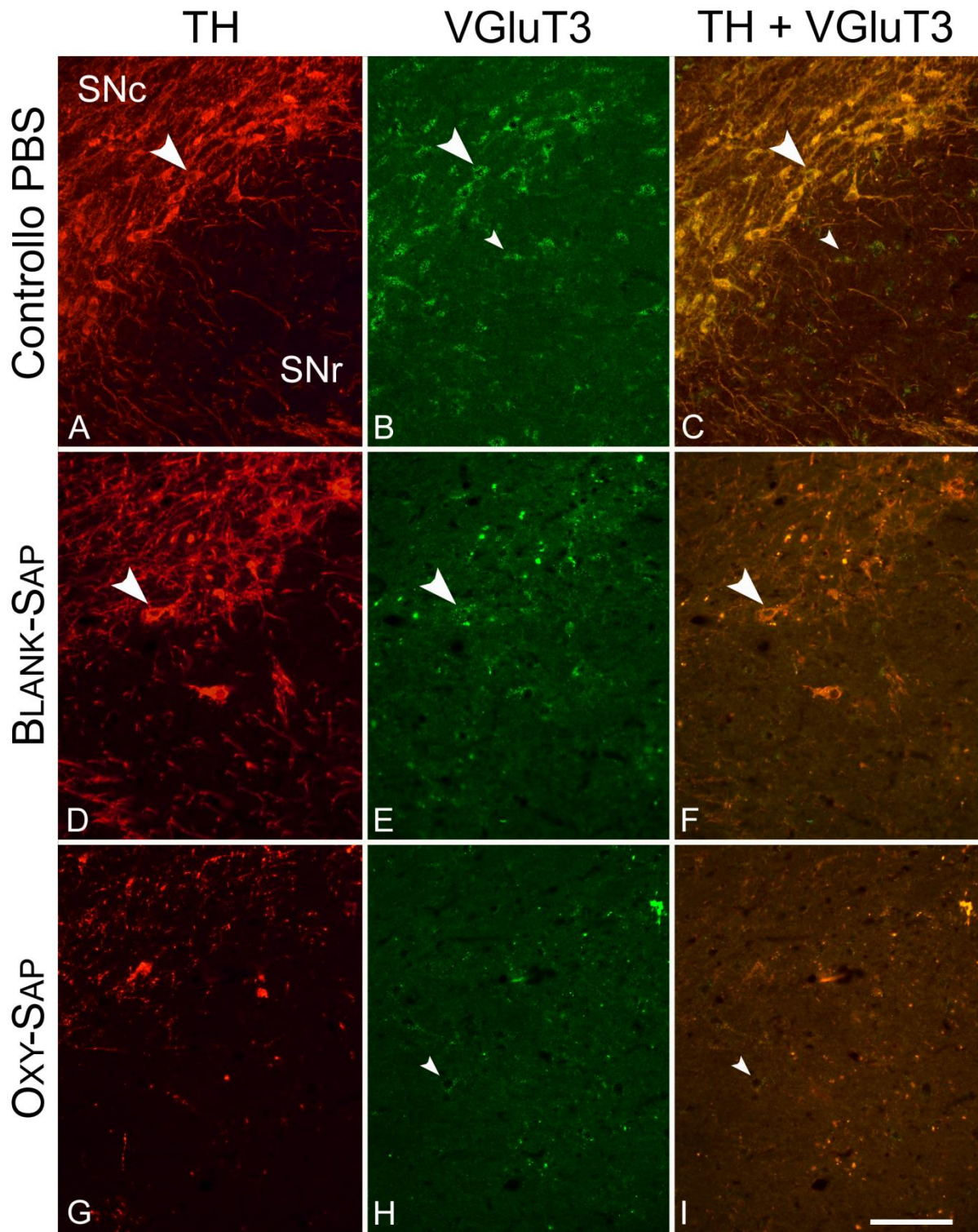
**Figura 16.** Immunoreattività per la Tirosina Idrossilasi (TH) e la Glutammato decarbossilasi (GAD): sezioni coronali della Sostanza Nera adiacenti al sito utilizzato per le microiniezioni (A.P.  $\approx$  -5.30; Paxinos & Watson, 2007) in animali sottoposti ad iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di tampone fosfato salino (PBS) (A e B, rispettivamente), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) (C e D rispettivamente) o Ossitocina-Saporina (OXY-SAP) (E ed F, rispettivamente) a 28 giorni dalla somministrazione. Rispetto alla PBS, l'OXY-SAP induce una riduzione dell'immunoreattività per il TH a livello dei corpi cellulari nella *pars compacta* e dei loro dendriti che si portano alla *pars reticulata* mentre il BLANK-SAP non induce alcuna riduzione, o induce solo una modesta riduzione (principalmente a livello della *pars reticulata*). Non si osserva alcuna evidente riduzione dell'immunoreattività per il GAD nel confronto tra gli animali trattati con BLANK-SAP o Oxy-SAP e quelli trattati con la PBS. Barra: 1 mm.



**Figura 17.** Immunoreattività per la Tirosina Idrossilasi (TH, Cy3: rosso) e il trasportatore vescicolare del glutammato di tipo 1 (VGLuT1, Al-488: verde) e doppia immunolocalizzazione (TH + VGLuT1): sezioni coronali della Sostanza Nera adiacenti al sito utilizzato per le microiniezioni (A.P.  $\approx$  -5.30; Paxinos & Watson, 2007) in animali sottoposti ad iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di tampone fosfato salino (PBS) (A, B e C, rispettivamente), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) (D, E e F, rispettivamente) o Ossitocina-Saporina (OXY-SAP) (G, H e I, rispettivamente) a 28 giorni dalla somministrazione. Negli animali sottoposti ad iniezione di PBS, il VGLuT1 (B) è espresso sia nella *pars compacta* (SNc) sia nella *pars reticulata* (SNr), con una densità maggiore a livello della SNc. 28 giorni dopo l'iniezione il BLANK-SAP non induce alcuna riduzione dell'immunoreattività per il VGLuT1 (E), ad eccezione di una leggera riduzione, principalmente a livello della SNr, che si manifesta solo in parallelo al manifestarsi di una riduzione dell'immunoreattività per il TH. L'OXY-SAP induce una riduzione della immunoreattività per il VGLuT1 (H), pressoché completa a livello della SNr e meno pronunciata nella SNc, con un parallelismo tra l'entità della riduzione dell'immunoreattività per il TH e la diminuzione dell'immunoreattività per il VGLuT1 [a livelli più bassi di immunoreattività per il TH corrispondono livelli più bassi di immunoreattività per il VGLuT1 (freccie grandi in G e H) e viceversa (freccie piccole in G e H)]. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 18.** Immunoreattività per la Tirosina Idrossilasi (TH, Cy3: rosso) e il trasportatore vescicolare del glutammato di tipo 2 (VGLuT2, Al-488: verde) e doppia immunolocalizzazione (TH + VGLuT2): sezioni coronali della Sostanza Nera adiacenti al sito utilizzato per le microiniezioni (A.P.  $\approx$  -5.30; Paxinos & Watson, 2007) in animali sottoposti ad iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di tampone fosfato salino (PBS) (A, B e C, rispettivamente), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) (D, E e F, rispettivamente) o Ossitocina-Saporina (OXY-SAP) (G, H e I, rispettivamente) a 28 giorni dalla somministrazione. Negli animali sottoposti ad iniezione di PBS, il VGLuT2 (B) è espresso sia nella *pars compacta* (SNc) sia nella *pars reticulata* (SNr), con una densità lievemente maggiore a livello della SNc. 28 giorni dopo l'iniezione l'OXY-SAP induce una pressoché completa riduzione dell'immunoreattività per il VGLuT2 (H) sia nella SNc sia nella SNr, con un forte parallelismo tra la riduzione dell'immunoreattività per il TH (G) e quella per il VGLuT2. Anche il BLANK-SAP determina una riduzione dell'immunoreattività per il VGLuT2 (E) sia nella SNc sia nella SNr, ma in misura notevolmente inferiore rispetto all'OXY-SAP e con un modesto effetto sull'immunoreattività per il TH (D). Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 19.** Immunoreattività per la Tirosina Idrossilasi (TH, Cy3: rosso) e il trasportatore vescicolare del glutammato di tipo 3 (VGLuT3, Al-488: verde) e doppia immunolocalizzazione (TH + VGLuT3): sezioni coronali della Sostanza Nera adiacenti al sito utilizzato per le microiniezioni (A.P.  $\approx$  -5.30; Paxinos & Watson, 2007) in animali sottoposti ad iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di tampone fosfato salino (PBS) (A, B e C, rispettivamente), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) (D, E e F, rispettivamente) o Ossitocina-Saporina (OXY-SAP) (G, H e I, rispettivamente) a 28 giorni dalla somministrazione. Il VGLuT3 (B, E e H) è espresso a livello perisomatico principalmente in corpi cellulari dopaminergici della *pars compacta* (SNc) (freccie grandi) e in un ridotto numero di corpi cellulari non-dopaminergici nella *pars reticulata* (SNr) (freccie piccole). 28 giorni dopo la somministrazione l'OXY-SAP induce una pressoché completa riduzione dell'immunoreattività per il VGLuT3 (H) sia nella SNc sia nella SNr, con un forte parallelismo tra la riduzione dell'immunoreattività per il TH (G) e quella per il VGLuT3. Anche il BLANK-SAP determina una riduzione dell'immunoreattività per il VGLuT3 (E) sia nella SNc sia nella SNr, ma in misura notevolmente inferiore rispetto all'OXY-SAP e con un modesto effetto sull'immunoreattività per il TH (D). Barra: 100  $\mu$ m.

## **5. DISCUSSIONE**

I risultati dei nostri studi mostrano che, nel ratto maschio, la manipolazione del sistema ossitocinergico nigrale, ottenuta mediante la somministrazione di ossitocina esogena e dell'antagonista selettivo per i recettori ossitocinerfici  $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina, e la lesione delle cellule nigrali che esprimono i recettori per l'ossitocina, ottenuta mediante la somministrazione, nella Sostanza Nera, dell'agente lesivo Ossitocina-saporina (OXY-SAP), una neurotossina in grado di distruggere le cellule che esprimono recettori per l'ossitocina sulla superficie della membrana cellulare (Baskin et al., 2010), induce delle modificazioni nell'attività locomotoria spontanea. Questi dati, uniti all'evidenza di una correlazione tra le modificazioni dell'attività locomotoria e la riduzione nell'immunoreattività per la Tirosina Idrossilasi (TH) e le tre isoforme dei trasportatori vescicolari per il glutammato (VGLuT1, VGLuT2 e VGLuT3) osservate a 28 giorni dall'iniezione dell'agente citotossico, suggeriscono che la Sostanza Nera sia una delle aree cerebrali a livello delle quali l'ossitocina agisce per esercitare un'azione modulatrice sull'attività locomotoria.

I dati ottenuti nel nostro studio confermano ed integrano i risultati ottenuti in studi precedenti che hanno suggerito un coinvolgimento dell'ossitocina nel controllo dell'attività locomotoria (Uvnäs-Moberg et al., 1994; Klenerova et al., 2009; Maejima et al., 2015). In particolare, i risultati ottenuti nei nostri studi confermano che nel ratto maschio, utilizzando un *paradigma sperimentale non legato alla novelty*, l'ossitocina riduce l'attività locomotoria quando somministrata per via intraperitoneale a dosi elevate (2 mg/kg).

Dosi più basse (0.5 e 50  $\mu$ g/kg) non si sono invece dimostrate in grado di indurre alcun effetto rispetto alla somministrazione di un volume equivalente di veicolo, in contrasto con gli studi di Uvnäs-Moberg e collaboratori (1994), Klenerova e collaboratori (2009) e Maejima e collaboratori (2015), secondo i quali la somministrazione per via intraperitoneale di basse dosi di ossitocina, simili a quelle impiegate nei nostri studi, determina invece un incremento dell'attività locomotoria. Tale discrepanza potrebbe essere correlabile all'impiego, nei nostri studi, di un *paradigma sperimentale non legato alla novelty* il quale, riducendo i livelli di ansia correlati all'esposizione dell'animale ad un ambiente nuovo, annulla l'effetto ansiolitico dell'ossitocina. Tale effetto ansiolitico viene infatti riportato come apparentemente responsabile dell'incremento dell'attività locomotoria indotto dalla somministrazione di basse dosi del neuropeptide.

In ogni modo, l'effetto inibitorio sull'attività locomotoria di alte dosi di ossitocina osservato nei nostri studi, sembra essere mediato dalla stimolazione dei recettori ossitocinerfici localizzati nel sistema nervoso centrale, dato che tale effetto è antagonizzato completamente dalla somministrazione per via intracerebroventricolare di  $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina, un antagonista selettivo per i recettori dell'ossitocina (Bankowski et al., 1980), a dosi che di per se non influenzano l'attività locomotoria.

Questi risultati sono simili a quelli riportati nello studio di Uvnäs-Moberg e collaboratori (1992) che ha evidenziato come, nel ratto, la somministrazione di ossitocina per via intraperitoneale a



dosi comprese tra 0.1 e 1.0 mg/kg o intracerebroventricolare alle dosi di 2 e 20 ng determina una riduzione dell'attività esploratoria alla periferia dell'arena di un open-field e un incremento della percentuale di tempo speso dall'animale al centro dell'arena. Sempre secondo lo studio sopraccitato, inoltre, la riduzione dell'attività esploratoria è antagonizzata dalla somministrazione intraperitoneale o intracerebroventricolare di un antagonista dei recettori ossitocinergici, a dosi che di per se non inducono alcun effetto a livello comportamentale.

In accordo con l'ipotesi di un'azione a livello centrale dell'ossitocina nel mediare una riduzione dell'attività locomotoria, il nostro studio mostra per la prima volta che l'iniezione bilaterale di ossitocina nella Sostanza Nera determina una riduzione dell'attività locomotoria in maniera dose-dipendente. Questo risultato suggerisce pertanto che la Sostanza Nera possa essere una delle aree cerebrali a livello delle quali l'ossitocina, somministrata per via sistemica, agisce allo scopo di inibire l'attività locomotoria. In linea con questa ipotesi, l'iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di  $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$  alla dose di 2  $\mu\text{g}/\text{sito}$  di iniezione causa un incremento dell'attività locomotoria. Nel complesso, i risultati sino ad ora discussi, suggeriscono l'esistenza, nella Sostanza Nera, di un tono ossitocinergico endogeno inibitorio tonicamente attivo sulla attività locomotoria.

Uno dei meccanismi attraverso cui l'ossitocina determina una riduzione dell'attività locomotoria potrebbe essere l'inibizione del sistema dopaminergico nigrostriatale. Tale riduzione potrebbe essere mediata dalla stimolazione dei recettori ossitocinergici localizzati nei neuroni dopaminergici nigrostriatali o in altri neuroni nigrali che potrebbero, a loro volta, interferire in maniera diretta o indiretta con l'attività del sistema dopaminergico nigrostriatale. In accordo con queste ipotesi, i neuroni dopaminergici che sono localizzati nella pars compacta della Sostanza Nera e proiettano allo striato, giocano un ruolo di fondamentale importanza nell'iniziazione e nell'espressione dei movimenti (Björklund and Dunnet, 2007 e referenze ivi contenute). Infatti, i neuroni striatali inviano proiezioni inibitorie non solo al globo pallido e al nucleo entopeduncolare ma anche alla *pars compacta* e a quella *reticulata* della Sostanza Nera (Costall et al., 1972; Marshall and Ungerstedt, 1977; Hauber, 1998; Radnikow and Misgeld, 1998) inoltre, la pars reticulata della Sostanza Nera contiene i corpi cellulari di neuroni che proiettano a varie aree cerebrali importanti per il tono muscolare posturale e per l'iniziazione e l'esecuzione dei movimenti, come ad esempio il collicolo superiore, il nucleo peduncolopontino ed il talamo (Takakusaki et al., 2003; Hauber, 1998).

Il nostro studio, in accordo con gli studi di *Loup e collaboratori* (1989) e *Vaccari e collaboratori* (1998), i quali hanno dimostrato la presenza dei recettori ossitocinergici e del loro RNA messaggero nella Sostanza Nera umana e di ratto, rispettivamente, ha altresì dimostrato la presenza di proiezioni nervose afferenti alla Sostanza Nera immunopositive per l'ossitocina. Tali proiezioni sono osservabili pressoché esclusivamente a livello della pars compacta della

Sostanza Nera e corrono in prossimità di corpi cellulari immunopositivi per la Tirosina Idrossilasi (neuroni dopaminergici), con i quali contraggono di frequente rapporti sinaptici.

È tuttavia improbabile che la riduzione dell'attività locomotoria indotta dall'ossitocina sia secondaria ad una riduzione dell'attività dei neuroni dopaminergici nigrostriatali causata, a sua volta, dalla stimolazione dei recettori ossitocinergici localizzati in questi neuroni. Infatti, diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'ossitocina facilita, piuttosto che inibire, l'attività dei neuroni dopaminergici, ad esempio quando iniettata nella VTA, area dove l'iniezione di questo neuropeptide induce erezione peniena. Tale effetto si manifesta in concomitanza ad un incremento del rilascio di dopamina nel nucleus accumbens e nella corteccia prefrontale mediale (Melis et al., 2007; Sanna et al., 2012). Sembra quindi molto più probabile che la riduzione nell'attività locomotoria indotta dalla somministrazione di ossitocina nella Sostanza Nera sia mediata da meccanismi diversi dall'inibizione diretta dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Ad esempio l'ossitocina potrebbe agire sui propri recettori localizzati su neuroni non-dopaminergici presenti nella Sostanza Nera che potrebbero interferire direttamente o indirettamente con l'attività del sistema dopaminergico nigrostriatale, ad esempio attraverso l'inibizione di sinapsi eccitatorie (glutamatergiche) che attivano i neuroni nigrostriatali dopaminergici o attraverso l'attivazione di sinapsi GABAergiche che inibiscono le sinapsi glutamatergiche che impingono sui neuroni dopaminergici nigrostriatali.

La presenza di tali sinapsi eccitatorie o inibitorie nella Sostanza Nera in grado di modulare l'attività dei neuroni dopaminergici nigrostriatali è infatti ampiamente documentata (Hauber, 1998; Kaneda et al., 2005; Windels and Kiyatkin, 2006; Lee et al., 2013; Morales and Root, 2014).

I meccanismi sopra menzionati potrebbero tuttavia non escludersi a vicenda, contribuendo tutti insieme alla determinazione dell'attività finale dei neuroni dopaminergici nigrostriatali.

A sostegno dell'ipotesi che i sopraccitati recettori ossitocinergici siano localizzati su neuroni non dopaminergici, probabilmente su terminali nervosi di natura glutamatergica, è proprio l'incremento dell'attività locomotoria spontanea osservato in seguito all'iniezione bilaterale di OXY-SAP. Tale incremento è particolarmente evidente 28 giorni dopo il trattamento con OXY-SAP, se comparato con i valori dell'attività locomotoria degli animali di controllo sottoposti ad iniezione bilaterale con una quantità equimolare di un peptide inattivo coniugato con la saporina (BLANK-SAP) o con un volume equivalente di PBS (valori ottenuti per l'attività locomotoria: OXY-SAP > BLANK-SAP ~ PBS). L'incremento dell'attività locomotoria spontanea si manifesta, negli animali trattati con OXY-SAP, in concomitanza ad una marcata riduzione, nella Sostanza Nera, dell'immunoreattività non solo per la Tirosina Idrossilasi ma anche per le tre isoforme del trasportatore vescicolare per il glutammato, VGluT1, VGluT2 e VGluT3 (sebbene di entità diversa per ciascuno di essi) e nessuna evidente modificazione nell'immunopositività per la

Glutammato Decarbossilasi. Tali osservazioni suggeriscono che il trattamento con l' OXY-SAP induce una marcata distruzione dei neuroni dopaminergici nigrali (come evidenziato dalla caduta dell'immunoreattività per la Tirosina Idrossilasi) e della componente neuronale glutammatergica (come evidenziato dalla caduta dell'immunoreattività per le tre isoforme dei trasportatori vescicolari per il glutammato), che comprende i neuroni glutammatergici localizzati nella Sostanza Nera, le loro relative efferenze e le afferenze glutammatergiche che, come discusso precedentemente, arrivano alla Sostanza Nera da altri nuclei cerebrali. Tali modificazioni si verificano in assenza di una distruzione dei neuroni GABA-ergici (come dimostrato dall'assenza di evidenti modificazioni a carico dell'immunopositività per la Glutammato Decarbossilasi nei ratti trattati con l'OXY-SAP) suggerendo pertanto che i recettori ossitocinergici sono localizzati a livello dei neuroni dopaminergici e glutammatergici, ma non di quelli GABAergici.

Poiché è ben noto che la distruzione dei neuroni dopaminergici è responsabile di una riduzione dell'attività locomotoria spontanea, come riscontrato ad esempio in seguito alla somministrazione bilaterale della neurotossina 6-idrossi-dopamina (6-OHDA) (Grieb et al., 2013), mentre nel nostro studio nonostante la distruzione dei neuroni dopaminergici che esprimono i recettori ossitocinergici indotta dalla somministrazione di OXY-SAP, si registra un incremento dell'attività locomotoria spontanea, è probabile che tale modificazione dell'attività locomotoria sia riconducibile ad una alterazione dell'attività dei neuroni glutammatergici piuttosto che di quelli dopaminergici presenti nella Sostanza Nera. In accordo con ciò, infatti, è ben noto che la distruzione dei neuroni dopaminergici nigrali (ad esempio in seguito alla somministrazione di 6-OHDA) riduce l'attività delle efferenze GABAergiche striatali e determina un incremento dell'attività dei neuroni glutammatergici, che originano principalmente dal Nucleo Subtalamico (ma anche da altri nuclei cerebrali come il collicolo superiore, il nucleo peduncolopontino, la corteccia e altri) e fanno sinapsi con i neuroni GABAergici della *pars reticulata*, i quali proiettano ad altri nuclei del circuito dei Gangli della Base (tra cui il talamo ed altri nuclei del tronco cerebrale quali il collicolo superiore ed il nucleo peduncolopontino) (Hauber, 1998, Melis and Gale, 1983, 1984a,b; Martin-Ibanez et al., 2006).

In presenza di una perdita dei neuroni dopaminergici nigrostriatali, una riduzione del tono glutammatergico nella *pars reticulata* della Sostanza Nera, che sperimentalmente può essere ottenuto, ad esempio, mediante l'iniezione nella *pars reticulata* di un antagonista selettivo per i recettori glutammatergici, ha un'azione facilitatoria sull'attività locomotoria. Tale azione pare essere apparentemente mediata dalla riduzione della modalità di scarica *in burst* delle efferenze GABAergiche originanti dalla *pars reticulata* della Sostanza Nera (Hauber, 1998; Takakusaki et al., 2003; Kaneda et al., 2005; Windels and Kiyatkin, 2006; Lee et al., 2013; Morales and Root, 2014). Simili condizioni sperimentali potrebbero verificarsi negli animali che, in questo studio, sono stati trattati con OXY-SAP. In essi, infatti, la citotossina induce non solo la distruzione dei

neuroni dopaminergici nigrali ma anche quella dei terminali glutammatergici che proiettano alla *pars reticulata* (e che hanno probabilmente origine dal nucleo subtalamico, dal collicolo superiore, dal nucleo peduncolopontino, dalla corteccia frontale e da altri nuclei) (Hauber, 1998; Takakusaki et al., 2003; Kaneda et al., 2005; Windels and Kiyatkin, 2006; Martin-Ibanez et al., 2006; Lee et al., 2013; Morales and Root, 2014 e referenze ivi contenute). La distruzione dei neuroni glutammatergici potrebbe pertanto determinare una riduzione dell'ipertono glutammatergico alla quale consegue, a sua volta, una riduzione delle alterazioni motorie indotte dalla distruzione dei neuroni dopaminergici nigrali. Il risultato dell'azione combinata sui sistemi dopaminergico e glutammatergico determina quindi l'incremento dell'attività motoria, come osservato negli animali sottoposti a trattamento con OXY-SAP.

La suddetta interpretazione è in parte complicata dall'inaspettata riduzione dell'immunoreattività per due isoforme del trasportatore vescicolare per il glutammato, il VGluT2 ed il VGluT3, osservata negli animali in cui è stato somministrato il BLANK-SAP. Sembrerebbe infatti che il BLANK-SAP sia in grado di colpire selettivamente le popolazioni neuronali esprimenti il VGluT2 ed il VGluT3, ma non quelle esprimenti il TH o il VGluT1 (è osservabile solo una minima riduzione dell'immunoreattività per il VGluT1), in contrasto con il fatto che tale composto dovrebbe essere privo di attività biologica.

Sebbene le riduzioni di immunoreattività osservate in seguito al trattamento con il BLANK-SAP non siano così drammatiche come quelle osservate in seguito al trattamento con l'OXY-SAP, esse sarebbero dovute essere in grado di determinare un incremento dell'attività locomotoria di una qualche entità, negli animali trattati con il BLANK-SAP, al pari di quanto osservato per l'OXY-SAP. Infatti, in linea con la sopramenzionata interpretazione, la riduzione dell'immunoreattività per il VGluT2 ed il VGluT3 è indicativa di un danno a carico delle afferenze glutammatergiche alla Sostanza Nera, come precedentemente detto per l'OXY-SAP. Una ragione per cui non si sono osservate delle modificazioni nell'attività basale degli animali trattati con il BLANK-SAP, a dispetto della riduzione dell'immunoreattività per il VGluT2 ed il VGluT3, potrebbe essere il fatto che il BLANK-SAP induce una riduzione dell'immunopositività per il TH di entità talmente modesta rispetto a quella indotta dall'OXY-SAP da poter essere trascurata. Negli animali trattati con BLANK-SAP, pertanto, il sistema dopaminergico nigrale è ancora attivo. Poiché la distruzione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali è necessaria al fine di attivare le modificazioni a carico del tono glutammatergico e GABAergico che, come discusso in precedenza, influenzano a loro volta l'attività locomotoria, la mancata distruzione del sistema dopaminergico potrebbe spiegare il motivo per cui, in seguito al trattamento con il BLANK-SAP, non sono osservabili modificazioni a carico dell'attività locomotoria basale, nonostante la distruzione delle afferenze glutammatergiche esprimenti il VGluT2 ed il VGluT3. La distruzione contemporanea, nella Sostanza Nera, dei sistemi dopaminergico e glutammatergico, così come osservato in seguito

al trattamento con l'OXY-SAP, sembrerebbe essere pertanto la condizione necessaria all'incremento dell'attività locomotoria basale.

Qualunque sia il meccanismo responsabile della riduzione, a livello nigrale, dell'immunoreattività per il VGluT2 ed il VGluT3 indotta dal BLANK-SAP e dell'incapacità di tale riduzione nell'indurre un incremento dell'attività locomotoria basale, i risultati di questo studio suggeriscono che l'ossitocina endogena può modulare l'attività locomotoria agendo sui recettori ossitocinergici localizzati sui terminali glutammatergici e influenzando indirettamente il sistema dopaminergico nigrostriatale. Questo determinerebbe, a sua volta, una facilitazione dell'attività delle efferenze GABAergiche nigrali e le corrispondenti alterazioni a carico dell'attività locomotoria comunemente associate a tale azione (Hauber, 1998).

Poiché nella Sostanza Nera intatta, l'incremento del tono ossitocinergico (ottenuto mediante la somministrazione bilaterale, nella Sostanza Nera, di ossitocina esogena) determina una riduzione dell'attività locomotoria, mentre la sua abolizione (ottenuta mediante la somministrazione bilaterale, nella Sostanza Nera, dell'antagonista dei recettori ossitocinergici  $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina e, in maniera ancor più marcata, in seguito alla distruzione dei neuroni dopaminergici e glutammatergici nigrali indotta dall'OXY-SAP) determina un incremento dell'attività locomotoria basale, è improbabile che l'ossitocina eserciti un'azione inibitoria diretta agendo sui recettori ossitocinergici posti sui neuroni dopaminergici nigrostriatali. È importante sottolineare che non è tuttavia possibile escludere la possibilità che l'OXY-SAP sia in grado di determinare la distruzione di altri sistemi neurotrasmettitoriali o neuropeptidici esprimenti i recettori per l'ossitocina non indagati in questo studio che potrebbero essere pertanto in grado di modificare l'attività locomotoria agendo a livello della Sostanza Nera.

A dispetto delle incertezze sino ad ora discusse, la capacità dell'ossitocina di influenzare l'attività locomotoria agendo su diversi sistemi neurotrasmettitoriali a livello della Sostanza Nera, suggerisce che questo neuropeptide possa esercitare un'azione modulatrice sul controllo dell'attività locomotoria. A tal riguardo è degno di nota che la degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali giochi un ruolo di fondamentale importanza nelle disabilità motorie della malattia di Parkinson, tra cui figurano la bradicinesia, la rigidità, il tremore a riposo e l'instabilità posturale (Lees et al., 2009), e che studi post-mortem condotti su pazienti affetti da tale malattia abbiano evidenziato una significativa riduzione dei neuroni ossitocinergici a livello ipotalamico (Purba et al., 1994). Tale riduzione è stata associata all'aumento dell'appetito e all'impotenza osservati in questi pazienti, in linea con i ben noti effetti dell'ossitocina sull'inibizione dell'assunzione di cibo (Maguire et al., 2013) e il ruolo facilitatorio sull'erezione peniena ed il comportamento sessuale (Argiolas and Melis, 2004, 2013; Melis and Argiolas, 2011; Gil et al., 2013). È stato inoltre dimostrato che l'ossitocina è in grado di ridurre il danno a carico dei neuroni dopaminergici striatali indotto dalla somministrazione di rotenone e la

soppressione dell'attività neuronale anomala che si manifesta a livello striatale in seguito alla lesione dei neuroni dopaminergici da esso indotta (Erbas et al., 2012,2013).

Poiché la maggior parte dei neuroni ossitocinergici presenti a livello cerebrale ha origine dal Nucleo Paraventricolare dell'ipotalamo e dalle adiacenti regioni periventricolari, è probabile che la riduzione del numero di neuroni ossitocinergici riscontrata in pazienti affetti dalla malattia di Parkinson sia in grado di render conto della riduzione dei livelli di ossitocina nella Sostanza Nera e in altre aree cerebrali che ricevono proiezioni ossitocinergiche. Data la capacità dell'ossitocina di influenzare l'attività locomotoria, tale riduzione potrebbe giocare un ruolo nelle alterazioni motorie riscontrabili nei pazienti affetti dalla malattia di Parkinson. L'ipotesi di una possibile valutazione dell'ossitocina come target per il controllo dei disturbi motori che si manifestano nella malattia di Parkinson o in altri disturbi dei Gangli della Base necessita tuttavia di ulteriori approfondimenti.

## **6. CAPITOLO SUPPLEMENTARE**

## 6.1. INTRODUZIONE

Allo scopo di completare il quadro relativo alla valutazione degli effetti indotti dall'iniezione di Ossitocina-Saporina (OXY-SAP) e Bianco-Saporina (BLANK-SAP) nella Sostanza Nera, gli studi relativi al modello di iniezione bilaterale, esposti in questo lavoro di tesi, sono stati replicati (utilizzo della dose di 60 ng/ $\mu$ L già impiegata nel modello di iniezione bilaterale) ed estesi (aggiunta della dose di 120 ng/ $\mu$ L) in un modello di iniezione unilaterale. Uno dei vantaggi connessi all'impiego di un modello sperimentale unilaterale risiede principalmente nella possibilità di utilizzare il lato cerebrale non iniettato (intatto) come controllo interno, agevolando la comparazione diretta tra i cambiamenti indotti dall'agente in esame nell'emisfero iniettato e il quadro "fisiologico" dell'emisfero intatto. In secondo luogo, poiché i dati ottenuti in seguito all'iniezione bilaterale di OXY-SAP erano indicativi di un'avvenuta lesione a carico del sistema dopaminergico *nigrostriatale* - sebbene sia importante sottolineare che tale sistema neurotrasmettitoriale non è l'unico ad essere colpito – il modello di somministrazione unilaterale può essere studiato, con maggiore facilità, in analogia ad altri modelli consolidati di lesione del sistema dopaminergico *nigrostriatale*, tipicamente unilaterali, come il ben noto modello di lesione con la neurotossina 6-idrossi-dopamina (6-OHDA).

Una lesione unilaterale dei corpi cellulari dopaminergici della Sostanza Nera determina, nel lato interessato dalla lesione, una degenerazione della via dopaminergica *nigrostriatale* ascendente con una concomitante riduzione della dopamina presente a livello striatale. Questo, a sua volta, induce nel lato denervato una supersensibilità dei recettori dopaminergici D<sub>2</sub> striatali (Graham et al., 1990).

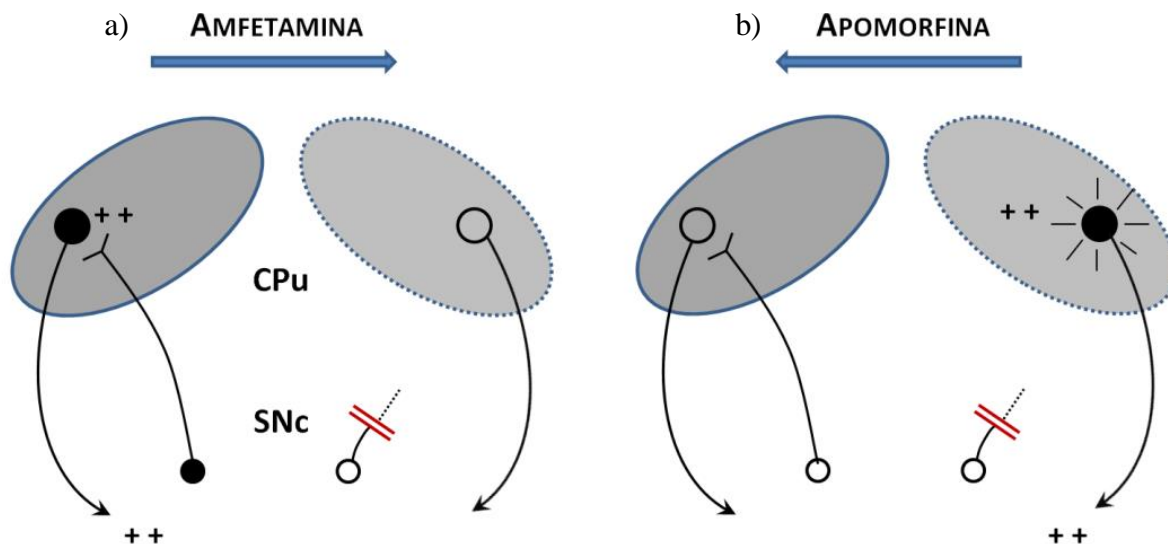
Lo squilibrio dopaminergico indotto a livello striatale non causa di per sé una spontanea asimmetria nella coordinazione motoria extrapiramidale. Questa asimmetria può essere però messa in evidenza mediante la somministrazione di sostanze che, agendo sul sistema dopaminergico nigrostriatale, inducono la comparsa di un tipico comportamento rotatorio (*turning*).

La somministrazione sistemica di amfetamina, attraverso il blocco del trasportatore vescicolare delle monoamine e l'inversione del trasportatore di membrana, induce l'attivazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali presinaptici e, quindi, il rilascio di dopamina da parte di essi. La predominanza dei terminali presinaptici nel lato non lesionato determina, in risposta all'amfetamina, una rotazione ipsilaterale (ossia nella stessa direzione rispetto al lato lesionato; ad esempio: lesione nel lato destro = rotazione in senso orario).

L'apomorfina invece, un agonista misto dei recettori dopaminergici delle famiglie D1 e D2, stimola i recettori dopaminergici a livello di entrambi i lati, lesionato e non lesionato. La stimolazione dei recettori supersensitivi del lato lesionato, che si sviluppa in risposta alla



denervazione nigrostriatale, causa una rotazione controlaterale alla lesione (ossia nella direzione opposta rispetto al lato lesionato; ad esempio: lesione nel lato destro = rotazione in senso antiorario) poiché l'effetto sui recettori supersensitivi è dominante rispetto all'effetto sui recettori del lato non lesionato (Figura A).



**Figura A.** Rappresentazione schematica che mostra i fenomeni alla base del comportamento rotatorio (turning) in animali con lesione unilaterale della via nigrostriatale. In ciascuno dei due diagrammi è riportato il neostriato (Caudato-Putamen - CPu) destro e sinistro. I neuroni dopaminergici nigrostriatali che hanno origine nella *pars compacta* della Sostanza Nera (SNc) sono stati lesionati nel lato destro di ciascun cervello (a e b). In (a) l'amfetamina promuove l'attivazione presinaptica dei terminali dopaminergici intatti del CPU sinistro ma non esercita alcun effetto sul CPU destro (denervato), portando ad una attivazione preferenziale delle efferenze del neostriato nel lato sinistro, che si manifesta con una rotazione ipsilaterale verso destra (senso orario). In (b) l'apomorfina attiva i recettori dopaminergici postinaptici supersensitivi del CPU destro (denervato) anche a dosi talmente basse da non essere in grado di influenzare i recettori dopaminergici postsinaptici del CPU sinistro (intatto), portando ad una attivazione preferenziale delle efferenze del neostriato nel lato destro, che si manifesta con una rotazione controlaterale verso sinistra (senso antiorario) (*adattata da Behavioural Neuroscience, a practical approach. Vol. II, Oxford University Press, 1993*).

I modelli di lesione unilaterale del sistema dopaminergico nigrostriatale, sono ampiamente utilizzati nello studio preclinico della Malattia di Parkinson ed il comportamento rotatorio è di notevole vantaggio per lo screening degli effetti comportamentali indotti non solo da procedure lesive, ma anche da farmaci o altre manipolazioni sperimentali effettuate a livello cerebrale.

Recentemente ho avviato lo studio delle modificazioni comportamentali (attività locomotoria spontanea e *turning* in seguito a *challenge* farmacologico con amfetamina e apomorfina) e biochimiche (analisi del rilascio di dopamina in seguito a *challenge* farmacologico con amfetamina nello striato dorsale destro - ipsilaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione - e sinistro - controlaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad

iniezione) indotte dalla somministrazione unilaterale di OXY-SAP, BLANK-SAP e PBS. Sono di seguito riportati i primissimi dati ottenuti dagli studi attualmente in corso.

## **6.2. MATERIALI E METODI**

### **6.2.1. ANIMALI**

Per la realizzazione degli esperimenti sono stati impiegati ratti maschi Sprague Dawley (250-300 g all'inizio degli esperimenti) acquistati dalla Harlan Nossan (Correzzana, Italia).

Gli animali sono stati stabulati in numero di 4 per gabbia (38 x 60 x 20 cm) e, prima degli esperimenti, sono stati sottoposti ad un periodo di abituazione di 10 giorni, presso lo stabulario del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Cagliari, in condizioni ambientali controllate (temperatura: 24 °C; umidità relativa: 60%; cicli luce/buio di 12 ore, con illuminazione dalle ore 8:00 alle ore 20:00) e acqua e cibo *ad libitum*.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti tra le ore 10:00 e le ore 14:00, secondo quanto indicato dalla Direttiva della Comunità Europea del 22 Settembre 2010 (2010/63/EU) e dalla Legislazione Italiana (D.L. 4 Marzo, 2014, n. 26), dopo approvazione da parte del Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università degli Studi di Cagliari.

### **6.2.2. FARMACI E PEPTIDI**

L'apomorfina HCl e l'amfetamina sono state acquistate dalla Sigma Aldrich (S. Louis, MO, USA). I coniugati Ossitocina-Saporina (OXY-SAP) e Bianco-Saporina (BLANK-SAP) sono stati acquistati dalla Advanced Targeting System (Bemmel, The Netherlands). Tutti gli altri reagenti sono stati ottenuti da fonti disponibili in commercio.

### **6.2.3. INIEZIONE MONOLATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA**

Gli animali, dopo essere stati anestetizzati con isoflurano (1.5-2%, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), sono stati sottoposti mediante chirurgia stereotassica (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) all'iniezione monolaterale, in modo randomizzato, di un volume di 0.3 µL di Ossitocina Saporina (OXY-SAP 60 o 120 ng/µL), Bianco-Saporina (BLANK-SAP 60 o 120 ng/µL) disciolte in tampone fosfato salino (PBS, pH 7.4) o veicolo (PBS).

Le soluzioni sono state iniettate monolateralmente nella Sostanza Nera (coordinate: 5.3 mm posteriore e 2.0 mm laterale rispetto al bregma e 8.0 mm ventrale alla dura madre) (Paxinos and Watson, 2007), mediante una siringa Hamilton con ago di diametro 28 G, nell'arco di 3 minuti (100 nL/min). Al termine dell'iniezione l'ago è stato lasciato nel sito di iniezione per 2 minuti, in modo da favorire la diffusione ottimale delle soluzioni iniettate.

Dopo l'iniezione di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS gli animali sono stati monitorati quotidianamente per valutarne le condizioni generali di salute (alimentazione, idratazione, distress, etc.).

#### **6.2.4. ATTIVITÀ LOCOMOTORIA**

Lo studio dell'attività locomotoria spontanea nei gruppi di animali sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS è stato eseguito come già descritto per gli animali sottoposti ad iniezione bilaterale.

In breve, prima dell'inizio degli esperimenti, gli animali sono stati manipolati quotidianamente per almeno una settimana, in modo da ridurre lo stress associato alla manipolazione durante ciascuna sessione di test. Al termine di questo periodo, ciascun animale è andato incontro ad una sessione di abituação, della durata di 2 ore, all'interno dell'apparato impiegato per la misurazione dell'attività locomotoria (Digiscan Animal Activity Analyzer, Omnitec Electronics, Columbus, Ohio). Tale sessione aveva lo scopo di eliminare l'influenza degli effetti indotti dalla novelty (esposizione per la prima volta ad una situazione/ambiente nuovo) della procedura sperimentale e dell'apparato impiegato nelle sessioni di test. Al momento dell'esperimento gli animali sono stati spostati dalla gabbia di stabulazione all'apparato sperimentale e l'attività locomotoria è stata registrata ad intervalli consecutivi di 5 minuti per un totale di 30 minuti.

La valutazione dell'attività locomotoria spontanea è stata eseguita prima, 14 e 28 giorni dopo l'iniezione di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS nella Sostanza Nera.

#### **6.2.5. TURNING**

Il giorno dopo l'ultima sessione di valutazione dell'attività locomotoria spontanea, gli animali sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS sono stati trasferiti dalla stanza di stabulazione alla stanza contenente gli apparati per lo studio dell'attività locomotoria.

Cinque minuti dopo il trasferimento, gli animali sono stati trattati con apomorfina HCl (0.05 mg/kg s.c.) o amfetamina (5 mg/kg i.p.) o soluzione fisiologica (1 ml/kg s.c. o 3 ml/kg i.p., random) e posizionati all'interno di gabbie in Plexiglas di forma emisferica e diametro di 60 cm. Ciascuna sessione di test è stata registrata con l'ausilio di telecamere posizionate perpendicolarmente al centro delle emisfere e, successivamente, i video sono stati analizzati da un osservatore che non era a conoscenza dell'agente iniettato (OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS) o del trattamento somministrato (apomorfina, amfetamina o soluzione fisiologica).

Le sessioni di test, della durata complessiva di 30 minuti, sono state suddivise in 6 frazioni consecutive da 5 minuti ciascuna, per ciascuna delle quali è stato registrato il numero di giri, in senso orario ed antiorario, eseguiti da ciascun animale. Un giro è stato definito come movimento circolare unitario senza interruzioni a 360°. Ogni ratto è stato sottoposto a tutti i trattamenti eseguiti (apomorfina, amfetamina o soluzione fisiologica) in sequenza controbilanciata ad un giorno di distanza l'uno dall'altro.

**6.2.6. DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI DOPAMINA NEL DIALIZZATO  
OTTENUTO BILATERALMENTE DALLO STRIATO DORSALE DI RATTI SOTTOPOSTI  
AD INIEZIONE CON OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS**

Il giorno dopo l'ultimo trattamento con apomorfina, amfetamina o soluzione fisiologica gli animali sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS, sotto anestesia con isoflurano (1.5-2%, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), sono stati posizionati in un apparato stereotassico (Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA) e attraverso l'utilizzo di una doppia torre sono stati impiantati bilateralmente con delle cannule da microdialisi (finestra attiva di dialisi: 2 mm circa) dirette allo striato dorsale (coordinate: 0.5 mm anteriore e 3.0 mm laterale rispetto al bregma e 5.0 mm ventrale alla dura madre) (Paxinos and Watson, 2007).

Ciascuna delle due cannule da microdialisi è stata collegata attraverso un tubicino di polietilene ad una siringa Hamilton contenente una soluzione Ringer (147mM di NaCl, 3mM di KCl e 1,2mM di CaCl<sub>2</sub>, pH 6.5), guidata, ad un flusso costante di 3 µL/min, da una pompa da microinfusione CMA/100 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). All'altra estremità della cannula da microdialisi era possibile raccogliere, attraverso l'utilizzo di opportuni loops di raccolta in polietilene, il dializzato ottenuto dallo striato dorsale destro (ipsilaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione) e sinistro (controlaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione).

Dopo un periodo di adattamento della durata di 1 h, necessario per il raggiungimento di una condizione di equilibrio tra fluido extracellulare e perfusato, sono state raccolte 3 aliquote di dializzato da 30 µL ciascuna, una ogni 10 minuti, per la determinazione delle concentrazioni basali medie di dopamina. Gli animali sono stati quindi trattati con amfetamina (5 mg/kg i.p.) e, dopo il trattamento, sono state raccolte altre 6 aliquote di dializzato da 30 µL ciascuna, una ogni 10 minuti. Le aliquote di dializzato sono state subito congelate a -80° e conservate a tale temperatura fino al momento dell'analisi per la determinazione del contenuto di dopamina.

Le analisi per la determinazione del contenuto di dopamina sono state eseguite su aliquote di dializzato da 20 µL ciascuna mediante Cromatografia Liquida ad Alta Pressione (HPLC, Shimadzu, Giappone) con fase mobile: 0.06 M citrato/acetato pH 4.2, contenente metanolo 20% v/v, 0.1 mM EDTA, 1 µM trietilamina, 0.03 mM sodio dodecil solfato, flusso 0.8 mL/min, su colonna C18 (7.5x4.5, Supelco), accoppiata a rilevazione elettrochimica (ECD, ESA, Coulochem, USA) con potenziali settati a +350 mV e -180 mV. La sensibilità del metodo è di 0.5 pg di dopamina in 20 µL di dializzato.

Al termine degli esperimenti di microdialisi sono state eseguite le stesse procedure già descritte in precedenza per i ratti trattati bilateralmente (perfusione transcardiaca in anestesia totale e prelievo dell'encefalo per lo studio immunostochimico della Sostanza

Nera e per la verifica istologica, mediante colorazione con Rosso Neutro, dell'esatto posizionamento delle cannule da microdialisi nello striato dorsale destro (ipsilaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione) e sinistro (controlaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione).

Anche in questo caso, sono stati inclusi nell'analisi dei dati solo gli animali nei quali l'estremità dell'ago della siringa era posizionata correttamente nella Sostanza Nera e la finestra attiva di dialisi di entrambe le cannule era posizionata correttamente nello striato dorsale destro (ipsilaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione) e sinistro (controlaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione).

### **6.2.7. STATISTICA**

I dati relativi all'attività locomotoria orizzontale e verticale (valori totali ottenuti nei 30 minuti di test) sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie considerando come fattore *between-subjects* il "tipo di lesione" e come fattore *within-subjects* il "tempo dalla lesione".

I dati degli esperimenti di turning sono stati analizzati considerando la risposta al trattamento (apomorfina, amfetamina o soluzione fisiologica) nei gruppi sottoposti ad iniezione di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS mediante ANOVA a due vie, considerando come fattore *between-subjects* il "tipo di lesione" e come fattore *within-subjects* il "verso di rotazione". Inoltre, al fine di ottenere informazioni più dettagliate sulle differenze messe in evidenza dall'analisi delle rotazioni totali, negli animali sottoposti ad iniezione di OXY-SAP, un'ulteriore analisi sugli effetti indotti dall'amfetamina o dall'apomorfina, è stata eseguita sui dati relativi ai 6 intervalli consecutivi da 5 minuti mediante ANOVA a due vie considerando come fattori *within-subjects* il "verso di rotazione" e il "tempo".

I dati degli esperimenti di microdialisi sono stati prima trasformati in AUC (Area Under the Curve - area sotto la curva) attraverso l'uso della classica formula trapezoidale con le concentrazioni di dopamina nelle aliquote di dializzato in funzione del tempo ed analizzati con ANOVA a due vie con fattore *between-subjects* il "tipo di lesione" e fattore *within-subjects* "lato ipsilaterale/controlaterale". Inoltre, al fine di ottenere informazioni più dettagliate sulle differenze messe in evidenza dall'analisi delle AUC, sui gruppi di animali sottoposti ad iniezione di OXY-SAP, sono state eseguite anche delle analisi sulle frazioni di dializzato riferite ai singoli intervalli di raccolta mediante ANOVA a due vie con fattori *within-subjects* il "lato ipsilaterale/controlaterale" e il "tempo". Infine, una ANOVA a due vie è stata eseguita per verificare eventuali differenze nei valori basali (cioè quelli ottenuti prima della somministrazione dell'amfetamina) delle concentrazioni di dopamina nel dializzato proveniente dagli striati dorsali destro (ipsilaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione) e sinistro (controlaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione) (fattore *within-subjects*) dei ratti dei diversi gruppi "tipo di lesione" (fattore *between-subjects*).

Nel caso in cui l'ANOVA abbia rilevato effetti significativi dei fattori principali o di interazione fra gli stessi, sono state eseguite delle comparazioni *post hoc* per gruppi appaiati utilizzando il test di Bonferroni al fine di rilevare le singole fonti di significatività. In considerazione della bassa numerosità dei gruppi sperimentali ( $n = 3$  ratti per gruppo), anche quando le analisi eseguite con ANOVA non hanno dato esito positivo, sono stati eseguiti dei confronti diretti su specifici set di dati attraverso l'utilizzo del test t, come indicato nei risultati ed in didascalia.

Le differenze rilevate sono state considerate significative per valori di  $P < 0.05$ .

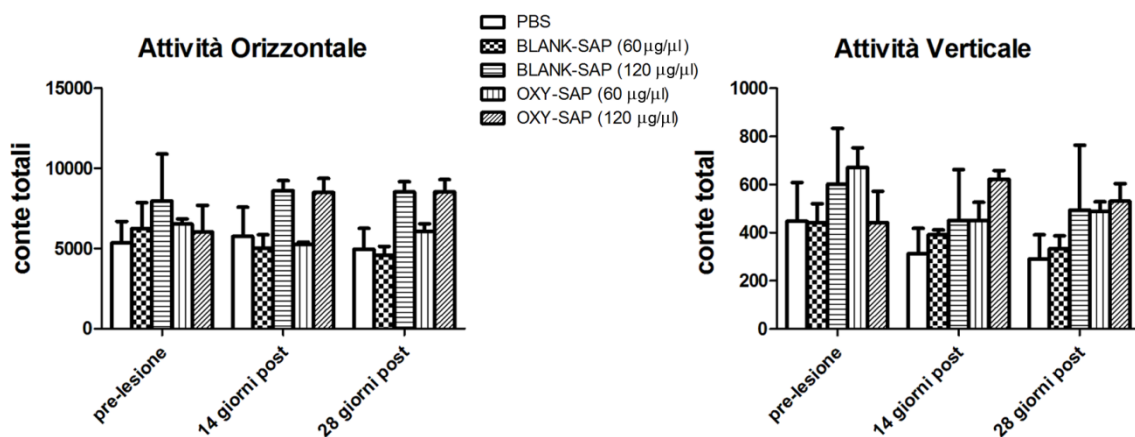
Per le analisi statistiche sono stati impiegati GraphPad (GraphPad versione 5.00 per Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) e Statistica (Statistica, v. 12, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA; 2012, <http://www.statsoft.com>).

## 6.3. RISULTATI

### 6.3.1. EFFETTO DELL'INEZIONE MONOLATERALE DI OSSITOCINA-SAPORINA NELLA SOSTANZA NERA SULL'ATTIVITÀ LOCOMOTORIA: CONFRONTO CON L'EFFETTO INDOTTO DAL BIANCO-SAPORINA E DALLA PBS

Come mostrato in Figura B, ratti maschi Sprague Dawley, sottoposti a iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP (60 o 120 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L) non mostrano, sia 14 sia 28 giorni dopo l'iniezione, variazioni significative dell'attività locomotoria orizzontale quando comparati con i corrispondenti valori pre-lesione e con i ratti sottoposti a iniezione monolaterale di BLANK-SAP (60 o 120 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L) o PBS (0,3  $\mu$ L) [ANOVA a due vie, attività orizzontale, tipo di lesione,  $F(4,16)=1.55$ ,  $P>0.05$ , tempo dalla lesione,  $F(2,16)=0.10$ ,  $P>0.05$ , TIPO DI LESIONE X TEMPO DALLA LESIONE,  $F(8,16)=1.90$ ,  $P>0.05$ ].

A differenza di quanto osservato per l'attività orizzontale, per quanto riguarda l'attività verticale, è stata osservata una differenza significativa nel fattore tempo [ANOVA a due vie, attività verticale, tipo di lesione,  $F(4,16)=0.68$ ,  $P>0.05$ , tempo dalla lesione,  $F(2,16)=3.70$ ,  $P<0.05$ , TIPO DI LESIONE X TEMPO DALLA LESIONE,  $F(8,16)=2.27$ ,  $P>0.05$ ].



**Figura B.** Attività locomotoria spontanea in ratti sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di Ossitocina-Saporina (OXY-SAP), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) o tampone fosfato salino (PBS). Prima, 14 e 28 giorni dopo l'iniezione monolaterale di OXY-SAP (60 o 120 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L), BLANK-SAP (60 o 120 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L) o PBS (0,3  $\mu$ L) i ratti sono stati spostati in gabbie munite di fotocellule e l'attività locomotoria spontanea è stata registrata ad intervalli consecutivi di 5 minuti, per un totale di 30 minuti. I dati riportati rappresentano il totale delle conte dell'attività orizzontale e verticale nell'arco dei 30 minuti di durata del test. Media  $\pm$  SEM di 3 ratti per gruppo.

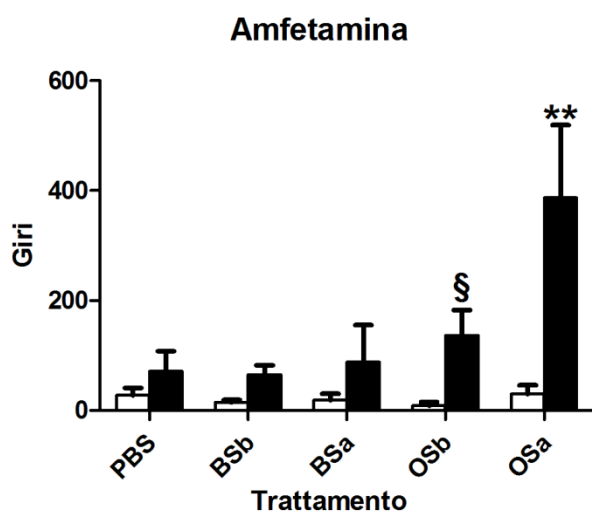
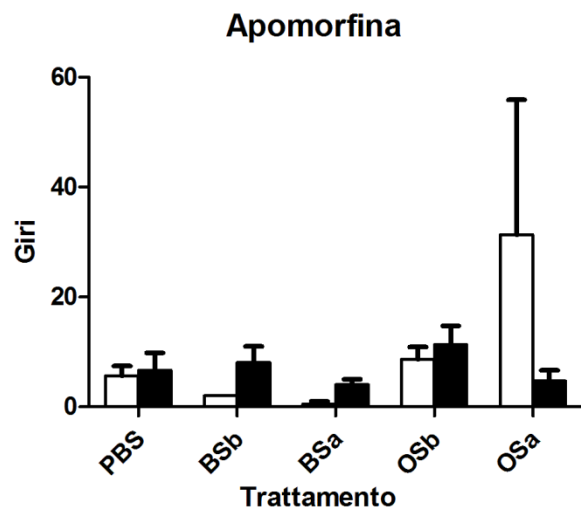
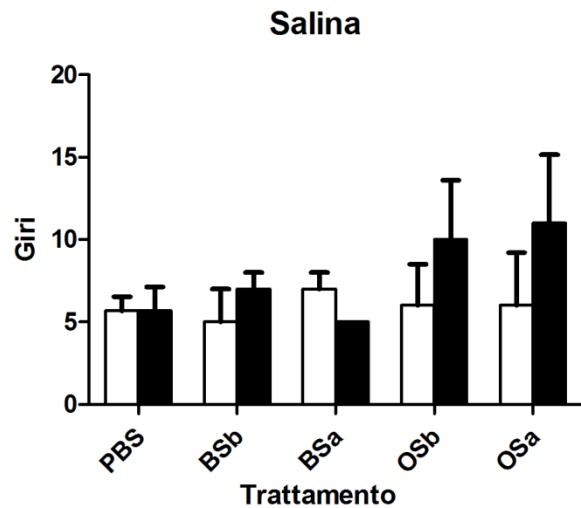


**6.3.2. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE SISTEMICA DI APOMORFINA O AMFETAMINA SUL TURNING IN RATTI INIETTATI CON OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA**

Come mostrato in Figura C e D, 28 giorni dopo l'iniezione di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS, nel test del *turning* gli animali non mostrano, in seguito a trattamento con salina (1 ml/kg s.c., o 3 ml/kg i.p., random) o apomorfina (0.05 mg/kg s.c.), un'attività rotatoria preferenziale ipsilaterale o controlaterale, sebbene siano state rilevate differenze significative relate al tipo di lesione in seguito al trattamento con salina [ANOVA a due vie, salina, tipo di lesione,  $F(4,8)=5.71$ ,  $P<0.05$ , rotazione,  $F(1,8)=0.54$ ,  $P>0.05$ , TIPO DI LESIONE X ROTAZIONE,  $F(4,8)=0.27$ ,  $P>0.05$ ] [ANOVA a due vie, apomorfina, tipo di lesione,  $F(4,8)=0.93$ ,  $P>0.05$ , rotazione,  $F(1,8)=0.16$ ,  $P>0.05$ , TIPO DI LESIONE X ROTAZIONE,  $F(4,8)=0.95$ ,  $P>0.05$ ].

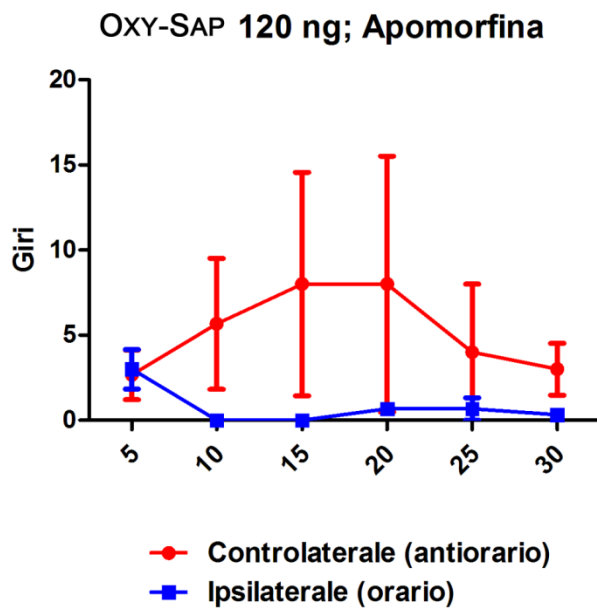
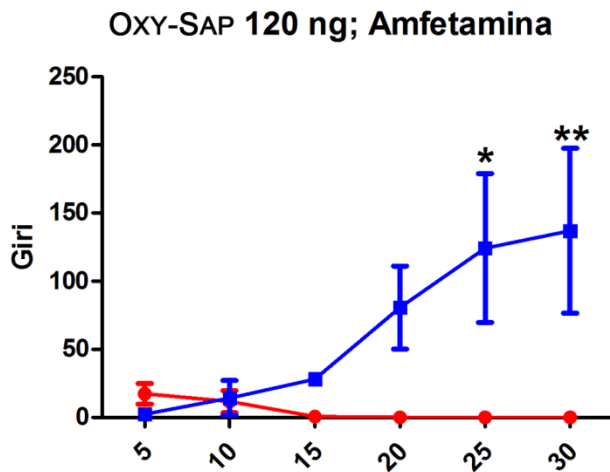
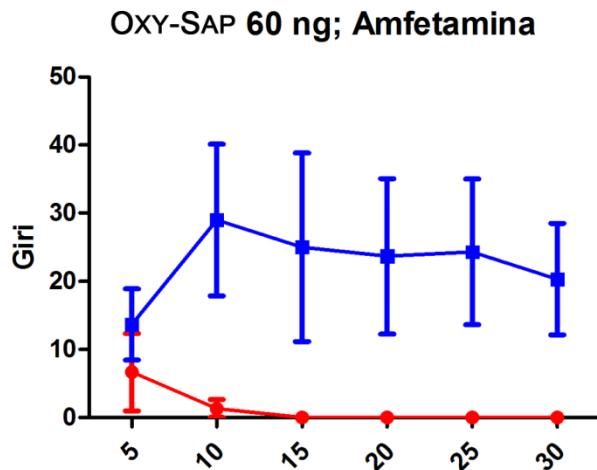
A differenza di ciò, nei ratti sottoposti ad iniezione di OXY-SAP (120 ng/ $\mu$ L) ma non di BLANK-SAP o PBS e sottoposti, 28 giorni dopo l'iniezione, al test del *turning* sono state osservate differenze significative nel numero di rotazioni ipsilaterali comparate a quelle controlaterali dopo trattamento con amfetamina (5 mg/kg i.p.) [ANOVA a due vie, tipo di lesione,  $F(4,8)=2.77$ ,  $P>0.05$ , rotazione,  $F(1,8)=14.26$ ,  $P<0.01$ , TIPO DI LESIONE X ROTAZIONE,  $F(4,8)=3.31$ ,  $P>0.05$ ]. Comunque, una differenza significativa nel numero delle rotazioni ipsilaterali comparate a quelle controlaterali è rilevabile anche nei ratti trattati con OXY-SAP 60 ng/ $\mu$ L attraverso confronto diretto con t test ( $P<0.05$ ).

Nei ratti sottoposti ad iniezione di OXY-SAP 120 ng/ $\mu$ L e trattati con amfetamina l'attività rotatoria ipsilaterale al lato della lesione (lato destro= rotazione in senso orario) inizia all'incirca a 10-15 minuti dal trattamento farmacologico e perdura per tutta la durata dell'esperimento [ANOVA a due vie, tempo,  $F(4,8)=2.79$ ,  $P<0.05$ , rotazione,  $F(1,8)=7.17$ ,  $P>0.05$ , TEMPO X ROTAZIONE,  $F(4,8)=4.17$ ,  $P<0.01$ ], mentre il picco massimo nel numero di rotazioni ipsilaterali è stato osservato nella frazione 25-30 minuti (137 rotazioni ipsilaterali contro 0 rotazioni controlaterali, Bonferroni,  $P<0.01$ ).



Controlaterale (antiorario)  
 Ipsilaterale (orario)

**Figura C.** Rotazioni ipsilaterali e controlaterali in animali sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di Ossitocina-Saporina (OXY-SAP), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) o tampone fosfato salino (PBS) e trattati con soluzione fisiologica, apomorfina o amfetamina. Ventotto giorni dopo l'iniezione monolaterale di OXY-SAP (60 o 120 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L), BLANK-SAP (60 o 120 ng/ $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L) o PBS (0,3  $\mu$ L) i ratti sono stati trattati con soluzione fisiologica (1 ml/kg s.c. o 3 ml/kg s.c., random) o apomorfina (0.05 mg/kg s.c.) o amfetamina (5 mg/kg i.p.) e spostati in gabbie di forma emisferica monitorate da telecamere (vedi Materiali e Metodi). I dati riportati rappresentano il totale delle rotazioni ipsilaterali e controlaterali nell'arco dei 30 minuti di durata del test. Media  $\pm$  SEM di 3 ratti per gruppo. \*\*P<0.01 rispetto al numero di rotazioni controlaterali al lato della lesione (ANOVA a due vie seguita da test di Bonferroni); §P<0.05 rispetto al numero di rotazioni controlaterali al lato della lesione (t test). BSb: BLANK-SAP bassa; BSa: BLANK-SAP alta; OSb: OXY-SAP bassa; OSa: OXY-SAP alta.



**Figura D.** Rotazioni ipsilaterali e controlaterali in ratti sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP e trattati con apomorfina o amfetamina: curve tempo-risposta. Le condizioni sperimentali sono quelle riportate nella didascalia di Figura C. I dati riportati rappresentano il numero delle rotazioni ipsilaterali e controlaterali in 6 frazioni consecutive da 5 minuti. Media  $\pm$  SEM di 3 ratti per gruppo. \* $P < 0.05$  e \*\* $P < 0.01$  rispetto al numero di rotazioni controlaterali al lato della lesione (ANOVA a due vie seguita da test di Bonferroni).

### **6.3.3. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE SISTEMICA DI AMFETAMINA SULLE CONCENTRAZIONI DI DOPAMINA NEL DIALIZZATO OTTENUTO BILATERALMENTE DALLO STRIATO DORSALE DI RATTI INIETTATI MONOLATERALMENTE CON OSSITOCINA-SAPORINA, BIANCO-SAPORINA O PBS NELLA SOSTANZA NERA**

In Tabella I sono riportati i livelli basali delle concentrazioni di dopamina nello striato dorsale destro (ipsilaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione) ed in quello sinistro (controlaterale alla Sostanza Nera sottoposta ad iniezione) relativi ai cinque gruppi di animali sottoposti ad iniezione, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS a 5 settimane dal trattamento. Come riportato, negli animali sottoposti ad iniezione di PBS, BLANK-SAP o OXY-SAP non sono presenti differenze significative fra il lato ipsilaterale e il lato controlaterale [ANOVA a due vie, Tipo di Lesione,  $F(4,8)=0.40$ ,  $P<0.05$ , Lato,  $F(1,8)=0.69$ ,  $P>0.05$ , TIPO DI LESIONE X LATO,  $F(4,8)=1.88$ ,  $P>0.05$ ], sebbene una tendenza alla significatività sia rilevabile nei ratti iniettati con OXY-SAP alla dose di 120 ng/ $\mu$ L ( $P=0.06$ , Bonferroni).

Come previsto, la somministrazione sistemica di amfetamina (5 mg/kg i.p.) ha indotto in tutti gli animali trattati un aumento delle concentrazioni di dopamina nel dializzato proveniente bilateralmente (lato ipsilaterale e controlaterale alla Sostanza Nera iniettata) dallo striato dorsale. Tale aumento è osservabile già 10 minuti dopo il trattamento, raggiunge i valori di picco nella frazione 20-30 minuti per poi tendere a valori basali nelle ultime due frazioni (dati non mostrati).

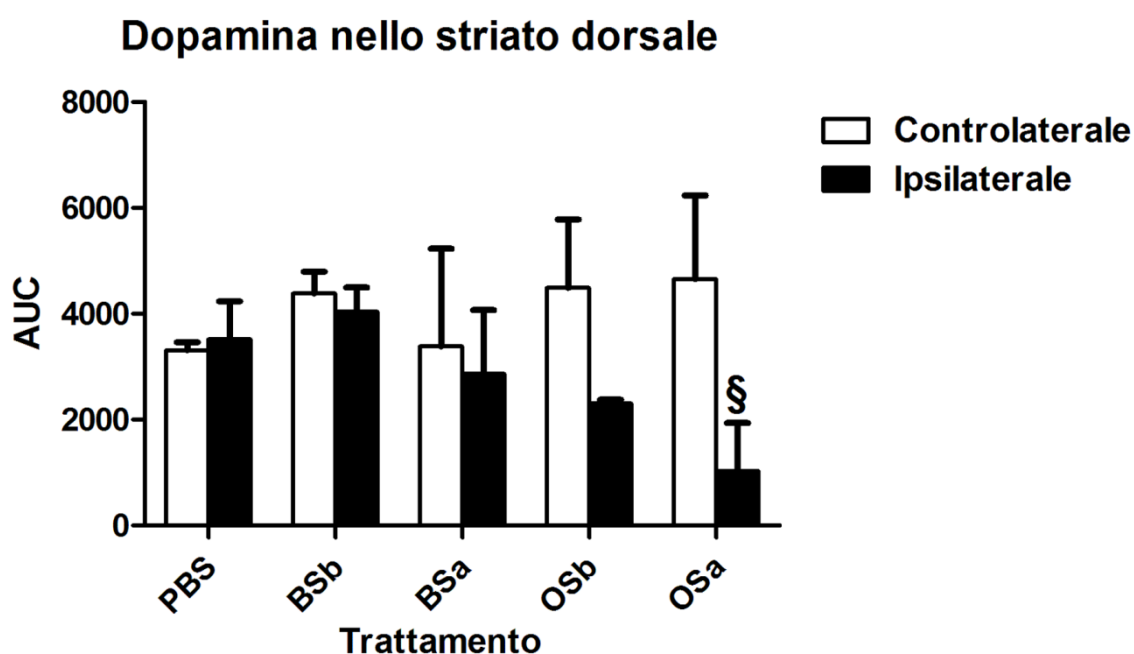
Come indicato dai valori delle AUC (calcolate sulle concentrazioni di dopamina determinate nel dializzato ottenuto bilateralmente dallo striato dorsale) riportati in Figura E e F, gli animali sottoposti a iniezione monolaterale di OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS e sottoposti, 5 settimane dopo, a *challenge* farmacologico con amfetamina (5 mg/kg i.p.), non mostrano differenze significative, tra il lato ipsilaterale e quello controlaterale, nella liberazione di dopamina nello striato dorsale indotta dal trattamento con l'amfetamina [ANOVA a due vie, Tipo di Lesione,  $F(4,8)=0.36$ ,  $P>0.05$ , Lato,  $F(1,8)=4.76$ ,  $P>0.05$ , TIPO DI LESIONE X LATO,  $F(4,8)=1.60$ ,  $P>0.05$ ]. Comunque, gli animali sottoposti ad iniezione di OXY-SAP alla dose di 120 ng/ $\mu$ L e sottoposti, 5 settimane dopo, al *challenge* farmacologico con amfetamina (5 mg/kg i.p.), dopo confronto diretto con t test, hanno mostrato differenze significative nelle AUC relative al contenuto di dopamina nello striato dorsale ipsilaterale alla Sostanza Nera iniettata con l'agente lesivo rispetto a quelli relativi alle AUC dello striato dorsale controlaterale alla Sostanza Nera iniettata (t test,  $P<0.05$ ).

Inoltre, l'analisi delle concentrazioni di dopamina nel dializzato ottenuto dallo striato dorsale ipsilaterale e controlaterale riferite alle singole frazioni di 10 minuti, ha messo in evidenza come, nei ratti trattati con OXY-SAP alla dose di 120 ng/ $\mu$ L le differenze fra lato ipsilaterale e lato controlaterale siano presenti lungo tutto il test [ANOVA a due vie, Frazione,

F(8,32)=6.45, P<0.001, Lato, F(1,32)=4.15, P>0.05, FRAZIONE X LATO, F(8,32)=2.67, P<0.05], con una differenza massima nella frazione 20-30 minuti (Bonferroni, P<0.05).

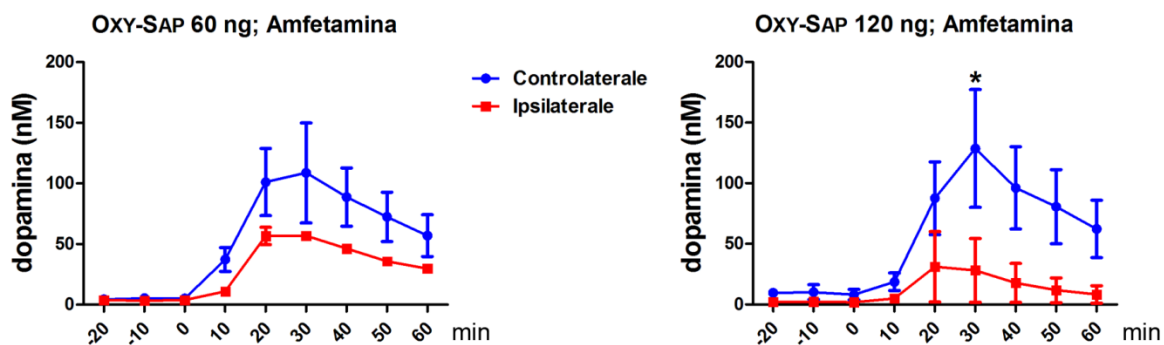
**Tabella I.** Concentrazioni basali medie (n=3 ratti per gruppo) di dopamina nel dializzato ottenuto bilateralmente, a 5 settimane dall'iniezione, dallo striato dorsale di ratti iniettati monolateralmente nella Sostanza Nera con OXY-SAP, BLANK-SAP o PBS prima del *challenge* farmacologico con amfetamina.

Tipo di iniezione	PBS	BLANK-SAP (60 ng/μL)	BLANK-SAP (120 ng/μL)	OXY-SAP (60 ng/μL)	OXY-SAP (120 ng/μL)
Lato controlaterale	4.15±0.17	2.67±0.07	3.44±2.36	4.89±0.58	9.21±4.42
Lato ipsilaterale	4.51±0.58	3.84±0.86	5.26±2.11	3.55±0.38	2.09±0.76



**Figura E.** Determinazione delle concentrazioni di dopamina nello striato dorsale ipsilaterale e controlaterale alla Sostanza Nera iniettata in ratti sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di Ossitocina-Saporina (OXY-SAP), Bianco-Saporina (BLANK-SAP) o tampone fosfato salino (PBS) e trattati con amfetamina. Cinque settimane dopo l'iniezione di OXY-SAP (60 o 120 ng/μL; 0,3 μL), BLANK-SAP (60 o 120 ng/μL; 0,3 μL) o PBS (0,3 μL) i ratti sono stati anestetizzati con isofurano, impiantati bilateralmente nello striato dorsale con delle cannule da microdialisi e, dopo la raccolta di 3 aliquote di dializzato, sono stati trattati con amfetamina (5 mg/kg i.p.). Altre 6 aliquote di dializzato sono state poi prelevate ad intervalli di 10 minuti per la determinazione delle concentrazioni di dopamina tramite HPLC-ECD (vedi Materiali e Metodi). I dati riportati rappresentano le AUC calcolate sulle concentrazioni di dopamina ottenute nell'arco di tutto il test (aliquote prima e dopo il trattamento) dagli striati dorsali ipsilaterali e controlaterali al lato di iniezione nella Sostanza Nera. Media ± SEM di 3 ratti per gruppo. §P<0.05 rispetto al lato contro laterale al sito di iniezione (t test).

BSb: BLANK-SAP bassa; BSa: BLANK-SAP alta; OSb: OXY-SAP bassa; OSa: OXY-SAP alta.



**Figura F.** Concentrazioni di dopamina nello striato dorsale, ipsilaterale e controlaterale alla Sostanza Nera iniettata, in ratti sottoposti ad iniezione monolaterale, nella Sostanza Nera, di Ossitocina-Saporina (OXY-SAP), e trattati con amfetamina a 5 settimane dall'iniezione: curve tempo-risposta. Le condizioni sperimentali sono quelle riportate nella didascalia di Figura E. I dati riportati rappresentano le concentrazioni di dopamina ottenute ad intervalli di 10 minuti dagli striati dorsali ipsilaterali e controlaterali alla Sostanza Nera iniettata con l'OXY-SAP. Media  $\pm$  SEM di 3 ratti per gruppo. \* $P < 0.05$  rispetto al lato contro laterale al sito di iniezione (ANOVA a due vie seguita da test di Bonferroni).

## 6.4. DISCUSSIONE

In accordo con quanto riportato nel modello di iniezione bilaterale, l'iniezione unilaterale, nella Sostanza Nera, di OXY-SAP determina la distruzione dei neuroni dopaminergici nigrali, come supportato dai dati relativi al rilascio striatale di dopamina, ottenuti mediante la dialisi.

Sebbene, a causa del ridotto numero di animali impiegati, non siano osservabili differenze significative nel rilascio basale di dopamina a livello striatale, non è possibile escluderne l'esistenza, come è intuibile osservando la differenza nel rilascio basale di dopamina tra lo striato iniettato e quello intatto, negli animali sottoposti ad iniezione monolaterale di OXY-SAP alla dose di 120 ng/μL. Osservando i dati ottenuti al test del turning, è inoltre possibile notare che, anche in seguito al solo trattamento con soluzione fisiologica, negli animali sottoposti ad iniezione monolaterale di OXY-SAP (60 ng/μL e 120 ng/μL) ma non in quelli sottoposti ad iniezione monolaterale di PBS, si osserva una tendenza alla rotazione ipsilaterale, indicativa di uno squilibrio del sistema dopaminergico a livello striatale.

Ad ulteriore sostegno dell'ipotesi di un danno a carico dei neuroni dopaminergici, inoltre, la somministrazione sistemica di amfetamina mette in evidenza che, negli animali sottoposti ad iniezione monolaterale di OXY-SAP alla dose di 120 ng/μL, si ha una significativa riduzione del rilascio di dopamina nello striato ipsilaterale alla Sostanza Nera iniettata rispetto a quello controlaterale alla Sostanza Nera iniettata mentre, negli animali sottoposti ad iniezione monolaterale di OXY-SAP alla dose di 60 ng/μL si osserva una buona tendenza alla significatività. In accordo con questo, i dati relativi al turning dimostrano che, in seguito alla somministrazione sistemica di amfetamina, negli animali sottoposti ad iniezione unilaterale di OXY-SAP alla dose di 120 ng/μL, ma non di BLANK-SAP o PBS, si osserva un significativo incremento delle rotazioni ipsilaterali. Tale effetto è riscontrabile, e significativo, anche alla dose di 60 ng/μL, come messo in evidenza dal t test. La somministrazione sistemica di apomorfina non ha invece indotto la comparsa di rotazioni controlaterali, ad eccezione di un singolo animale appartenente al gruppo sottoposto ad iniezione di OXY-SAP alla dose di 120 ng/μL.

A tal proposito è importante ricordare che, in ratti sottoposti a lesione unilaterale con 6-OHDA a carico dei neuroni dopaminergici della *pars compacta* della Sostanza Nera, l'apomorfina induce rotazioni ipsilaterali quando si ha una deplezione della dopamina striatale di circa il 50% (Hefti et al., 1980) mentre l'apomorfina induce rotazioni controlaterali solo quando la perdita di neuroni dopaminergici a livello della *pars compacta* della Sostanza Nera è pari a circa il 90% (Creese and Snyder, 1979; Creese et al., 1977; Hu et al., 1990; Ungerstedt, 1971; Hefti et al., 1980; Heikkila et al., 1981).

In base a quanto appena riportato è possibile ipotizzare che, alle dosi impiegate in questo studio, l'OXY-SAP sia in grado di determinare una distruzione dei neuroni dopaminergici nigrali di entità sufficiente all'induzione di uno squilibrio dell'attività dopaminergica tra i due lati, denervato e non denervato, dello striato (come evidenziabile in seguito a somministrazione di amfetamina) ma non tale da indurre la supersensibilità dei recettori postinaptici striatali (come dimostrato dall'assenza di risposta in seguito alla somministrazione di apomorfina). È probabile invece che nel singolo animale che ha risposto positivamente al *challenge* con apomorfina sia stata indotta una lesione di entità tale da determinare la supersensibilità dei recettori postinaptici.

Gli studi di immunostochimica relativi alle modificazioni dell'immunoreattività per la Tirosina Idrossilasi saranno d'aiuto nel correlare l'entità della lesione indotta alla risposta comportamentale osservata nel test del turning.

I dati relativi all'attività locomotoria mettono in evidenza che, negli animali sottoposti ad iniezione unilaterale di OXY-SAP alle dosi di 60 ng/μL e 120 ng/μL, non si osserva alcuna modificazione dell'attività locomotoria orizzontale a differenza di quanto osservato negli animali sottoposti ad iniezione bilaterale di OXY-SAP alla dose di 60 ng/μL, nei quali era invece osservabile un aumento pari a circa il 50% dell'attività locomotoria orizzontale rispetto agli animali trattati con BLANK-SAP o con PBS.

Per quanto riguarda l'attività locomotoria verticale negli animali sottoposti ad iniezione monolaterale di PBS e di BLANK-SAP alla dose di 60 ng/μL, si riscontra una tendenza alla riduzione dell'attività locomotoria verticale rispetto ai valori pre-lesione non osservabile negli animali sottoposti ad iniezione monolaterale di OXY-SAP (60 ng/μL e 120 ng/μL) e BLANK-SAP (120 ng/μL). Un simile effetto è stato osservato anche negli animali sottoposti ad iniezione bilaterale.

*Bonatz e collaboratori* (1987) hanno osservato che in animali sottoposti ad iniezione unilaterale, nella Sostanza Nera, di 6-OHDA (4 μg/1μl), a 7 giorni dall'iniezione si osserva una riduzione dell'attività locomotoria di circa il 25% rispetto ai valori pre-lesione mentre *Sakai e Gash* (1994) hanno riportato che in animali sottoposti ad iniezione bilaterale, nella Sostanza Nera, di 6-OHDA l'attività locomotoria spontanea non subisce modificazioni fintanto che la perdita dei neuroni dopaminergici della *pars compacta* della Sostanza Nera non eccede, da ambo i lati, l'80%. In particolare, in corrispondenza di una simile ed estesa perdita neuronale (>80%) si registra una significativa riduzione dell'attività locomotoria orizzontale e verticale.

La mancata alterazione dei valori di attività locomotoria riscontrata negli animali sottoposti ad iniezione monolaterale con OXY-SAP potrebbe essere correlabile, come nel caso dell'iniezione bilaterale, al fatto che il sistema dopaminergico nigrale non è l'unico ad essere interessato dall'azione lesiva dell'OXY-SAP. Gli studi di immunostochimica relativi



all'espressione delle tre isoforme dei trasportatori vescicolari del glutammato (VGluT1, VGluT2 e VGluT3) saranno d'aiuto nel fornire un eventuale conferma per tale ipotesi.

In conclusione, i dati preliminari sino ad ora ottenuti sul modello di somministrazione monolaterale sembrano confermare l'azione lesiva dell'OXY-SAP a livello del sistema dopaminergico nigrostriatale già osservata nel caso della somministrazione bilaterale. Ulteriori studi saranno necessari per verificare l'effetto indotto da questo agente sui sistemi neurotrasmettitoriali nigrali GABAergico e glutammatergico.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

- Adan RA, Van Leeuwen FW, Sonnemans MA, Brouns M, Hoffman G, Verbalis JG, Burbach JP. Rat oxytocin receptor in brain, pituitary, mammary gland, and uterus: partial sequence and immunocytochemical localization. *Endocrinology*. 1995 Sep;136(9):4022-8.
- Afifi AK, Bahuth NB, Kaelber WW, Mikhael E, Nassar S. The cortico-nigral fibre tract. An experimental Fink-Heimer study in cats. *J Anat*. 1974 Dec;118(Pt 3):469-76.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 1989 Oct;12(10):366-75.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res*. 1990;85:119-46.
- Alfahel-Kakunda A, Silverman WF. Calcium-binding proteins in the substantia nigra and ventral tegmental area during development: correlation with dopaminergic compartmentalization. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997 Oct 20;103(1):9-20.
- Alizadeh AM, Faghihi M, Khorri V, Sohanaki H, Pourkhalili K, Mohammadghasemi F, Mohsenikia M. Oxytocin protects cardiomyocytes from apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat heart: role of mitochondrial ATP-dependent potassium channel and permeability transition pore. *Peptides*. 2012 Jul;36(1):71-7.
- Amalric M, Koob GF. Functionally selective neurochemical afferents and efferents of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine system. *Prog Brain Res*. 1993;99:209-26.
- Appell PP, Behan M. Sources of subcortical GABAergic projections to the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol*. 1990 Dec 1;302(1):143-58.
- Argiolas A, Melis MR, Stancampiano R, Mauri A, Gessa GL. Hypothalamic modulation of immunoreactive oxytocin in the rat thymus. *Peptides*. 1990 May-Jun;11(3):539-43.
- Argiolas A, Gessa GL. Central functions of oxytocin. *Neurosci Biobehav Rev*. 1991 Summer;15(2):217-31.
- Argiolas A, Melis MR. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol Behav*. 2004 Nov 15;83(2):309-17.
- Argiolas A, Melis MR. Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog Neurobiol*. 2005 May;76(1):1-21.
- Argiolas A, Melis MR. Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present: a review. *Prog Neurobiol*. 2013 Sep;108:80-107.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*. 1992 Aug;15(8):303-8.
- Bakos J, Strbak V, Ratulovska N, Bacova Z. Effect of oxytocin on neuroblastoma cell viability and growth. *Cell Mol Neurobiol*. 2012 Jul;32(5):891-6.
- Bankowski K, Manning M, Seto J, Haldar J, Sawyer WH. Design and synthesis of potent in vivo antagonists of oxytocin. *Int J Pept Protein Res*. 1980 Nov;16(5):382-91.
- Baskerville TA, Douglas AJ. Interactions between dopamine and oxytocin in the control of sexual behaviour. *Prog Brain Res*. 2008;170:277-90.
- Baskerville TA, Allard J, Wayman C, Douglas AJ. Dopamine-oxytocin interactions in penile erection. *Eur J Neurosci*. 2009 Dec 3;30(11):2151-64.

- Baskerville TA, Douglas AJ. Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neurosci Ther.* 2010 Jun;16(3):e92-123.
- Baskin DG, Kim F, Gelling RW, Russell BJ, Schwartz MW, Morton GJ, Simhan HN, Moralejo DH, Blevins JE. A new oxytocin-saporin cytotoxin for lesioning oxytocin-receptive neurons in the rat hindbrain. *Endocrinology.* 2010 Sep;151(9):4207-13.
- Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res.* 1983 Oct;287(2):173-96.
- Bentivoglio, M. and Morelli, M. (2005) The organisation and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy. (Dopamine)* (Vol. 21) (Dunnett, S.B., Bentivoglio, M., Björklund, A. and Hökfelt, T., eds) pp. 1–107, Elsevier
- Berendse HW, Groenewegen HJ, Lohman AH. Compartmental distribution of ventral striatal neurons projecting to the mesencephalon in the rat. *J Neurosci.* 1992 Jun;12(6):2079-103.
- Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007 May;30(5):194-202.
- Blair RJ. Facial expressions, their communicatory functions and neuro-cognitive substrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Mar 29;358(1431):561-72.
- Bohus B, Kovács GL, de Wied D. Oxytocin, vasopressin and memory: opposite effects on consolidation and retrieval processes. *Brain Res.* 1978 Nov 24;157(2):414-7.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat.* 2000 May;196 ( Pt 4):527-42.
- Bonatz AE, Steiner H, Huston JP. Video image analysis of behavior by microcomputer: categorization of turning and locomotion after 6-OHDA injection into the substantia nigra. *J Neurosci Methods.* 1987 Nov;22(1):13-26.
- Brown P. Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003 Apr;18(4):357-63.
- Brown P. Bad oscillations in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006;(70):27-30.
- Buijs RM. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 1978 Sep 26;192(3):423-35.
- Buijs RM, Devries GJ, and Van Leeuwen FW. The distribution and synaptic release of oxytocin in the central nervous system. In: *Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies*, edited by Amico JA and Robinson AG. Amsterdam: Excerpta Med, 1985, p. 77–86.
- Bunney BS, Aghajanian GK. The precise localization of nigral afferents in the rat as determined by a retrograde tracing technique. *Brain Res.* 1976 Dec 3;117(3):423-35.
- Carli M, Prontera C, Samanin R. Effect of 5-HT1A agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology.* 1989 May;28(5):471-6.
- Carlsson A. Treatment of Parkinson's with L-DOPA. The early discovery phase, and a comment on current problems. *J Neural Transm (Vienna).* 2002 May;109(5-6):777-87.

- Carson DS, Cornish JL, Guastella AJ, Hunt GE, McGregor IS. Oxytocin decreases methamphetamine self-administration, methamphetamine hyperactivity, and relapse to methamphetamine-seeking behaviour in rats. *Neuropharmacology*. 2010 Jan;58(1):38-43.
- Carter CJ. Glutamatergic pathways from the medial pre-frontal cortex to the anterior striatum, nucleus accumbens and substantia nigra. *Br J Pharmacol* 1980;70:50–51.
- Ceanga M, Spataru A, Zagrean AM. Oxytocin is neuroprotective against oxygen-glucose deprivation and reoxygenation in immature hippocampal cultures. *Neurosci Lett*. 2010 Jun 14;477(1):15-8.
- Chang HT, Kita H, Kitai ST. The ultrastructural morphology of the subthalamic-nigral axon terminals intracellularly labeled with horseradish peroxidase. *Brain Res*. 1984 May 7;299(1):182-5.
- Cocco C, Melis GV, Ferri GL. Embedding media for cryomicrotomy: an applicative reappraisal. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003 Sep;11(3):274-80.
- Costall B, Naylor RJ, Olley JE. On the involvement of the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra with neuroleptic and cholinergic modification of locomotor activity. *Neuropharmacology*. 1972 May;11(3):317-30.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*. 1977 Aug 5;197(4303):596-8.
- Creese I, Snyder SH. Nigrostriatal lesions enhance striatal 3H-apomorphine and 3H-spiroperidol binding. *Eur J Pharmacol*. 1979 Jun 15;56(3):277-81.
- Crine AF, Boulanger B, Nizet G. Effect of daily pretrial injection of oxytocin on rat behavior in the open-field situation. *Regul Pept*. 1983 Jan;5(2):145-52.
- Cushing BS, Martin JO, Young LJ, Carter CS. The effects of peptides on partner preference formation are predicted by habitat in prairie voles. *Horm Behav*. 2001 Feb;39(1):48-58.
- Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1964:SUPPL 232:1-55.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain*. 1999a Aug;122 ( Pt 8):1421-36.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*. 1999b Aug;122 ( Pt 8):1437-48.
- Delanoy RL, Dunn AJ, Tintner R. Behavioral responses to intracerebroventricularly administered neurohypophyseal peptides in mice. *Horm Behav*. 1978 Dec;11(3):348-62.
- DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 1990 Jul;13(7):281-5.
- DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol*. 2007 Jan;64(1):20-4.
- Denny-Brown D, Yanagisawa N. The role of the basal ganglia in the initiation of movement. In: *The Basal Ganglia*, Ed. M. Yahr. Raven Press, New York; 1976.

- du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem.* 1953 Dec;205(2):949-57.
- Dumais KM, Bredewold R, Mayer TE, Veenema AH. Sex differences in oxytocin receptor binding in forebrain regions: correlations with social interest in brain region- and sex- specific ways. *Horm Behav.* 2013 Sep;64(4):693-701.
- Erbaş O, Oltulu F, Taşkiran D. Amelioration of rotenone-induced dopaminergic cell death in the striatum by oxytocin treatment. *Peptides.* 2012 Dec;38(2):312-7.
- Erbas O, Oltulu F, Taskiran D. Suppression of exaggerated neuronal oscillations by oxytocin in a rat model of Parkinson's disease. *Gen Physiol Biophys.* 2013 Dec;32(4):517-25.
- Evarts EV, Teräväinen H, Calne DB. Reaction time in Parkinson's disease. *Brain.* 1981;104:167-86.
- Fallon, J.H. and Loughlin, S.E. (1995) Substantia Nigra. In *The Rat Nervous System* (2nd edn) (Paxinos, G., ed.), pp. 215–237, Academic Press.
- Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci.* 2001 Oct 15;21(20):8278-85.
- Ficalora AS, Mize RR. The neurons of the substantia nigra and zona incerta which project to the cat superior colliculus are GABA immunoreactive: a double-label study using GABA immunocytochemistry and lectin retrograde transport. *Neuroscience.* 1989;29(3):567-81.
- Fink JS, Smith GP. Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Res.* 1980 Oct 20;199(2):359-84.
- Flaherty AW, Graybiel AM. Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J Neurophysiol.* 1991 Oct;66(4):1249-63.
- Flowers KA. Visual "closed-loop" and "open-loop" characteristics of voluntary movement in patients with Parkinsonism and intention tremor. *Brain.* 1976 Jun;99(2):269-310.
- Fortin M, Parent A. Calretinin as a marker of specific neuronal subsets in primate substantia nigra and subthalamic nucleus. *Brain Res.* 1996 Feb 5;708(1-2):201-4.
- Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME, Klein MJ. Oxytocin receptors on oxytocin neurones: histoautoradiographic detection in the lactating rat. *J Physiol.* 1994 Oct 1;480 ( Pt 1):155-61.
- Futami T, Takakusaki K, Kitai ST. Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunclopontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neurosci Res.* 1995 Feb;21(4):331-42.
- Gerfen CR. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature.* 1984 Oct 4-10;311(5985):461-4.
- Gerfen CR, Baimbridge KG, Thibault J. The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems. *J Neurosci.* 1987a Dec;7(12):3935-44.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci.* 1987b Dec;7(12):3915-34.
- Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:441-66.

- German DC, Manaye KF. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol.* 1993 May 15;331(3):297-309.
- Gil M, Bhatt R, Picotte KB, Hull EM. Sexual experience increases oxytocin receptor gene expression and protein in the medial preoptic area of the male rat. *Psychoneuroendocrinology.* 2013 Sep;38(9):1688-97.
- Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):629-83.
- Gonzales C, Chesselet MF. Amygdalonigral pathway: an anterograde study in the rat with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol.* 1990 Jul 8;297(2):182-200.
- González-Hernández T, Rodríguez M. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol.* 2000 May 22;421(1):107-35.
- Graybiel AM. The basal ganglia. *Curr Biol.* 2000 Jul 13;10(14):R509-11.
- Graham WC, Crossman AR, Woodruff GN. Autoradiographic studies in animal models of hemi-parkinsonism reveal dopamine D2 but not D1 receptor supersensitivity. I. 6-OHDA lesions of ascending mesencephalic dopaminergic pathways in the rat. *Brain Res.* 1990 Apr 23;514(1):93-102.
- Grieb B, von Nicolai C, Engler G, Sharott A, Papageorgiou I, Hamel W, Engel AK, Moll CK. Decomposition of abnormal free locomotor behavior in a rat model of Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 2013 Nov 27;7:95.
- Grinevich V, Knobloch-Bollmann HS, Eliava M, Busnelli M, Chini B. Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. *Biol Psychiatry.* 2016 Feb 1;79(3):155-64.
- Grofova I, Deniau JM, Kitai ST. Morphology of the substantia nigra pars reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP. *J Comp Neurol.* 1982 Jul 10;208(4):352-68.
- Groppe SE, Gossen A, Rademacher L, Hahn A, Westphal L, Gründer G, Spreckelmeyer KN. Oxytocin influences processing of socially relevant cues in the ventral tegmental area of the human brain. *Biol Psychiatry.* 2013 Aug 1;74(3):172-9.
- Guastella AJ, Gray KM, Rinehart NJ, Alvares GA, Tonge BJ, Hickie IB, Keating CM, Cacciotti-Saija C, Einfeld SL. The effects of a course of intranasal oxytocin on social behaviors in youth diagnosed with autism spectrum disorders: a randomized controlled trial. *J Child Psychol Psychiatry.* 2015 Apr;56(4):444-52.
- Haber SN, Lynd E, Klein C, Groenewegen HJ. Topographic organization of the ventral striatal efferent projections in the rhesus monkey: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol.* 1990 Mar 8;293(2):282-98.
- Haber SN. The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience.* 2014 Oct 19;282C:248-257.
- Hallett M and Khoshbin S. A physiological mechanism of bradykinesia. *Brain.* 1980;101, 35-52. Basal Ganglia Transmitter Systems 535
- Hauber W. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Prog Neurobiol.* 1998 Dec;56(5):507-40.
- Hawthorn J, Ang VT, Jenkins JS. Effects of lesions in the hypothalamic paraventricular, supraoptic and suprachiasmatic nuclei on vasopressin and oxytocin in rat brain and spinal cord. *Brain Res.* 1985 Oct 28;346(1):51-7.

Hazzard TM, Stormshak F. Down-regulation of oxytocin receptors and secretion of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha after chronic treatment of ewes with estradiol-17beta. *Biol Reprod.* 1997 Jun;56(6):1576-81.

Hedreen JC, DeLong MR. Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque. *J Comp Neurol.* 1991 Feb 22;304(4):569-95.

Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.* 1980 Aug 11;195(1):123-37.

Heikkila RE, Shapiro BS, Duvoisin RC. The relationship between loss of dopamine nerve terminals, striatal [<sup>3</sup>H]spiroperidol binding and rotational behavior in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 1981 May 4;211(2):285-92.

Heizmann CW, Braun K. Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 1992 Jul;15(7):259-64.

Hoare S, Copland JA, Strakova Z, Ives K, Jeng YJ, Hellmich MR, Soloff MS. The proximal portion of the COOH terminus of the oxytocin receptor is required for coupling to G<sub>q</sub>, but not G<sub>i</sub>. Independent mechanisms for elevating intracellular calcium concentrations from intracellular stores. *J Biol Chem.* 1999 Oct 1;274(40):28682-9.

Hökfelt T, Martensson R, Björklund A, Kleinau S, Goldstein M. 1984. Distribution maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. In: Björklund A, Hökfelt T, editors. *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol 4. Amsterdam: Elsevier. p 277–379.

Holstein GR, Pasik P, Hámori J. Synapses between GABA-immunoreactive axonal and dendritic elements in monkey substantia nigra. *Neurosci Lett.* 1986 May 23;66(3):316-22.

Hu XT, Wachtel SR, Galloway MP, White FJ. Lesions of the nigrostriatal dopamine projection increase the inhibitory effects of D1 and D2 dopamine agonists on caudate-putamen neurons and relieve D2 receptors from the necessity of D1 receptor stimulation. *J Neurosci.* 1990 Jul;10(7):2318-29.

Huber D, Veinante P, Stoop R. Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science.* 2005 Apr 8;308(5719):245-8.

Iacopino A, Christakos S, German D, Sonsalla PK, Altar CA. Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992 Apr;13(3):251-61.

Inanobe A, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishige KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y. Characterization of G-protein-gated K<sup>+</sup> channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci.* 1999 Feb 1;19(3):1006-17.

Insel TR, Young LJ. The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Feb;2(2):129-36.

Iribe Y, Moore K, Pang KC, Tepper JM. Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 1999 Aug;82(2):925-33.

Işeri SO, Sener G, Saglam B, Gedik N, Ercan F, Yegen BC. Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. *J Surg Res.* 2005 Jun 1;126(1):73-81.

Ivell R, Balvers M, Rust W, Bathgate R, Einspanier A. Oxytocin and male reproductive function. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424:253-64.



- Jirikowski GF, Caldwell JD, Pedersen CA, Stumpf WE. Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems. *Neuroscience*. 1988 Apr;25(1):237-48.
- Joel D, Weiner I. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, 2000; 96:451-474.
- Kaneda K, Tachibana Y, Imanishi M, Kita H, Shigemoto R, Nambu A, Takada M. Down-regulation of metabotropic glutamate receptor 1alpha in globus pallidus and substantia nigra of parkinsonian monkeys. *Eur J Neurosci*. 2005 Dec;22(12):3241-54.
- Kimura M. Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neurosci Res*. 1995 Jul;22(4):353-8.
- Klenerova V, Krejci I, Sida P, Hlinak Z, Hynie S. Oxytocin and carbetocin effects on spontaneous behavior of male rats: modulation by oxytocin receptor antagonists. *Neuro Endocrinol Lett*. 2009;30(3):335-42.
- Knobloch HS, Charlet A, Hoffmann LC, Eliava M, Khrulev S, Cetin AH, Osten P, Schwarz MK, Seeburg PH, Stoop R, Grinevich V. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron*. 2012 Feb 9;73(3):553-66.
- Kornhuber J, Kim JS, Kornhuber ME, Kornhuber HH. The cortico-nigral projection: reduced glutamate content in the substantia nigra following frontal cortex ablation in the rat. *Brain Res*. 1984 Nov 19;322(1):124-6.
- Kovács GL, Sarnyai Z, Barbarci E, Szabó G, Telegdy G. The role of oxytocin-dopamine interactions in cocaine-induced locomotor hyperactivity. *Neuropharmacology*. 1990 Apr;29(4):365-8.
- Kozłowski GP and Nilaver G. Localization of neurohypophysial hormones in the mammalian brain. In: *Neuropeptides and Behavior. The Neurohypophysial Hormones*. Oxford, UK: Pergamon, 1986, p. 23–38.
- Kühn AA, Kupsch A, Schneider GH, Brown P. Reduction in subthalamic 8-35 Hz oscillatory activity correlates with clinical improvement in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2006 Apr;23(7):1956-60.
- Landgraf R, Neumann I, Schwarzberg H. Central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in the conscious rat after osmotic stimulation. *Brain Res*. 1988 Aug 9;457(2):219-25.
- Lang RE, Heil J, Ganten D, Hermann K, Rascher W, Unger T. Effects of lesions in the paraventricular nucleus of the hypothalamus on vasopressin and oxytocin contents in brainstem and spinal cord of rat. *Brain Res*. 1983 Feb 7;260(2):326-9.
- Lawrence D, Pittman QJ. Response of rat paraventricular neurones with central projections to suckling, haemorrhage or osmotic stimuli. *Brain Res*. 1985 Aug 19;341(1):176-83.
- Lee CR, Machold RP, Witkovsky P, Rice ME. TRPM2 channels are required for NMDA-induced burst firing and contribute to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent modulation in substantia nigra pars reticulata GABAergic neurons. *J Neurosci*. 2013 Jan 16;33(3):1157-68.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet*. 2009 Jun 13;373(9680):2055-66.
- Leong KC, Zhou L, Ghee SM, See RE, Reichel CM. Oxytocin Decreases Cocaine Taking, Cocaine Seeking, and Locomotor Activity in Female Rats. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2015 Nov 2. [Epub ahead of print]
- Leuner B, Caponiti JM, Gould E. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. *Hippocampus*. 2012 Apr;22(4):861-8.

Liu Y, Wang ZX. Nucleus accumbens oxytocin and dopamine interact to regulate pair bond formation in female prairie voles. *Neuroscience*. 2003;121(3):537-44.

Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Pizzolato G, Dreifuss JJ. Localization of oxytocin binding sites in the human brainstem and upper spinal cord: an autoradiographic study. *Brain Res*. 1989 Oct 23;500(1-2):223-30.

Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ. Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res*. 1991 Aug 2;555(2):220-32.

Love TM. Oxytocin, motivation and the role of dopamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014 Apr;119:49-60.

Ludwig M, Sabatier N, Dayanithi G, Russell JA, Leng G. The active role of dendrites in the regulation of magnocellular neurosecretory cell behavior. *Prog Brain Res*. 2002;139:247-56.

Ludwig M, Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Feb;7(2):126-36.

Lynd-Balta E, Haber SN. The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience*. 1994a Apr;59(3):625-40.

Lynd-Balta E, Haber SN. Primate striatonigral projections: a comparison of the sensorimotor-related striatum and the ventral striatum. *J Comp Neurol*. 1994b Jul 22;345(4):562-78.

Maejima Y, Rita RS, Santoso P, Aoyama M, Hiraoka Y, Nishimori K, Gantulga D, Shimomura K, Yada T. Nasal oxytocin administration reduces food intake without affecting locomotor activity and glycemia with c-Fos induction in limited brain areas. *Neuroendocrinology*. 2015;101(1):35-44.

Maguire S, O'Dell A, Touyz L, Russell J. Oxytocin and anorexia nervosa: a review of the emerging literature. *Eur Eat Disord Rev*. 2013 Nov;21(6):475-8.

Mai JK, Berger K, Sofroniew MV. Morphometric evaluation of neurophysin-immunoreactivity in the human brain: pronounced inter-individual variability and evidence for altered staining patterns in schizophrenia. *J Hirnforsch*. 1993;34(2):133-54.

Mallet N, Pogosyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ. Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci*. 2008 Apr 30;28(18):4795-806.

Marsden CD, Obeso JA. The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. *Brain*. 1994 Aug;117 ( Pt 4):877-97.

Marshall JF, Ungerstedt U. Striatal efferent fibers play a role in maintaining rotational behavior in the rat. *Science*. 1977 Oct 7;198(4312):62-4.

Martín-Ibañez R, Jenstad M, Berghuis P, Edwards RH, Hioki H, Kaneko T, Mulder J, Canals JM, Ernfors P, Chaudhry FA, Harkany T. Vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) identifies spatially segregated excitatory terminals in the rat substantia nigra. *Eur J Neurosci*. 2006 Feb;23(4):1063-70.

McGeer PL, McGeer EG. Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. *Adv Neurol*. 1993;60:93-101.

McRitchie DA, Halliday GM. Calbindin D28k-containing neurons are restricted to the medial substantia nigra in humans. *Neuroscience*. 1995 Mar;65(1):87-91.

McRitchie DA, Hardman CD, Halliday GM. Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *J Comp Neurol*. 1996 Jan 1;364(1):121-50.

- McRitchie DA, Cartwright H, Pond SM, van der Schyf CJ, Castagnoli N Jr, van der Nest DG, Halliday GM. The midbrain dopaminergic cell groups in the baboon *Papio ursinus*. *Brain Res Bull*. 1998 Dec;47(6):611-23.
- Meisenberg G. Short-term behavioral effects of posterior pituitary peptides in mice. *Peptides*. 1981 Spring;2(1):1-8.
- Melis MR, Gale K. Effect of dopamine agonists on gamma-aminobutyric acid (GABA) turnover in the superior colliculus: evidence that nigrothalamic GABA projections are under the influence of dopaminergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983 Aug;226(2):425-31.
- Melis MR, Gale K. Evidence that nigral substance P controls the activity of the nigrothalamic GABAergic pathway. *Brain Res*. 1984a Mar 19;295(2):387-93.
- Melis MR, Gale K. Intranigral application of substance P antagonists prevents the haloperidol-induced activation of striatal tyrosine hydroxylase. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1984b May;326(1):83-6.
- Melis MR, Stancampiano R, Argiolas A. Oxytocin- and vasopressin-like immunoreactivity in the rat thymus: characterization and possible involvement in the immune response. *Regul Pept*. 1993 Apr 29;45(1-2):269-72.
- Melis MR, Succu S, Iannucci U, Argiolas A. Oxytocin increases nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats: correlation with penile erection and yawning. *Regul Pept*. 1997 Mar 26;69(2):105-11.
- Melis MR, Melis T, Cocco C, Succu S, Sanna F, Pillolla G, Boi A, Ferri GL, Argiolas A. 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*. 2007 Aug;26(4):1026-35.
- Melis MR, Argiolas A. Central control of penile erection: a re-visitation of the role of oxytocin and its interaction with dopamine and glutamic acid in male rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):939-55.
- Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ. Pedunculo-pontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci*. 2004 Oct;27(10):585-8.
- Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Aug 19;12(9):524-38.
- Mink JW. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol*. 1996 Nov;50(4):381-425.
- Misgeld U. Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct;318(1):107-14.
- Moos F, Freund-Mercier MJ, Guerné Y, Guerné JM, Stoeckel ME, Richard P. Release of oxytocin and vasopressin by magnocellular nuclei in vitro: specific facilitatory effect of oxytocin on its own release. *J Endocrinol*. 1984 Jul;102(1):63-72.
- Moos F, Poulain DA, Rodriguez F, Guerné Y, Vincent JD, Richard P. Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. *Exp Brain Res*. 1989;76(3):593-602.
- Morales M, Root DH. Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*. 2014 May 27;282C:60-68.
- Moriizumi T, Leduc-Cross B, Wu J-Y, Hattori T. Separate neuronal populations of the rat substantia nigra pars lateralis with distinct projection sites and transmitter phenotypes. *Neuroscience*. 1992;43:711-720.

- Moukhles H, Bosler O, Bolam JP, Vallée A, Umbriaco D, Geffard M, Doucet G. Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience*. 1997 Feb;76(4):1159-71.
- Mueller JM, Pierce JG, du Vigneaud V. Treatment of performic acid-oxidized oxytocin with bromine water. *J Biol Chem*. 1953 Oct;204(2):857-60.
- Mugnaini E, Oertel WH. 1985. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunocytochemistry. In: Björklund A, Hökfelt T, editors. *Handbook of chemical neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier. p 436–595.
- Nelson EL, Liang CL, Sinton CM, German DC. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J Comp Neurol*. 1996 Jun 3;369(3):361-71.
- Neumann I, Russell JA, Landgraf R. Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. *Neuroscience*. 1993a Mar;53(1):65-75.
- Neumann I, Ludwig M, Engelmann M, Pittman QJ, Landgraf R. Simultaneous microdialysis in blood and brain: oxytocin and vasopressin release in response to central and peripheral osmotic stimulation and suckling in the rat. *Neuroendocrinology*. 1993b Dec;58(6):637-45.
- Neumann ID, Krömer SA, Toschi N, Ebner K. Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regul Pept*. 2000 Dec 22;96(1-2):31-8.
- Nieoullon A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol*. 2002 May;67(1):53-83.
- Nosek K, Dennis K, Andrus BM, Ahmadiyah N, Baum AE, Solberg Woods LC, Redei EE. Context and strain-dependent behavioral response to stress. *Behav Brain Funct*. 2008 Jun 2;4:23.
- Olszewski J, Baxter D (1954) *Cytoarchitecture of the human brain stem*. Karger, Basel
- Ostrowski NL, Young WS 3rd, Lolait SJ. Estrogen increases renal oxytocin receptor gene expression. *Endocrinology*. 1995 Apr;136(4):1801-4.
- Parent A, Carpenter MB. *Carpenter's Human Neuroanatomy*; 9th ed.; Williams & Wilkins; Baltimore, 1996.
- Parent, A. et al. Comparative anatomy of central monoaminergic systems. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. (Classical Transmitters in the CNS, Part I) (Vol. 2) (Björklund, A. and Hökfelt, T., eds). 1984: pp. 409–440, Elsevier.
- Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*. 1995 Jan;20(1):91-127.
- Park J, Willmott M, Vetuz G, Toye C, Kirley A, Hawi Z, Brookes KJ, Gill M, Kent L. Evidence that genetic variation in the oxytocin receptor (OXTR) gene influences social cognition in ADHD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 May 30;34(4):697-702.
- Paxinos, G., Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. VI edition. Academic Press NewYork, 2007.
- Petersson M, Ahlenius S, Wiberg U, Alster P, Uvnäs-Moberg K. Steroid dependent effects of oxytocin on spontaneous motor activity in female rats. *Brain Res Bull*. 1998;45(3):301-5.
- Petersson M, Lundeberg T, Uvnäs-Moberg K. Oxytocin enhances the effects of clonidine on blood pressure and locomotor activity in rats. *J Auton Nerv Syst*. 1999 Oct 8;78(1):49-56.

- Petersson M. Cardiovascular effects of oxytocin. *Prog Brain Res.* 2002;139:281-8.
- Petersson M, Eklund M, Uvnäs-Moberg K. Oxytocin decreases corticosterone and nociception and increases motor activity in OVX rats. *Maturitas.* 2005 Aug 16;51(4):426-33.
- Poulain DA, Wakerley JB. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience.* 1982 Apr;7(4):773-808.
- Prensa L, Parent A. The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci.* 2001 Sep 15;21(18):7247-60.
- Price JL, Amaral DG. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J Neurosci.* 1981 Nov;1(11):1242-59.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):3-33.
- Purba JS, Hofman MA, Swaab DF. Decreased number of oxytocin-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in Parkinson's disease. *Neurology.* 1994 Jan;44(1):84-9.
- Pyner S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat.* 2009 Nov;38(3):197-208.
- Qi J, Yang JY, Song M, Li Y, Wang F, Wu CF. Inhibition by oxytocin of methamphetamine-induced hyperactivity related to dopamine turnover in the mesolimbic region in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008 Feb;376(6):441-8.
- Quiñones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Adan RA, Burbach JP, Pfaff DW. Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology.* 1997 Jan;65(1):9-17.
- Radnikow G, Misgeld U. Dopamine D1 receptors facilitate GABA<sub>A</sub> synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci.* 1998 Mar 15;18(6):2009-16.
- Ramos A, Mormède P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;22(1):33-57.
- Ramos A, Correia EC, Izidio GS, Brüske GR. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behav Genet.* 2003 Nov;33(6):657-68.
- Redgrave P, Marrow L, Dean P. Topographical organization of the nigrotectal projection in rat: evidence for segregated channels. *Neuroscience.* 1992 Oct;50(3):571-95.
- Reiner A, Anderson KD. Co-occurrence of gamma-aminobutyric acid, parvalbumin and the neurotensin-related neuropeptide LANT6 in pallidal, nigral and striatal neurons in pigeons and monkeys. *Brain Res.* 1993 Oct 8;624(1-2):317-25.
- Ressler C, Trippett S, du Vigneaud V. Free amino groups of performic acid oxidized oxytocin and of its cleavage products formed by treatment with bromine water. *J Biol Chem.* 1953 Oct;204(2):861-9.
- Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ. Central effects of oxytocin. *Physiol Rev.* 1991 Apr;71(2):331-70.
- Ring RH, Malberg JE, Potestio L, Ping J, Boikess S, Luo B, Schechter LE, Rizzo S, Rahman Z, Rosenzweig-Lipson S. Anxiolytic-like activity of oxytocin in male mice: behavioral and autonomic evidence, therapeutic implications. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Apr;185(2):218-25.

- Rinvik E, Ottersen OP. Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *J Chem Neuroanat.* 1993 Jan-Feb;6(1):19-30.
- Romero-Fernandez W, Borroto-Escuela DO, Agnati LF, Fuxe K. Evidence for the existence of dopamine D2-oxytocin receptor heteromers in the ventral and dorsal striatum with facilitatory receptor-receptor interactions. *Mol Psychiatry.* 2013 Aug;18(8):849-50.
- Rosenfeld AJ, Lieberman JA, Jarskog LF. Oxytocin, dopamine, and the amygdala: a neurofunctional model of social cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2011 Sep;37(5):1077-87.
- Rye DB, Saper CB, Lee HJ, Wainer BH. Pedunculo-pontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J Comp Neurol.* 1987 May 22;259(4):483-528.
- Sakai K, Gash DM. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain Res.* 1994 Jan 7;633(1-2):144-50.
- Sanna F, Succu S, Hübner H, Gmeiner P, Argiolas A, Melis MR. Dopamine D2-like receptor agonists induce penile erection in male rats: differential role of D2, D3 and D4 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Behav Brain Res.* 2011 Nov 20;225(1):169-76.
- Sanna F, Argiolas A, Melis MR. Oxytocin-induced yawning: sites of action in the brain and interaction with mesolimbic/mesocortical and incertohypothalamic dopaminergic neurons in male rats. *Horm Behav.* 2012 Sep;62(4):505-14.
- Sarnyai Z, Babarczy E, Kriván M, Szabó G, Kovács GL, Barth T, Telegdy G. Selective attenuation of cocaine-induced stereotyped behaviour by oxytocin: putative role of basal forebrain target sites. *Neuropeptides.* 1991 May;19(1):51-6.
- Sarnyai Z, Kovács GL. Oxytocin in learning and addiction: From early discoveries to the present. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014 Apr;119:3-9.
- Sawchenko PE and Swanson LW. Relationship of oxytocin pathways to the control of neuroendocrine and autonomic function. In: *Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies.* Amsterdam: Excerpta Medica, 1985, p. 87–103.
- Schott BH, Minuzzi L, Krebs RM, Elmenhorst D, Lang M, Winz OH, Seidenbecher CI, Coenen HH, Heinze HJ, Zilles K, Düzel E, Bauer A. Mesolimbic functional magnetic resonance imaging activations during reward anticipation correlate with reward-related ventral striatal dopamine release. *J Neurosci.* 2008 Dec 24;28(52):14311-9.
- Schulz H, Kovács GL, Telegdy G. Action of posterior pituitary neuropeptides on the nigrostriatal dopaminergic system. *Eur J Pharmacol.* 1979 Aug 1;57(2-3):185-90.
- Schultz W. Behavior-related activity of primate dopamine neurons. *Rev Neurol (Paris).* 1994 Aug-Sep;150(8-9):634-9.
- Schwab RS, Chafetz ME, Walker S. Control of two simultaneous voluntary motor acts in normals and in parkinsonism. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1954 Nov;72(5):591-8.
- Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science.* 2008 Aug 8;321(5890):848-51.

- Skuse DH, Gallagher L. Dopaminergic-neuropeptide interactions in the social brain. *Trends Cogn Sci.* 2009 Jan;13(1):27-35.
- Smeets WJ, González A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Sep;33(2-3):308-79.
- Smith ID, Grace AA. Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity. *Synapse.* 1992 Dec;12(4):287-303.
- Smith Y, Parent A, Seguela P, Descarries L. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol.* 1987 May 1;259(1):50-64.
- Smith Y, Bolam JP, Von Krosigk M. Topographical and Synaptic Organization of the GABA-Containing Pallidosubthalamic Projection in the Rat. *Eur J Neurosci.* 1990;2(6):500-511.
- Smith Y, Bolam JP. Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience.* 1991;44(1):45-73.
- Sofroniew MV. Projections from vasopressin, oxytocin, and neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. *J Histochem Cytochem.* 1980 May;28(5):475-8.
- Sofroniew, MV. Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. *Trends Neurosci.* 6:467-472; 1983.
- Sofroniew MV. Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy: GABA and Neuropeptides in the CNS.* Amsterdam: Elsevier, 1985, vol. 4, p.93–165.
- Succu S, Sanna F, Cocco C, Melis T, Boi A, Ferri GL, Argiolas A, Melis MR. Oxytocin induces penile erection when injected into the ventral tegmental area of male rats: role of nitric oxide and cyclic GMP. *Eur J Neurosci.* 2008 Aug;28(4):813-21.
- Takakusaki K, Shiroyama T, Yamamoto T, Kitai ST. Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *J Comp Neurol.* 1996 Jul 29;371(3):345-61.
- Takakusaki K, Habaguchi T, Ohtinata-Sugimoto J, Saitoh K, Sakamoto T. Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience.* 2003;119(1):293-308.
- Taylor SP Jr, du Vigneaud V. Electrophoretic properties of oxytocin. *J Biol Chem.* 1953 Feb;200(2):559-64.
- Tomizawa K, Iga N, Lu YF, Moriwaki A, Matsushita M, Li ST, Miyamoto O, Itano T, Matsui H. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nat Neurosci.* 2003 Apr;6(4):384-90.
- Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1971;367:69-93.
- Uvnäs-Moberg K, Alster P, Hillegaard V, Ahlenius S. Oxytocin reduces exploratory motor behaviour and shifts the activity towards the centre of the arena in male rats. *Acta Physiol Scand.* 1992 Aug;145(4):429-30.
- Uvnäs-Moberg K, Ahlenius S, Hillegaard V, Alster P. High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994 Sep;49(1):101-6.
- Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL. Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology.* 1998 Dec;139(12):5015-33.

- van Haaren F, Meyer ME. Sex differences in locomotor activity after acute and chronic cocaine administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991 Aug;39(4):923-7.
- van Heuven-Nolsen D, De Kloet ER, Versteeg DH. Oxytocin affects utilization of noradrenaline in distinct limbic-forebrain regions of the rat brain. *Neuropharmacology.* 1984 Dec;23(12A):1373-7.
- Véronneau-Longueville F, Rampin O, Freund-Mercier MJ, Tang Y, Calas A, Marson L, McKenna KE, Stoeckel ME, Benoit G, Giuliano F. Oxytocinergic innervation of autonomic nuclei controlling penile erection in the rat. *Neuroscience.* 1999;93(4):1437-47.
- Versteeg DH. Neurohypophyseal hormones and brain neurochemistry. *Pharmacol Ther.* 1982;19(3):297-325.
- Waldherr M, Neumann ID. Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 16;104(42):16681-4.
- Walker QD, Cabassa J, Kaplan KA, Li ST, Haroon J, Spohr HA, Kuhn CM. Sex differences in cocaine-stimulated motor behavior: disparate effects of gonadectomy. *Neuropsychopharmacology.* 2001 Jul;25(1):118-30.
- Wang Z, Aragona BJ. Neurochemical regulation of pair bonding in male prairie voles. *Physiol Behav.* 2004 Nov 15;83(2):319-28.
- Wichmann T, Dostrovsky JO. Pathological basal ganglia activity in movement disorders. *Neuroscience.* 2011 Dec 15;198:232-44.
- Wilson SAK. Disorders of motility and muscle tone, with special reference to the striatum. *Lancet* 1925;II,215-268.
- Windels F, Kiyatkin EA. GABAergic mechanisms in regulating the activity state of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience.* 2006 Jul 21;140(4):1289-99.
- Windle RJ, Gamble LE, Kershaw YM, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. Gonadal steroid modulation of stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activity and anxiety behavior: role of central oxytocin. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2423-31.
- Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jun;5(6):483-94.
- Wise RA. Roles for nigrostriatal- not just mesocorticolimbic- dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci.* 2009 Oct;32(10):517-24.
- Yang HP, Wang L, Han L, Wang SC. Nonsocial functions of hypothalamic oxytocin. *ISRN Neurosci.* 2013 Jul 7;2013:179272.
- Yelnik J, François C, Percheron G, Heyner S.J *Comp Neurol.* 1987 Nov 22;265(4):455-72. Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons.
- Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, Tohyama M. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology.* 1993 Sep;133(3):1239-46.
- Young LJ, Wang Z. The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci.* 2004 Oct;7(10):1048-54.
- Zanos P, Georgiou P, Metaxas A, Kitchen I, Winsky-Sommerer R, Bailey A. Region-specific up-regulation of oxytocin receptor binding in the brain of mice following chronic nicotine administration. *Neurosci Lett.* 2015 Jul 23;600:33-7.



Zhang XH, Filippi S, Vignozzi L, Morelli A, Mancina R, Luconi M, Donati S, Marini M, Vannelli GB, Forti G, Maggi M. Identification, localization and functional in vitro and in vivo activity of oxytocin receptor in the rat penis. *J Endocrinol.* 2005 Mar;184(3):567-76.

Zhou L, Ghee SM, See RE, Reichel CM. Oxytocin differentially affects sucrose taking and seeking in male and female rats. *Behav Brain Res.* 2015 Apr 15;283:184-90.

Zimmerman EA, Nilaver G, Hou-Yu A, Silverman AJ. Vasopressinergic and oxytocinergic pathways in the central nervous system. *Fed Proc.* 1984 Jan;43(1):91-6.