



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

Ciclo XXX

**La somministrazione di ossitocina nel nucleo del letto della
stria terminale del ratto induce erezione peniena e sbadiglio:
studi comportamentali, neurofarmacologici e neurochimici sul
meccanismo d'azione.**

**Settore/i scientifico disciplinari di afferenza
M-PSI/02 – Psicobiologia e Psicologia Fisiologica**

Presentata da: Dott.ssa Jessica Bratzu

Coordinatore Dottorato Prof. Antonio Argiolas

Tutor Prof. Antonio Argiolas

**Esame finale anno accademico 2016 – 2017
Tesi discussa nella sessione d'esame Febbraio-Marzo 2018**



La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2016/2017 - XXX ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali.

Jessica Bratzu gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective 1.3, Line of Activity 1.3.1.).

Abstract

Il nucleo del letto della stria terminale (BNST) è una struttura limbica complessa ed eterogenea, che gioca un ruolo importante nella risposta autonoma, neuroendocrina e comportamentale come l'ansia, la paura, lo stress e il comportamento sessuale. Il controllo di queste funzioni esercitato dal BNST è mediato dall'azione di diversi neurotrasmettitori come GABA, acido glutammico, dopamina, serotonina, ossido nitrico (NO), e neuropeptidi come corticotrophin releasing factor (CRF) e ossitocina. È interessante notare che i) l'ossitocina e i recettori ossitocinergici sono presenti nel BNST, ii) tutti i neuroni ossitocinergici presenti nel sistema nervoso centrale originano dal nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, e iii) alcuni di questi neuroni regolano l'erezione peniena, il comportamento sessuale e lo sbadiglio. Ciò aumenta la possibilità che l'ossitocina possa svolgere un ruolo nel controllo di queste risposte anche a livello del BNST.

Per verificare questa possibilità, è stato studiato l'effetto dell'ossitocina iniettata nel BNST su queste risposte comportamentali. L'ossitocina (5-100ng), ma non l'Arg⁸-vasopressina (100ng), induce erezione peniena e sbadiglio in modo dose-dipendente quando iniettata unilateralmente nel BNST nei ratti maschi. La dose minima efficace era 20ng per l'erezione peniena e 5 ng per lo sbadiglio. Le risposte comportamentali indotte dall'ossitocina sono state abolite non solo dalla precedente somministrazione dell'antagonista selettivo dei recettori ossitocinergici d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina (1μg), ma anche da parte del(+)-MK-801 (1μg), un antagonista selettivo dei recettori di tipo NMDA, del SCH 23390 (1μg), antagonista selettivo del recettore dopaminergico del tipo D1, ma non dall'aloiperidolo (1μg), antagonista selettivo del recettore dopaminergico del tipo D2, e dal SMTC (40μg), un inibitore della ossido nitrico sintetasi neuronale, iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina. L'erezione peniena indotta dall'ossitocina, ma non lo sbadiglio, è stata anche abolita dal CNQX (1μg), un antagonista selettivo dei recettori per gli amminoacidi eccitatori del tipo AMPA. Al contrario, le risposte comportamentali indotte dall'ossitocina non sono state ridotte dalla somministrazione di bicucullina (20ng), antagonista selettivo del recettore GABA_A, dal faclofen (5μg), antagonista selettivo del recettore GABA_B, dal CP 376395, antagonista selettivo del recettore CRF-1 (5μg), o dall'astressina 2B, antagonista selettivo del recettore CRF-2 (150ng). Poiché anche l' NMDA (100 ng) ha indotto erezione peniena e sbadiglio quando iniettato nel BNST e poichè tale risposta non è stata antagonizzata dal pre-trattamento con d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina, questi risultati suggeriscono che l'ossitocina induce erezione peniena e sbadiglio attraverso l'attivazione della neurotrasmissione glutammatergica all'interno del BNST.

Questo a sua volta porta all'attivazione di vie neuronali di ritorno che proiettano al nucleo paraventricolare, all'area preottica mediale, all'area tegmentale ventrale e / o al subicolo ventrale / amigdala, inducendo così l'erezione peniena e lo sbadiglio. In linea con questo meccanismo di azione, gli esperimenti di microdialisi intracerebrale hanno dimostrato che i) l'ossitocina (100 ng) iniettata nel BNST non solo induce erezione peniena e sbadiglio, ma aumenta anche le concentrazioni di acido glutammico extracellulare e ioni NO₂⁻ (che misurano la produzione di NO) nella dialisi ottenuta dal BNST e ii) entrambi gli effetti vengono aboliti mediante pretrattamento con d(CH₂)₅Tyr (Me)²-Orn⁸-vasotocina (1μg) somministrata nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 Controllo periferico dell'erezione peniena | 2 |
| 1.2 Controllo centrale dell'erezione peniena | 5 |
| 1.3 Ossitocina | 10 |
| 1.4 Recettori ossitocinergici | 12 |
| 1.5 Nucleo del letto della stria terminale | 13 |
| 1.6 Microdialisi intracerebrale | 17 |
| 2. SCOPO DELLA RICERCA | 19 |
| 3. MATERIALI E METODI | 20 |
| 3.1 Animali | 20 |
| 3.2 Farmaci e peptidi | 20 |
| 3.3 Microiniezioni | 20 |
| 3.4 Microiniezioni e microdialisi | 22 |
| 3.5 Determinazione della concentrazione di acido glutamico nel dializzato del BNST | 23 |
| 3.6 Determinazione della concentrazione degli ioni NO_2^- nel dializzato del BNST | 24 |
| 3.7 Verifiche istologiche | 24 |
| 3.8 Statistica | 25 |
| 4. RISULTATI | 27 |
| 4.1 Effetto dell'iniezione di ossitocina nel BNST sull'erezione peniena e lo sbadiglio: curve dose-risposta e confronto con l'arg8-vasopressina | 27 |
| 4.2 Effetto dell'iniezione di ossitocina nel BNST sull'erezione peniena e lo sbadiglio: antagonismo da $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})_2\text{-Orn}_8\text{-vasotocina}$ | 28 |
| 4.3 Effetto del (+)-MK-801, CNQX e SMTC iniettati nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST | 30 |
| 4.4 Effetto dell'aloiperidolo e dell' SCH-23390 iniettati nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST | 31 |
| 4.5 Effetto della bicucullina e del faclofen iniettati nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST | 32 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.6 | Effetto del CP-154526 e dell'astressina 2B iniettati nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST | 34 |
| 4.7 | Effetto dell'iniezione di NMDA nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio: confronto con l'ossitocina | 35 |
| 4.8 | Concentrazioni basali di acido glutamico e di ioni NO ₂ - nel dializzato ottenuto dal BNST mediante microdialisi intracerebrale | 37 |
| 4.9 | L'ossitocina iniettata nel BNST induce erezione peniena e sbadiglio e aumenta la concentrazione di acido glutamico e di ioni NO ₂ - nel dializzato ottenuto dal BNST: effetto del pre-trattamento con d(CH ₂) ₅ Tyr(Me) ₂ -Orn ₈ -vasotocina | 38 |
| 5. | DISCUSSIONE | 42 |
| 6. | CONCLUSIONI | 49 |
| 7. | REFERENZE BIBLIOGRAFICHE | 50 |

1. INTRODUZIONE

Il cervello ha due obiettivi primari: la sopravvivenza dell'individuo e la sopravvivenza della specie. Il comportamento sessuale risulta quindi indispensabile per la riproduzione di tutti i mammiferi, uomo incluso. Il comportamento riproduttivo e la sua regolazione varia da specie a specie ma il mio studio di tesi sarà focalizzato sul ratto nel quale viene generalmente suddiviso in 2 fasi principali: durante la prima fase 'anticipatoria' (o appetitiva) l'animale presenta un'attività esplorativa attiva nei confronti dell'ambiente circostante e soprattutto della femmina (investigazione ano-genitale) che gli consente di capire se la femmina è recettiva e quindi può iniziare la seconda fase 'copulatoria' (o consumatoria) durante la quale l'animale effettua una serie di monte e intromissioni seguite generalmente da grooming genitale che portano eventualmente all'eiaculazione (Argiolas e Melis, 2013; Veening e Coolen, 2014; Hull e Dominguez, 2007; Meisel e Sachs, 1994; Sachs e Barfield, 1976 e referenze ivi incluse). A tal proposito l'erezione peniena è una risposta fisiologica che gioca un ruolo fondamentale nell'esecuzione del comportamento sessuale maschile. E' importante ricordare che tale risposta si può osservare anche in situazioni non strettamente legate alla riproduzione, per esempio durante il sonno REM, durante la manipolazione dei genitali, in seguito alla somministrazione di diversi farmaci, e esclusivamente nell'uomo, durante le fantasie erotiche. Quando lo stimolo sessuale raggiunge il sistema nervoso centrale (SNC) vengono attivate una serie di vie che permettono che l'informazione venga trasmessa dal SNC al sistema nervoso autonomo che permette che avvenga l'erezione e, in base al contesto in cui si verifica, vengono attivati differenti meccanismi neurali, centrali e periferici attraverso l'azione di diversi neuropeptidi e neurotrasmettitori che possono facilitare o inibire tale comportamento (Melis e Argiolas 1995, 2003, 2011; Meisel e Sachs, 1994; Heaton, 2000; Sachs 2000, 2007; McKenna, 2000; Giuliano e Rampin, 2000; Andersson, 2001; Hull et al., 2002).

Spesso l'erezione peniena è associata allo sbadiglio, un comportamento fisiologicamente antico che si manifesta sia nell'uomo che negli altri mammiferi in differenti situazioni. Lo sbadiglio è caratterizzato dall'apertura della bocca seguita da una lunga espirazione, e come un classico riflesso, una volta iniziato viene completato. Tuttavia lo sbadiglio non è considerato un semplice riflesso di breve durata, infatti tale comportamento coinvolge diverse aree cerebrali e diversi neurotrasmettitori e neuropeptidi che possono facilitarlo o inibirlo (Bertolini e Gessa, 1981; Argiolas e Melis, 1998). Il motivo per cui si sbadiglia è ancora da

chiarire, anche se è stato verificato che quando si manifesta, avviene contemporaneamente ad un aumento dell'attività elettroencefalografica corticale, suggerendo che lo sbadiglio sia un comportamento ancestrale vestigiale sopravvissuto nel corso dell'evoluzione che compare quando si ha un deficit dell'attenzione per riacquistare una condizione di vigilanza grazie al maggiore afflusso di ossigeno nel sangue e da qui al cervello. Inoltre lo sbadiglio è contagioso, infatti può essere evocato nell'uomo e nei primati, attraverso la visione di un soggetto della stessa specie che sbadiglia. Questo porta a pensare che tale comportamento sia collegato all'empatia (Sanna et al., 2012; Walusinski, 2009; Anderson et al., 2004; Campbell e de Waal, 2011; Palagi et al., 2009; Paukner e Anderson, 2006).

1.1 Controllo periferico dell'erezione peniena

A livello periferico l'evento chiave che porta all'erezione è il rilasciamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi e del corpo spongioso, che permette che il sangue fluisca dalle arterie peniene ai corpi cavernosi e al corpo spongioso del pene inducendo così tumescenza. I corpi cavernosi quando si dilatano comprimono le vene peniene contro la tonaca albuginea attivando un meccanismo veno-occlusivo che mantiene lo stato di erezione. Come detto sopra, la percezione degli stimoli sessuali attiva una serie di attività neurali che, tramite il sistema limbico e alcuni nuclei ipotalamici, fanno sì che l'informazione giunga al midollo spinale che tramite il sistema nervoso autonomo regola la funzionalità erettile (Argiolas, 2002; Argiolas e Melis, 2003, 2004).

A livello periferico le vie neurali si suddividono principalmente in: nervi ipogastrici che emergono dal tratto toraco-lombare (T4-L2); nervi che emergono dal sistema gangliare simpatico paravertebrale (T10-L2); nervi pelvici che emergono dal tratto sacrale (S2-S4) del midollo spinale. Tali vie giungono al plesso pelvico da cui hanno origine i nervi cavernosi che innervano il corpo cavernoso e il corpo spongioso del pene e le fibre nervose che innervano le strutture sessuali accessorie quali dotti deferenti, prostata, vescicole seminali e la ghiandola di Cowper. Dal tratto sacrale (S2-S4) originano i nervi pudendi dove decorrono le afferenze sensoriali dell'apparato genitale maschile e in cui sono presenti i nuclei motori di Onuf da cui emergono i motoneuroni che innervano i muscoli striati dell'apparato genitale e penieno tra cui il muscolo bulbospongioso, ischio cavernoso e ischiouretrale localizzati alla base del pene. A livello di questi nuclei spinali è stato dimostrato che sono presenti le terminazioni nervose dei neuroni ossitocinergici che originano nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo con funzione facilitatoria dell'erezione e le terminazioni dei neuroni serotoninergici che originano

nei nuclei paragigantocellulari della formazione reticolare nel midollo allungato che hanno una funzione inibitoria dell'eiaculazione (vedi Argiolas, 2002; Argiolas e Melis, 2003, 2004). Il circuito neurale costituito dai nervi pelvici, dai nervi cavernosi e dai nervi pudendi nel maschio è anche responsabile delle cosiddette erezioni riflesse, indotte da stimolazione degli organi genitali, che si verificano anche in presenza di lesioni del midollo spinale localizzate al di sopra del tratto sacrale oltre che del riflesso bulbospongioso (sorta di iper-rigidità che si verifica toccando il glande durante l'erezione) (Figura 1).

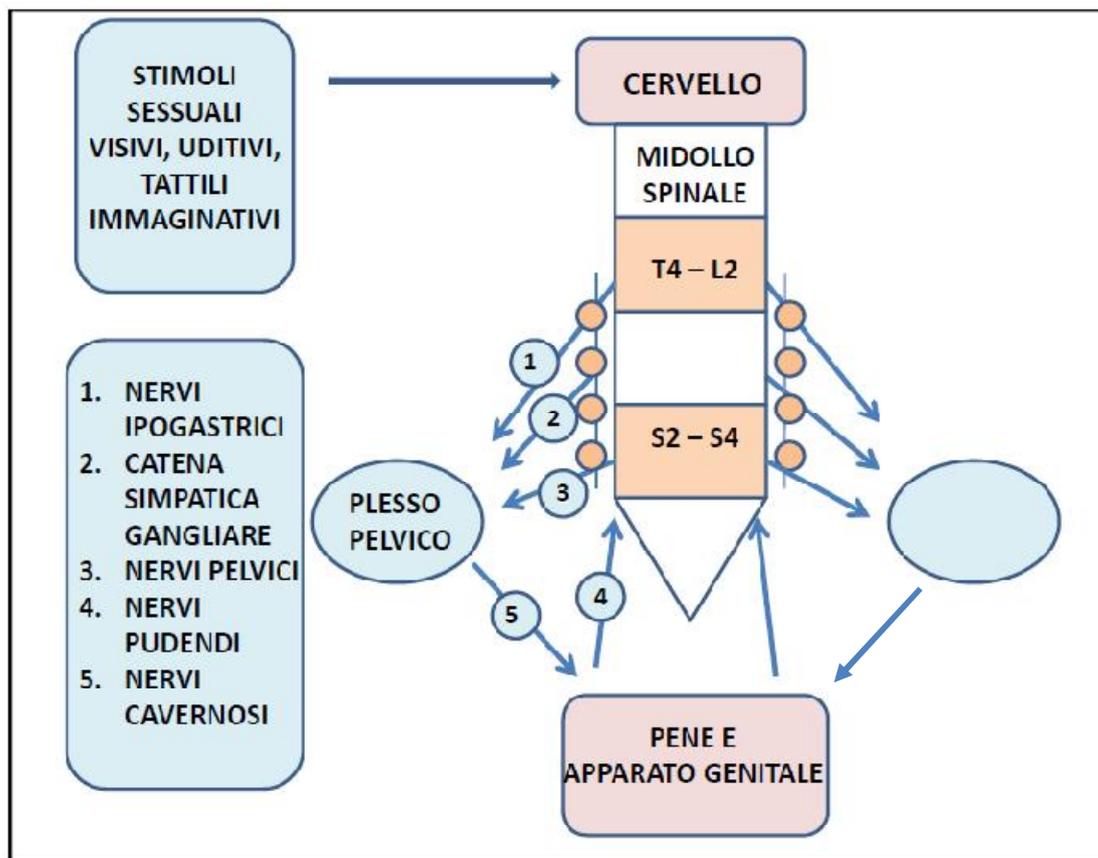


Figura 1. rappresentazione schematica delle principali vie neurali che proiettano dal sistema nervoso centrale, attraverso il midollo spinale all'apparato genitale maschile. L'apparato genitale maschile è innervato dai nervi pudendi che contengono le principali vie afferenti sensoriali e motorie e dai nervi cavernosi che contengono le principali vie efferenti simpatiche e parasimpatiche che originano dai plessi pelvici. Questi a loro volta sono innervati dai nervi ipogastrici, dai nervi pelvici e dalle fibre post-gangliari che originano dai gangli paravertebrali simpatici del tratto lombosacrale (Argiolas, 2005).

A livello locale intervengono diversi fattori che regolano la muscolatura liscia del corpo cavernoso e del corpo spongioso del pene, e tra questi sono stati identificati 3 tipi principali di controllo neurale: il primo noradrenergico, il secondo colinergico e l'ultimo di tipo nitrenergico. Per quanto riguarda la noradrenalina, quest'ultima agendo sui recettori α_1 stimola l'attivazione della fosfolipasi C, aumentando così il metabolismo del fosfatidilinositolo in

diacilglicerolo e inositolo trifosfato che sono responsabili della contrazione muscolare. In tal modo i corpi cavernosi risultano contratti causando quindi flaccidità del pene. L'acetilcolina al contrario, agendo sui recettori muscarinici, induce un rilasciamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi (condizione di eccitazione). Poiché l'acetilcolina rilascia la muscolatura liscia dei corpi cavernosi esclusivamente se l'endotelio è intatto e tale effetto rilasciante non è prevenuto dai farmaci anti-muscarinici che agiscono direttamente nei corpi cavernosi, è stata ipotizzata l'azione di un terzo fattore, liberato dall'azione dell'acetilcolina sui recettori muscarinici presenti nell'endotelio, responsabile del rilasciamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi. Questo fattore è stato identificato essere l'ossido nitrico (NO) (Argiolas, 2005 e referenze ivi incluse).

L'NO si forma dalla L-arginina ad opera dell'ossido nitrico sintetasi (NOS), enzima calcio-calmodulina dipendente presente nell'endotelio che riveste la muscolatura liscia dei corpi cavernosi e su cui agisce l'acetilcolina liberata dai neuroni parasimpatici (Figura 2). Una volta formato, l'NO, attiva l'enzima guanilato ciclasi che converte il GTP (guanosina trifosfato) in cGMP (guanosina monofosfato ciclico), il secondo messaggero responsabile del rilasciamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi. L'azione del cGMP nei corpi cavernosi termina ad opera della fosfodiesterasi di tipo V, la principale isoforma presente nel tessuto cavernoso. Infatti, i farmaci pro-ereetili quali il sildenafil (Viagra) inibiscono l'azione delle fosfodiesterasi di tipo V inibendo così la degradazione del GMP ciclico responsabile del rilasciamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi, e quindi dell'erezione (Argiolas, 2002).

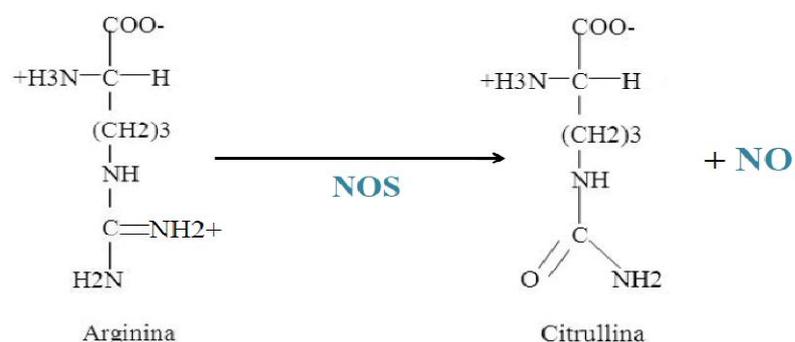


Figura 2. Sintesi dell'ossido nitrico ad opera dell'enzima ossido nitrico sintetasi neuronale (NOS).

1.2 Controllo centrale dell'erezione peniena

Come riportato in precedenza le vie neurali ipogastriche e sacrali che regolano i tessuti erettili penieni sono controllate da centri cerebrali superiori ma i meccanismi mediante i quali vengono attivate le diverse aree cerebrali in seguito agli stimoli sessuali ancora non sono stati completamente chiariti. Nonostante ciò, sono state identificate diverse aree cerebrali implicate nella funzione erettile e nel comportamento copulatorio. Tra queste le più note sono l'area preottica mediale, il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, l'ippocampo, l'area tegmentale ventrale, l'amigdala, il nucleo accumbens e il midollo allungato (Melis e Argiolas, 2011). In queste strutture sono stati identificati diversi neurotrasmettitori e neuropeptidi coinvolti nel controllo della funzione erettile. Diversi studi farmacologici sul ratto mostrano infatti come i neurotrasmettitori eccitatori (quali acido glutamico), la dopamina, l'ossido nitrico, i neuropeptidi ACTH-simili e l'ossitocina mostrano un'attività facilitatoria sull'erezione, mentre il GABA, la serotonina, i peptidi oppioidi e gli endocannabinoidi mostrano un'attività inibitoria (Meisel e Sachs, 1994; Argiolas e Melis, 2005, 2013; Giuliano e Rampin, 2000) (Tabella 1).

Tra i diversi neurotrasmettitori in grado di facilitare l'erezione peniena nel topo, nel ratto, nel coniglio e nella scimmia, l'ossitocina è sicuramente uno dei più potenti (Argiolas et al., 1986). Tali risultati possono essere probabilmente estesi anche all'uomo, dove infatti è stato dimostrato che i livelli di ossitocina aumentano nel plasma in seguito a stimoli sessuali e in seguito all'eiaculazione (Carmichael et al., 1987; Murphy et al., 1987).

L'area maggiormente sensibile all'induzione dell'erezione peniena da parte dell'ossitocina è il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo dove la dose minima efficace è di 3pmol (Melis et al., 1986). In accordo con questi risultati, l'interazione sessuale aumenta l'espressione del *c-fos*, un marcatore dell'attivazione neuronale, nei neuroni ossitocinergici del nucleo paraventricolare che proiettano al midollo spinale responsabili del controllo dell'erezione (Witt e Insel, 1994). Inoltre è stata riscontrata una correlazione tra ratti maschi sessualmente impotenti, ossia incapaci di copulare con una femmina recettiva, e i bassi livelli di RNA messaggero (mRNA) per l'ossitocina nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (Arletti et al., 1997).

Affinché l'erezione si verifichi è perciò necessaria l'attivazione dei neuroni ossitocinergici nel nucleo paraventricolare e l'attività di questi ultimi può essere modulata da diversi neurotrasmettitori che possono facilitare o inibire l'erezione. Tra questi la dopamina, acido glutamico, ossido nitrico e ossitocina hanno un'attività facilitatoria, mentre GABA,

noradrenalina, peptidi oppioidi e endocannabinoidi hanno un'azione inibitoria della funzionalità erettile (Argiolas e Melis, 2005; Melis e Argiolas, 2011). In particolare la somministrazione di agonisti dopaminergici come l'apomorfina nel nucleo paraventricolare porta all'attivazione dei neuroni ossitocinergici che presentano i recettori per la dopamina. Il nucleo paraventricolare è anche ricco di terminazioni glutamatergiche e l'attivazione dei recettori degli amminoacidi eccitatori del tipo NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) localizzati nei neuroni ossitocinergici porta all'attivazione di questi ultimi. Quindi un aumento dell'attività dei neurotrasmettitori eccitatori a livello del nucleo paraventricolare può indurre l'erezione.

Tabella 1.

| Composto | Effetto su | | Area cerebrale |
|---------------------------------|--|------------------|---------------------------------|
| | Erezione peniena | Riflessi penieni | |
| Dopamina | Facilitatorio | Facilitatorio | PVN, MPOA |
| Serotonina | Inibitorio, facilitatorio ^a | Inibitorio | Midollo Spinale, MPOA |
| Amminoacidi eccitatori | Facilitatorio | ND | PVN |
| GABA | Inibitorio | Inibitorio | PVN, Midollo Spinale |
| Ossido nitrico | Facilitatorio | ND | PVN, MPOA |
| Acetilcolina | Facilitatorio | ND | Ippocampo |
| Noradrenalina | Inibitorio | ND | Ipotalamo |
| Ossitocina | Facilitatorio | ND | PVN, Midollo Spinale, Ippocampo |
| ACTH-MSH | Facilitatorio | ND | APVH |
| Peptidi Oppioidi | Inibitorio | ND | PVN, MPOA |
| Peptidi analoghi dell'esarelina | Facilitatorio | ND | PVN |
| Peptidi analoghi al VGF | Facilitatorio | ND | PVN |
| Endocannabinoidi | Inibitorio | ND | PVN |

Abbreviazioni: PVN = Nucleo Paraventricolare dell'Ipotalamo; MPOA = Area Preottica Mediale; APVH = Area Periventricolare Ipotalamica; ND = Non Disponibile; ^a = dipendente dal sottotipo recettoriale coinvolto.

Quanto al meccanismo attraverso cui l'ossitocina induce l'attivazione dei neuroni ossitocinergici nel nucleo paraventricolare e la conseguente erezione peniena, si ritiene che l'ossitocina agendo sui suoi recettori localizzati nel corpo cellulare e nei dendriti dei suoi stessi neuroni induca un aumento dell'influsso di ioni Ca^{2+} all'interno del corpo cellulare di questi ultimi. Gli ioni Ca^{2+} attivano la NOS neuronale, aumentando la sintesi di NO, che a sua volta induce, attraverso un meccanismo ancora sconosciuto, l'attivazione dei neuroni ossitocinergici che proiettano al midollo spinale e alle aree extraipotalamiche coinvolte nella risposta erettile (Argiolas e Melis, 1995, 2004, 2005, 2013). Un meccanismo analogo può spiegare anche l'effetto stimolatorio di altri trasmettitori che inducono erezione peniena stimolando nel nucleo paraventricolare i neuroni ossitocinergici responsabili della risposta erettile (dopamina, acido glutammico ed altri) (Argiolas e Melis, 1995, 2004, 2005, 2013) (Figura 3).

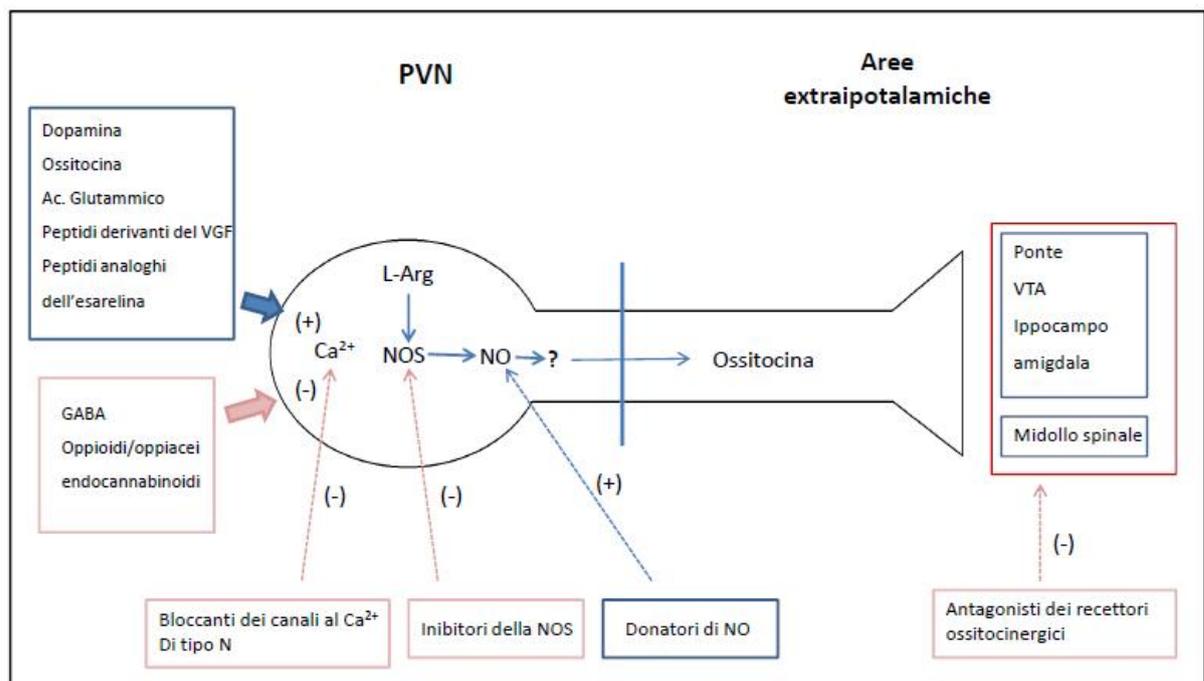


Figura 3. Rappresentazione schematica dei neuroni ossitocinergici del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo. Questi neuroni quando attivati dalla dopamina, aminoacidi eccitatori e dalla stessa ossitocina stimolano l'attivazione della NOS neuronale con conseguente aumento dell'NO. L'NO con un meccanismo ancora sconosciuto attiva la liberazione di ossitocina nel midollo spinale e nelle aree di proiezione extra-ipotalamiche stimolando la funzionalità erettile. Tale meccanismo viene invece inibito dal GABA, peptidi oppioidi e endocannabinoidi.

Come sopra riportato, i neuroni ossitocinergici del nucleo paraventricolare proiettano oltre che al midollo spinale anche ad aree cerebrali extraipotalamiche tra cui l'area tegmentale ventrale, il subicolo ventrale dell'ippocampo, e il nucleo posteromediale dell'amigdala.

Nell'area tegmentale ventrale, in particolare nella porzione caudale ma non in quella ventrale, l'ossitocina è in grado di stimolare l'erezione peniena in modo dose-dipendente (Melis et al., 2007). Tale azione sembra essere mediata dai recettori ossitocinergici localizzati nei neuroni dopaminergici che inviano proiezioni allo shell del nucleo accumbens. Similmente a quanto avviene nel nucleo paraventricolare, l'influsso di Ca^{2+} nei neuroni dopaminergici dell'area tegmentale ventrale indotto dall'attivazione dei recettori ossitocinergici sul loro corpo cellulare porta a un aumento della produzione di NO che in questo caso, a differenza del nucleo paraventricolare, sembra essere correlato all'attivazione della guanilato ciclasi che induce un aumento del GMPc, e questo porta a sua volta ad un aumento della liberazione di dopamina nel nucleo accumbens (Succu et al., 2008).

Dal nucleo accumbens viene attivata una via ancora sconosciuta che porta alla stimolazione di neuroni dopaminergici localizzati nell'ipotalamo, chiamati neuroni dopaminergici incerto-ipotalamici (gruppi A13-A14 di Dahlstrom e Fuxe), che a loro volta stimolano i neuroni ossitocinergici del nucleo paraventricolare che proiettano al midollo spinale e alle altre aree extraipotalamiche (Melis et al., 2007, 2009a) stimolando la funzione erettile e il comportamento sessuale.

In accordo con questi risultati, la somministrazione di $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2-Orn^8$ -vasotocina (un antagonista selettivo dei recettori ossitocinergici) o di S-metil-tio-L-citrullina (un inibitore della NOS neuronale) nella porzione caudale dell'area tegmentale ventrale abolisce l'erezione peniena indotta dall'ossitocina e l'aumento della concentrazione di dopamina nello shell del nucleo accumbens. A conferma di ciò, la somministrazione di aloperidolo (un antagonista selettivo dei recettori dopaminergici D2) nello shell del nucleo accumbens, inibisce le erezioni peniene indotte dall'iniezione di ossitocina iniettata nell'area tegmentale ventrale (Melis et al., 2007).

L'ossitocina, che viene invece liberata nel subicolo ventrale dell'ippocampo, induce un aumento della trasmissione glutamatergica che probabilmente interviene nella modulazione dell'attività dei neuroni dopaminergici dell'area tegmentale ventrale. L'ippocampo, inoltre, invia proiezioni glutamatergiche anche allo stesso nucleo paraventricolare che possono attivare i neuroni ossitocinergici (tra cui quelli che proiettano all'area tegmentale ventrale) stimolando quindi l'erezione (Melis et al., 2007, 2009b). Studi di microdialisi intracerebrale hanno mostrato infatti che l'iniezione di ossitocina nel subicolo ventrale dell'ippocampo induce un aumento delle erezioni peniene e della concentrazione extracellulare di NO e acido

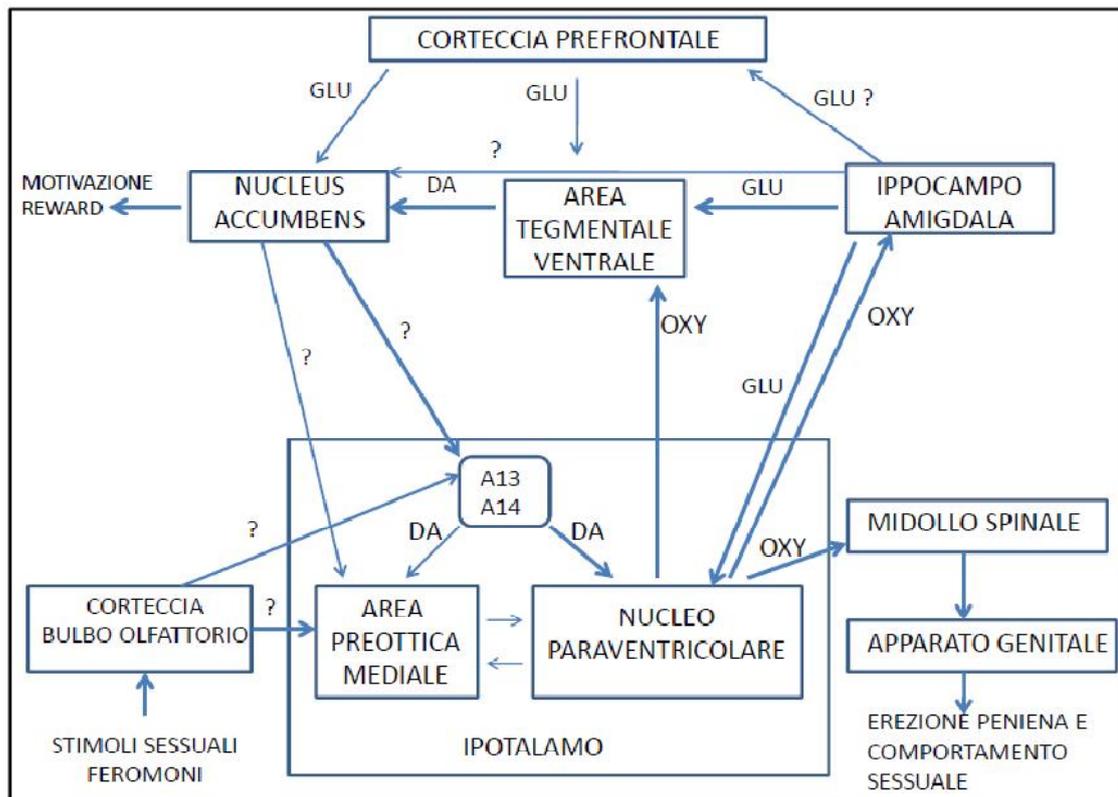


Figura 4. Rappresentazione schematica dell'ipotetico circuito neurale che tramite il coinvolgimento dell'ossitocina regola il comportamento sessuale e l'erezione peniena. I neuroni ossitocinergici che originano nel nucleo paraventricolare se stimolati dalla dopamina o dall'acido glutamico facilitano l'erezione peniena e il comportamento sessuale attraverso l'attivazione dei neuroni ossitocinergici che proiettano al midollo spinale. La dopamina e l'acido glutamico nel nucleo paraventricolare attivano anche neuroni ossitocinergici che proiettano all'area tegmentale ventrale, il che attiva il sistema mesolimbico, stimolando la liberazione di dopamina nel nucleo accumbens. Dal nucleo accumbens viene attivata una via ancora sconosciuta che induce un aumento dell'attività nei neuroni dopaminergici incerto-ipotalamici che originano dai gruppi A13-14 di Dahlstrom e Fuxe che a loro volta attivano i neuroni ossitocinergici presenti nell'ipotalamo, compresi quello che proiettano al midollo spinale stimolando così l'erezione. Questo circuito può essere attivato anche dalla stimolazione del subicolo ventrale e dell'amigdala da parte delle terminazioni ossitocinergiche provenienti dal nucleo paraventricolare attraverso l'attivazione diretta o indiretta dell'area tegmentale ventrale da parte dell'acido glutamico portando anche in questo caso alla modulazione del comportamento sessuale e erezione peniena. In generale, questo circuito può essere attivato da stimoli sessuali e feromoni (che attivano il rilascio di dopamina e acido glutamico non solo nel nucleo paraventricolare ma anche nell'area preottica mediale, quindi può avere una rilevanza nei processi fisiologici di regolazione della funzione erettile e del comportamento sessuale (Melis e Argiolas, 2011).

glutamico non solo nello stesso subicolo ventrale, ma anche nell'area tegmentale ventrale (Melis et al., 2010), e tale aumento è correlato a un aumento della concentrazione di dopamina nello shell del nucleo accumbens (Melis et al., 2007). Anche in questo caso le risposte prodotte dall'iniezione di ossitocina vengono antagonizzate dalla $d(CH_2)_5Tyr(Me)^2$ -Orn⁸-vasotocina e dalla S-metil-tio-L-citrullina iniettate nel subicolo ventrale dell'ippocampo prima dell'ossitocina. Inoltre, a conferma di quest'ipotesi, l'iniezione di NMDA all'interno del subicolo ventrale induce un aumento dell'erezioni peniene (Melis et al., 2010).

In conclusione, l'attivazione della via dopaminergica mesolimbica può essere o diretta mediante l'attivazione dei recettori ossitocinergici localizzati sui neuroni dopaminergici nell'area tegmentale ventrale, o indiretta attraverso le proiezioni glutamatergiche dall'ippocampo alle diverse aree cerebrali (principalmente area tegmentale ventrale e nucleo paraventricolare). Questo circuito quindi svolge un ruolo essenziale non solo nella fase consumatoria ma anche nella motivazione sessuale e nei meccanismi di rinforzo (Melis e Argiolas 2011) (Figura 4).

1.3 L'ossitocina

L'ossitocina è un ormone peptidico costituito da 9 amminoacidi (*Cys1-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys6-Pro-Leu-Gly-NH₂*) che presenta un ponte disolfuro tra la cisteina 1 e 6 e si differenzia dal suo omologo, la vasopressina (ormone antidiuretico), per soli 2 amminoacidi in posizione 3 e 8 (Figura 6). I geni che codificano per l'ossitocina e la vasopressina sono considerati geni ancestrali, infatti si sono ben conservati durante l'evoluzione e sono stati trovati in diverse specie animali, dagli invertebrati ai mammiferi (Caldwell e Young, 2006; Donaldson e Young, 2008; Grinevich et al, 2016; Calcagnoli et al, 2014).

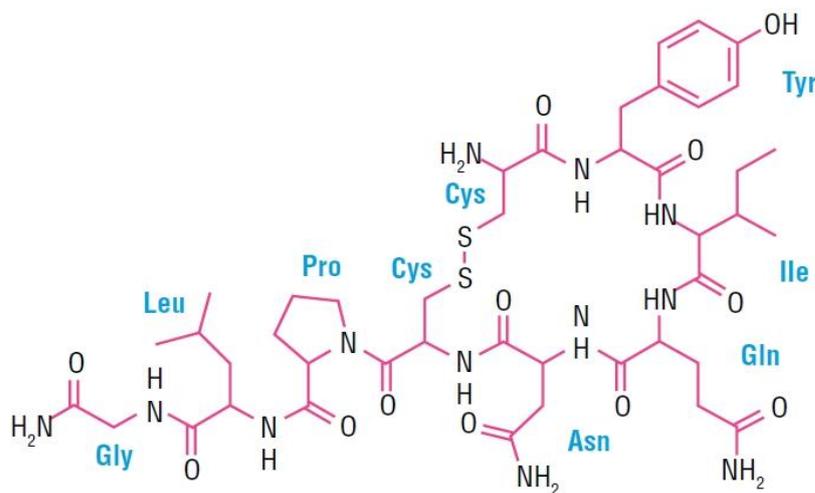


Figura 5. Formula di struttura dell'ossitocina

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. Cinquant'anni dopo questa scoperta, l'ossitocina venne per la prima volta isolata, sequenziata

e sintetizzata da Vincent du Vigneaud (du Vigneaud *et al.*, 1953, 1954), a cui fu dato il premio Nobel 2 anni dopo.

Sintetizzata maggiormente nei corpi cellulari dei neuroni magno cellulari e parvocellulari dei nuclei sopraottici e paraventricolari dell'ipotalamo, l'ossitocina viene trasportata nell'ipofisi posteriore da cui viene poi liberata nel circolo sanguigno per svolgere le sue funzioni ormonali periferiche. Inoltre, numerosi studi mostrano la presenza di neuroni ossitocinergici anche in alcune aree che circondano il nucleo paraventricolare, quali la regione periventricolare dell'ipotalamo, l'area preottica mediale, il nucleo del letto della stria terminale (BNST) e il nucleo subcommissurale laterale (Jirikowski *et al.*, 1988; Mercier *et al.*, 1987; Argiolas e Gessa, 1991). Nelle regioni extraipotalamiche cerebrali l'ossitocina ha il ruolo di neurotrasmettitore/neurormone, infatti si trova localizzata all'interno di vescicole sinaptiche da cui viene rilasciata tramite un meccanismo Ca^{2+} -dipendente in seguito a stimoli fisiologici o farmacologici. Studi neuroanatomici e immunocitochimici mostrano che il nucleo paraventricolare contiene 2 tipologie di neuroni ossitocinergici, i neuroni magnocellulari che come descritto sopra, proiettano alla neuroipofisi da cui l'ormone viene poi rilasciato nel circolo sanguigno, e i neuroni parvocellulari che inviano invece proiezioni in aree extraipotalamiche, come l'area tegmentale ventrale, l'ippocampo, l'amigdala, il BNST e il midollo spinale. Inoltre, è nota la presenza di ossitocina anche in diversi tessuti periferici quali cuore, midollare del surrene, timo, pancreas, adipociti, placenta, ovaio, cellule interstiziali di Leydig del testicolo, dove esercita un ampio spettro di effetti agendo sia come ormone che come neurotrasmettitore. Infatti, durante il parto, i livelli di mRNA dell'ossitocina nell'utero di ratto aumentano enormemente e questo potrebbe essere dovuto ad un rilascio paracrino di ossitocina (vedi Insel *et al.*, 1997). 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 nel sangue 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).

Inizialmente l'ossitocina era conosciuta soprattutto per il suo ruolo ormonale, a livello periferico, nella contrazione della muscolatura liscia uterina durante il parto e delle cellule mioepiteliali durante l'allattamento, ma la presenza delle proiezioni ossitocinergiche nelle diverse aree cerebrali ha portato gli studiosi a indagare il ruolo dell'ossitocina nel sistema nervoso centrale nelle suddette aree (Argiolas e Gessa, 1991; Insel e Shapiro, 1992; Love, 2014), dove risulta essere coinvolta nella regolazione di diverse funzioni legate (i) alla sfera

sociale quali i legami di coppia, il comportamento materno, ansia, aggressività e il comportamento sessuale (Argiolas e Melis, 2004, 2005, 2013; Pedersen et al., 1992, 1997; Insel et al., 1997; Giovenardi et al., 1998), (ii) alla sfera cognitiva, quali memoria e apprendimento, e (iii) alla sfera non sociale, quali la assunzione di cibo, 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 e Gessa, 1991; Petersson, 2002; Yang et al., 2013), sia nel ratto che nell'uomo. Inoltre, vista l'esistenza di una interazione tra sistema ossitocinergico e sistema dopaminergico, non è da escludere un coinvolgimento dell'ossitocina anche in diversi disturbi psichiatrici come autismo, depressione maggiore, dipendenza da sostanze d'abuso e anoressia/bulimia (Parker et al., 2017; Guastella and Hickie, 2016; Lien et al., 2017; Monteleone et al., 2015; Baskerville e Douglas, 2010).

1.4 I recettori ossitocinergici

Sia a livello centrale che a livello periferico, l'ossitocina svolge la sua azione attraverso il legame con i recettori ossitocinergici (OXTR) di tipo uterino, che sono costituiti da una catena polipeptidica di 388 amminoacidi nel ratto e 389 amminoacidi nell'uomo e appartengono alla super-famiglia dei recettori accoppiati a proteina G (GPCR) con 7 domini transmembrana, 3 intracellulari e 3 extracellulari (vedi Caldwell et al., 2008). Tale recettore può essere accoppiato a diverse forme della proteina G che attivano diverse vie intracellulari probabilmente dipendenti dalla differente espressione, centrale o periferica, del recettore. A livello centrale, il legame dell'ossitocina con il suo recettore, porta all'attivazione della fosfolipasi C che scinde il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato in inositolo 1,4,5-fosfato e diacilglicerolo, due secondi messaggeri che regolano il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico (Caldwell et al., 2008).

La distribuzione e la regolazione dei recettori ossitocinergici nel cervello è stata ampiamente studiata nel ratto tramite l'utilizzo dell'autoradiografia, inizialmente utilizzando [3H]ossitocina e successivamente l'antagonista selettivo iodinato, la (d(CH₂)₅-[Tyr(Me)², Tyr-NH₂]⁹Orn⁸VT). Tramite questi studi è stata descritta la presenza dei recettori ossitocinergici in diverse aree cerebrali, quali il nucleo olfattorio, l'amigdala, il nucleo ventromediale dell'ipotalamo, il subicolo e il BNST (Figura 6). L'espressione di tali recettori varia da specie a specie e può essere regolata da diversi fattori, tra cui gli ormoni steroidei (estrogeno, progesterone e testosterone), ma anche da citochine pro-infiammatorie quali l'interleuchina-6

e l'interleuchina-1 (Insel et al., 1997; Kimura et al., 2003). Infatti nelle regioni ricche di recettori ossitocinergici è stata riscontrata un'elevata concentrazione di recettori per gli estrogeni (Pfaff e Keiner, 1973).

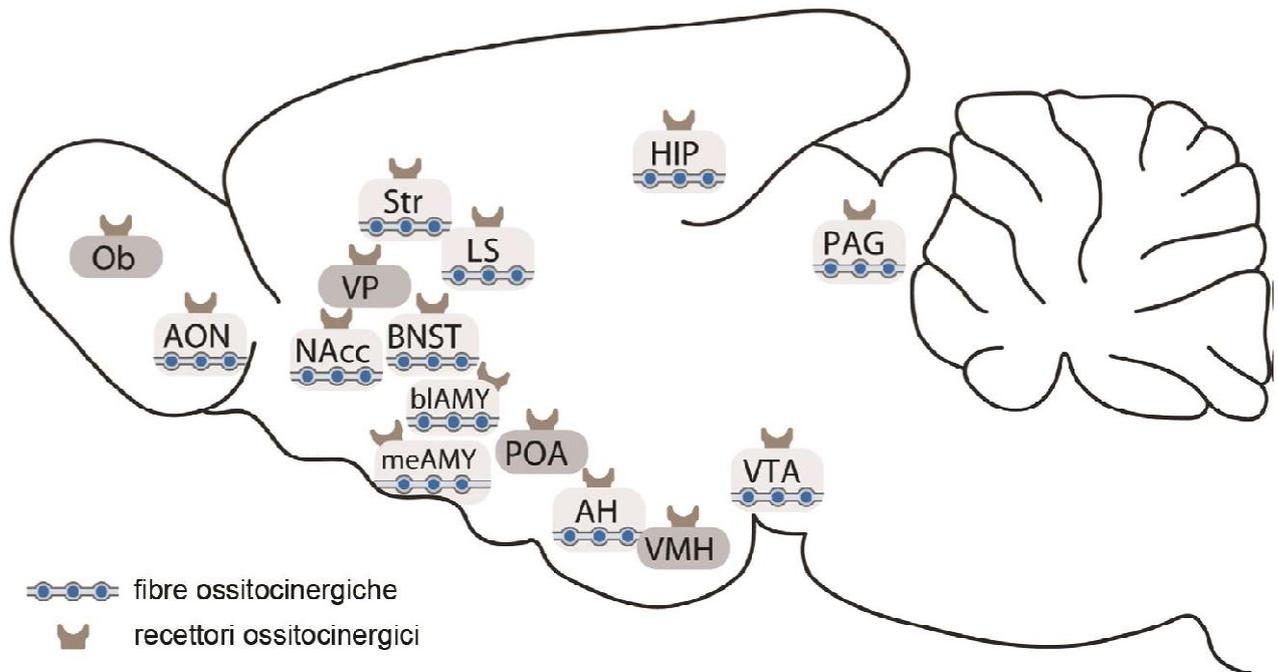


Figura 6. Distribuzione dei recettori e delle fibre ossitocinergiche nell'encefalo di ratto

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).

1.5 Nucleo del letto della stria terminale (BNST)

Il BNST, dall'inglese *bed nucleus of the stria terminalis*, è una struttura limbica complessa ed eterogenea, che gioca un ruolo importante nella risposta autonoma, neuroendocrina e comportamentale (Forsay e Gysling, 2004; Crestani et al., 2013; Lebow e Chen, 2016; Kash et al., 2015). Venne descritto inizialmente nel 1923 da Johnston come una struttura di materia grigia che circonda la stria terminale da cui si estende rostralmente e caudalmente. La regione caudale descritta da Johnston è ora descritta come parte dell'amigdala, mentre la regione rostrale è definita ora nucleo del letto della stria terminale.

Questa struttura si trova in posizione ventrale rispetto al setto laterale e dorsale rispetto all'area preottica dell'ipotalamo circondando la commessura anteriore. Il fatto che il BNST

formi un continuum con l'amigdala ha portato Heimer e colleghi a considerare tale struttura come parte della così detta "amigdala estesa", un insieme di regioni spesso riportate come una singola entità, basata sul fatto che ontogenesi, citoarchitettura, chemorecettori e connessioni strutturali sono simili (Alheid e Heimer, 1988; Heimer e Alheid, 1991). Nei roditori il BNST è costituito da 18 subregioni, ma viene primariamente suddiviso nella divisione anteriore e in quella posteriore (Bota et al., 2012; Ju e Swansons, 1989).

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sulla divisione anteriore del BNST che viene ulteriormente suddivisa in area anterodorsale, anterolaterale e anteroventrale (Ju e Swansons, 1989). La porzione anteriore del BNST è ampiamente e reciprocamente connessa con altre strutture limbiche (per esempio i nuclei centrali e mediali dell'amigdala, l'area preottica mediale e ventromediale dell'ipotalamo) mentre la porzione anterolaterale e mediale sono connesse con il nucleo centrale dell'amigdala, il nucleo del tratto solitario, la sostanza grigia periacqueduttale, l'area tegmentale ventrale, la zona periventricolare dell'ipotalamo e i suoi nuclei (per esempio, nuclei paraventricolare, dorsolaterale e dorsomediale) (Cullinan et al., 1993, Dong et al., 2001, 2006a,b,c). Il BNST riceve inoltre proiezioni dalla corteccia prefrontale mediale (principalmente quella infralimbica) (Jalabert et al., 2009). Queste connessioni hanno portato a considerare il BNST come la chiave che collega le strutture limbiche mesencefaliche con l'ipotalamo e le regioni del tronco dell'encefalo coinvolte nelle funzioni autonome e neuroendocrine così come nelle diverse risposte comportamentali, dal comportamento ingestivo al comportamento sociale e sessuale, nei processi di ricompensa fino alle risposte adattative allo stress, paura, risposta agli stimoli nocivi e abuso di sostanze negli animali da laboratorio (Carboni et al., 2000; Dong e Swanson, 2003, 2004, 2006a,b,c; Radley e Sawchenko, 2011; Petrusis, 2013, Crestani et al., 2013, Stamatakis et al., 2014; Maejima et al., 2015) e persino nei disturbi psichiatrici nell'uomo (Lebow e Chen, 2016). Il controllo delle attività fisiologiche e comportamentali esercitato dal BNST è mediato dall'azione locale di numerosi neurotrasmettitori e neuropeptidi presenti in tale nucleo. Tra questi sono inclusi GABA, acido glutamico, noradrenalina, dopamina, serotonina, NO, corticotropin-releasing factor (CRF) e ossitocina (Crestani et al., 2013, Forray e Gysling, 2004, Hott et al., 2017, Daniel e Rainnie, 2016).

E' stata infatti rilevata la presenza di terminazioni glutamatergiche all'interno del BNST provenienti soprattutto dal subicolo ventrale dell'ippocampo e dalla regione infralimbica della corteccia prefrontale mediale (mPFC) (Walaas et al., 1979; Cullinan et al., 1993). Inoltre, numerosi studi neuroanatomici mostrano come la maggior componente neuronale del BNST sia di tipo GABAergico (90%) (Sun et al., 1993), mostrando la presenza sia di proiezioni

afferenti provenienti soprattutto dalla amigdala centrale e mediale, sia di proiezioni efferenti di ritorno dirette all'area tegmentale ventrale, al subnucleo ventrale e all'amigdala e infine di interneuroni GABAergici intrinseci al BNST (Dong et al., 2001). La componente maggiore delle afferenze al BNST invece è di tipo noradrenergico (Phelix et al., 1992), infatti il BNST risulta essere uno dei target con maggior innervazione noradrenergica. Studi di elettrofisiologia mostrano che tali afferenze esercitano un ruolo inibitorio sull'attività dei neuroni del BNST. Infatti, è stato dimostrato che i neuroni noradrenergici localizzati nel locus coeruleus e nel tronco encefalico presentano un'attività spontanea, suggerendo che probabilmente esiste un rilascio tonico di noradrenalina all'interno del BNST che regolerebbe l'output neuronale del BNST stesso (Forsay e Gysling e referenze ivi incluse).

La noradrenalina rilasciata nel BNST, proveniente soprattutto dal nucleo del tratto solitario e dal gruppo cellulare A1 localizzato nel tronco encefalico, facilita la risposta allo stress attraverso una "up-regulation" dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Park et al., 2015; Forsay e Gysling, 2004). Inoltre è stato osservato che sono presenti terminazioni noradrenergiche che fanno sinapsi con i dendriti di neuroni contenenti CRF e una parte di tali neuroni invia proiezione al nucleo paraventricolare (Phelix et al., 1994). È stata infatti riportata la presenza di fibre CRFergiche e di recettori del tipo CRF-1 e CRF-2 all'interno del BNST, coinvolte probabilmente nelle risposte comportamentali agli stimoli avversi e allo stress. Infatti, il BNST esercita un ruolo fondamentale nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene durante la risposta allo stress (Walker et al., 2009; Cadeddu et al., 2014).

Tra le catecolamine svolge un'importante funzione anche una componente dopaminergica presente nel BNST, che risulta essere implicata nella regolazione di diverse funzioni. Per esempio, è stato riportato che il nucleo ovale del BNST è densamente innervato da fibre dopaminergiche che provengono dall'area tegmentale ventrale, e tali innervazioni sono implicate nel controllo del comportamento di auto-somministrazione di sostanze d'abuso come la cocaina, ma anche nell'assunzione di etanolo nei ratti dipendenti da questa sostanza (Phelix et al., 1992; Scibilia et al., 1992; Freedman e Cassell, 1994; Hasue e Shammah-Lagnado, 2002; Meloni et al., 2006; Krawczyk et al., 2011). Infatti, è stato dimostrato che microiniezioni di SCH-23390, un antagonista dei recettori dopaminergici D1, riduce l'assunzione di etanolo e cocaina in ratti dipendenti, a dispetto del fatto che in alcuni studi sia stata riscontrata una scarsa presenza di recettori dopaminergici D1 nel BNST (Krawczyk et al., 2013).

Inoltre, il fatto che il BNST faccia parte del sistema limbico e sia coinvolto nella regolazione delle emozioni e dei comportamenti motivati, e che la dopamina sia coinvolta nella

motivazione e nell'anedonia, potrebbero far supporre che il BNST possa essere coinvolto anche in patologie psichiatriche come la depressione (Alheid et al. 1998). Come mostrato di recente (Cadeddu et al., 2014), la somministrazione in acuto per via sistemica di farmaci antidepressivi, induce un aumento della concentrazione extracellulare di noradrenalina e dopamina nel dializzato del BNST.

Per quanto riguarda i neuropeptidi, l'ossitocina e i suoi recettori risultano ampiamente distribuiti all'interno del BNST, e la loro presenza sembra essere coinvolta nella regolazione di diverse risposte comportamentali soprattutto relative ai legami sociali e alla cura della prole (Insel, 1992). Infatti, uno studio sulle arvicole di prateria ha rilevato un aumento dell'espressione dei recettori ossitocinergici negli animali che intraprendevano legami monogami rispetto a quelli poligami (Insel e Shapiro, 1992). Inoltre, durante la cura della prole è stato verificato un aumento del rilascio di ossitocina all'interno del BNST, il che conferma quindi il ruolo fondamentale di questo neuropeptide nei legami sociali e nel comportamento materno. È interessante notare come il rilascio di ossitocina nel BNST sia anche coinvolto in comportamenti anti-sociali come l'aggressività. Nello studio condotto da Calcagnoli e colleghi (2014) è stato infatti dimostrato come nei ratti maschi eccessivamente aggressivi vi è un aumento dell'espressione dei recettori ossitocinergici. Questi studi dimostrano quindi che l'ossitocina all'interno del BNST funziona come neuromodulatore nell'attivazione delle diverse popolazioni neuronali all'interno del BNST, partecipando in diverse risposte comportamentali.

La presenza dell'ossitocina e dei recettori ossitocinergici nel BNST (Sawchensko et al., 1984, Wilson et al., 2005, Calcagnoli et al., 2014; Dumais et al., 2016) e il fatto che i neuroni ossitocinergici nel cervello originano dal nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e regioni periventricolari circostanti (Sawchensko e Swanson, 1983) assieme al ruolo ben conosciuto dell'ossitocina sull'erezione peniena e comportamento sessuale (vedi Argiolas e Melis, 2004, 2005, 2013; Gil et al., 2011, 2013), suggeriscono un probabile coinvolgimento dell'ossitocina paraventricolare nel BNST negli effetti sessuali che si verificano in seguito a stimolazione o lesione del BNST. A tale riguardo; uno studio eseguito mediante l'utilizzo di Fluoro-gold (un tracciante neuronale retrogrado) ha mostrato che sono presenti delle vie di proiezione dall'area preottica mediale al BNST dove vi è anche un aumento dell'espressione del *c-fos* (marcatore di attività neuronale) durante il comportamento sessuale nel ratto, avvalorando l'ipotesi che il BNST sia coinvolto nella regolazione del comportamento sessuale (Majeima et al., 2015; Coolen et al., 1996, 1998). Inoltre, un altro studio ha mostrato che la stimolazione elettrica del BNST induce erezione peniena sia nei ratti non anestetizzati che nei ratti

anestetizzati, anche se in misura minore (Iwasaki et al., 2010), mentre lesioni chimiche citotossiche o con radiofrequenze sono in grado di indurre una marcata riduzione nelle erezioni senza contatto, che si possono osservare nei ratti maschi esposti a una femmina recettiva ma inaccessibile (Liu et al., 1997a,b). Tuttavia, le lesioni sopra descritte hanno un effetto minore sulle erezioni riflesse (indotte dalla stimolazione locale del pene) e in alcuni aspetti del comportamento copulatorio (Valcourt e Sachs, 1979; Liu et al., 1997a,b).

1.6 Microdialisi intracerebrale

Fino agli anni 60-70 gli studi di neurochimica potevano essere effettuati esclusivamente su tessuti post-mortem, ma con l'avvento della microdialisi è ora possibile il campionamento in vivo dei diversi neurotrasmettitori cerebrali e dei loro metaboliti in animali svegli e liberi di muoversi (*freely moving*). Questa procedura sperimentale è risultata essere di fondamentale importanza nel campo delle Neuroscienze. Infatti, questa metodica permette di studiare, tra gli altri, le variazioni dell'attività di un dato neurotrasmettitore in condizioni fisiologiche e farmacologiche, per esempio durante il verificarsi di uno specifico comportamento, o in seguito alla somministrazione di un farmaco sia per via sistemica, ma anche direttamente nell'area di interesse, verificandone sia gli effetti locali che comportamentali.

La microdialisi si realizza attraverso l'utilizzo di fibre da microdialisi (*probes*), costituite da una membrana semipermeabile caratterizzata da un *cut-off* specifico, che permette il passaggio di molecole di piccole dimensioni (come i neurotrasmettitori) secondo gradiente di concentrazione, quindi dallo spazio extracellulare all'interno della membrana che viene costantemente perfusa con un liquido cerebrospinale artificiale (tipicamente una soluzione Ringer) per mezzo di una pompa a un flusso costante (Figura 7).

Tramite questa tecnica è possibile raccogliere campioni di dializzato ad intervalli di tempo regolari, per periodi anche molto lunghi o relativamente brevi e quindi mettere in relazione le concentrazioni extracellulari delle sostanze oggetto di studio (per esempio neurotrasmettitori) con particolari variabili sperimentali, sia di tipo farmacologico che comportamentale (Di Chiara et al., 1996).

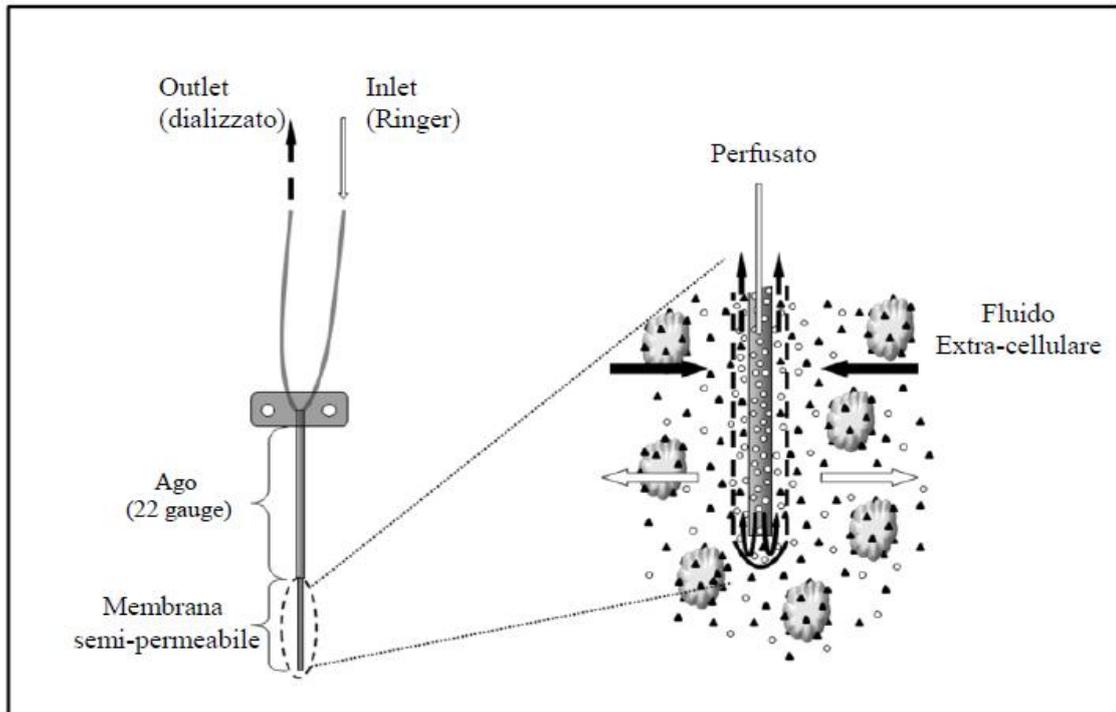


Figura 7. Rappresentazione schematica di una fibra da dialisi a U.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Alla luce delle evidenze sopra descritte, in questo lavoro di tesi ho studiato il ruolo dell'ossitocina iniettata nel BNST allo scopo di verificare il coinvolgimento di tale nucleo nel complesso circuito che controlla la funzione erettile e il comportamento sessuale e, eventualmente, dello sbadiglio. A tal fine sono state effettuate quindi delle manipolazioni farmacologiche mediante l'utilizzo diretto di ossitocina da sola o in combinazione con antagonisti dei principali sistemi neurotrasmettitoriali presenti in quest'area (vedi sopra) allo scopo di studiarne l'interazione con l'ossitocina nella regolazione della funzione erettile e dello sbadiglio. Successivamente, ad ulteriore conferma dei risultati comportamentali ottenuti dagli studi con le microiniezioni, sono stati effettuati ulteriori studi comportamentali abbinando a questi la tecnica della microdialisi/microiniezione nella stessa area per determinare se gli effetti dell'ossitocina sull'erezione peniena e sullo sbadiglio fossero correlati a modificazioni nelle concentrazioni di acido glutamico e di ioni NO_2^- (un indicatore della produzione di NO nei liquidi biologici privi di sangue) nel BNST. I risultati ottenuti suggeriscono che l'ossitocina iniettata nel BNST induce erezione peniena e sbadiglio attivando in particolare la trasmissione glutamatergica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati ratti maschi Sprague Dawley (250-300g) (Envigo, S.Pietro Natisone, Italia). Gli animali sono stati stabulati in gabbie da 4 animali ciascuna in condizioni di temperatura (24°C) e umidità (60%) controllata, ciclo luce/buio dalle 08:00 alle 20:00 e con acqua e cibo *ad libitum*. Prima dell'inizio degli esperimenti i ratti sono stati manipolati per circa una settimana. Gli esperimenti sono stati eseguiti tra le 10:00 e le 14:00 e in accordo con le linee guida delle Direttive della Comunità Europea del 22 settembre 2010 (2010/63/EU) e con la Legislazione Italiana (D.L. 4 Marzo 2014, n. 26), e approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione animale dell'Università di Cagliari.

3.2 Farmaci e peptidi

Ossitocina, arg⁸-vasopressina, aloperidolo, SCH-23390 (R(+)-7-Cloro-8-idrossi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetraidro-1H-3-benzazepina hydrochloride), SMTC (S-metil-L-tio-citrullina acetato), faclofen, bicucullina methochloride, CP 376395 hydrochloride [N-(1-etilpropil)-3,6-dimetil-2-(2,4,6-trimetilfenossi)-4-piridinamina hydrochloride], e astressina 2B (Ac-Asp-Leu-Ser-Phe-His- α -metil-Leu-Leu-Arg-Lys-Nle-Ile-Glu-Ile-Glu-Lys-Gln-Glu-Lys-Glu-Lys-Gln-Gln-Ala-cyclo(Glu-Asn-Asn- ϵ Lys)-Leu-Leu-Leu-Asp- α -metil-Leu-Ile-NH₂) sale trifluoroacetato sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (S. Louis, MO, USA); (+)-MK-801 [(5R,10S)-(+)-5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo-[a,d]ciclo-epten-5,10-imina idrogeno maleato] e 6-ciano-7-nitroquinossalina-2,3-dione sale disodico (CNQX) dalla Research Biochemicals International (Natick, MA, USA); d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina dalla Bachem AG (Bubendorf, CH). Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati da fonti commerciali.

3.3 Microiniezioni

Al fine di eseguire le microiniezioni nel BNST è stata impiantata unilateralmente una cannula guida (22 gauge) (PlasticOne, Roanoke, VA, USA) nel cranio del ratto (coordinate: antero/posteriorità: da 0.0 mm a -0.4 mm, lateralità: 1.4 mm dal bregma e ventralità: 2.0 mm dalla teca cranica) (Paxinos e Watson, 2004) utilizzando la chirurgia stereotassica (Stoelting

Co., Wood Dale, IL, USA) sotto anestesia con isoflurano (1.5-2%) (Vetfluarane (100mg/g), Virbac). Al termine dell'operazione gli animali sono stati trattati con un antibiotico (Baytril (25 mg/ml), Bayer) e un antiinfiammatorio (Orudis fiale, 2mg/ml, Sanofi Aventis) per via sottocutanea al fine di limitare il rischio di infezioni e infiammazioni post-operatorie. Successivamente alla chirurgia ai ratti sono stati dati 5 giorni di recupero. Per effettuare le microiniezioni è stata utilizzata una cannula da microiniezione (28 gauge) che fuoriusciva per 6 mm dall'estremità interna della cannula guida, e collegata con un tubicino in polietilene a una siringa Hamilton da 10 µL. La siringa è stata a sua volta collegata a una pompa da microinfusione CMA/100 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) che consente la somministrazione delle sostanze (peptidi e/o farmaci) secondo parametri precedentemente impostati dall'operatore (in questo caso: un flusso di 0.2 µl/min e sostanze disciolte in un volume di 0.3 – 0.5 µl). L'ossitocina e gli antagonisti $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$, SCH-23390, SMTc, (+)-MK-801, CNQX, bicucullina, faclofen, CP 376395 e astressina 2B sono stati discolti e diluiti in soluzione salina mentre l'aloiperidolo è stato disciolto utilizzando acido acetico e diluito in acqua bidistillata e successivamente portato a un pH di 4.5-5.0 utilizzando NaOH 1 M.

Il giorno dell'esperimento i ratti sono stati posizionati singolarmente in gabbie di Plexiglas (45 x 30 x 30 cm) 30 minuti prima dell'inizio del test (fase di adattamento). Durante gli esperimenti effettuati per determinare la curva dose/risposta dell'ossitocina, ai ratti è stata somministrata nel BNST o l'ossitocina alle diverse concentrazioni o il veicolo (soluzione salina) tramite la cannula da microiniezione. Quando invece sono stati effettuati gli esperimenti con gli antagonisti ($d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$, l'S-metil-tio-L-citrullina, l'aloiperidolo, l'SCH-23390, l'(+)-MK-801), questi sono stati iniettati nel BNST 15-20 minuti prima della somministrazione dell'ossitocina. È stata utilizzata la stessa procedura anche per l'NMDA. La cannula è stata rimossa dal sito di iniezione dopo 30 secondi dall'avvenuta iniezione per consentire una diffusione ottimale del farmaco. Dopo il trattamento con ossitocina o NMDA i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. L'erezione, solitamente accompagnata da grooming genitale e flessione delle anche, è stata registrata ogni volta che il pene emergeva dalla guaina peniena. Gli sbadigli sono stati registrati (con o senza stretching) quando i ratti mantenevano la bocca aperta per almeno 1-2 secondi.

3.4 Microiniezioni e microdialisi

Per eseguire sia le microiniezioni che la microdialisi nello stesso ratto, sono state utilizzate delle cannule da dialisi verticali a forma di U realizzate in laboratorio e costituite sia da una porzione dializzante che da una porzione che permette la microiniezione delle sostanze. Per la realizzazione di queste cannule, due tubicini in silice capillare fusa sono stati inseriti in una membrana dializzante semipermeabile in copolimero di acrilonitrile - sodio metallil sulfonato (AN69 HF, con valore di cut-off *in vivo* compreso tra 35 e 40 kDa; Hospal, Bologna, Italia) della lunghezza di circa 4 mm e con finestra di dialisi attiva di circa 2 mm di lunghezza, precedentemente chiusa ad un'estremità con colla epossidica resistente all'acqua. L'estremità libera di ciascuno dei due tubicini in silice capillare fusa è stata quindi inserita all'interno di due supporti tubolari in metallo ottenuti a partire da un ago da iniezione in acciaio inossidabile del diametro di 22 G. I tubicini in silice capillare fusa sono stati quindi incollati al supporto in metallo con la colla epossidica. La sonda da microdialisi è stata poi incollata, con la medesima colla epossidica, ad una cannula da microiniezione realizzata con un tubicino in silice capillare fusa la cui estremità inferiore terminava strettamente adiacente alla membrana da dialisi, 1 mm sopra il livello del margine inferiore della finestra da dialisi. L'intera struttura è stata infine stabilizzata con dell'acciaio liquido (Melis et al., 1996, 1998). La cannula da dialisi è stata perfusa con soluzione Ringer contenente da 147mM NaCl, 3mM KCl e 1.2mM CaCl₂, pH 6.5, a un flusso costante di 2.5 µL/minuto tramite l'utilizzo di una pompa da microinfusione Stoelting 200 (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Dopo un periodo di un ora di perfusione per equilibrare il perfusato con il liquido extracellulare, sono state raccolte 4 aliquote di 37.5 µL ciascuna ogni 15 minuti mediante l'utilizzo di tubicini in polietilene. Dopo la raccolta delle 4 aliquote nelle condizioni basali sono state iniettate l'ossitocina o la salina tramite la cannula da microiniezione nel BNST in un volume di 0.3 µL in 2 minuti. Negli animali che hanno ricevuto la d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina quest'ultima è stata disciolta in soluzione salina e iniettata in volume di 0.3 µL in 2 minuti 15 minuti prima dell'iniezione dell'ossitocina. I ratti sono stati poi osservati per 60 minuti dopo il trattamento e sono state raccolte altre 4 aliquote di 37.5 µL ciascuna ogni 15 minuti. Durante questo periodo sono stati osservati e registrati gli episodi di erezione e gli sbadigli.

3.5 Determinazione della concentrazione di acido glutamico nel dializzato del BNST

Per la misurazione della concentrazione di acido glutamico nel BNST, i campioni sono stati preparati utilizzando 5 μL di dializzato e aggiungendo 5 μL di HClO_4 30 mM dopo derivatizzazione pre-colonna con ortoftalaldeide e 2-mercaptoetanol, mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). L'HPLC era equipaggiato con una colonna Supelco C18 (dimensione delle particelle di 5 μm) di 15 x 0.4 cm accoppiato a un rilevatore spettrometrico a fluorescenza (lunghezza d'onda di eccitazione: 340 nm; Lunghezza d'onda di emissione: 450 nm; Spettrofluorimetro SFM 25, Kontron, Milano, Italia), mediante l'utilizzo di un iniettore automatico. La fase mobile era costituita da tampone fosfato 0.1 M a pH 6.2 contenente metanolo al 30% v/v a un flusso di 1 mL/minuto. La sensibilità del metodo era di 10 nM.

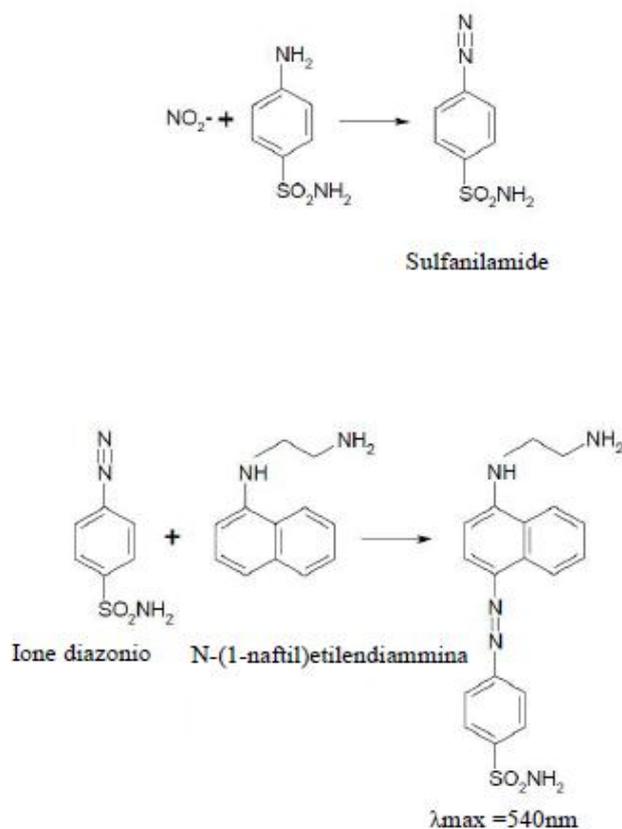


Figura 8: Reazione di Griess.

3.6 Determinazione della concentrazione degli ioni NO_2^- nel dializzato del BNST

La produzione di NO da parte della NOS è stata determinata misurando la concentrazione degli ioni nitrito (NO_2^-) nel dializzato del BNST tramite una modificazione della reazione di Griess (vedi Melis et al, 1996). L'NO ha infatti una breve emivita (1-2 secondi) e reagendo immediatamente con l'ossigeno presente nei liquidi biologici senza sangue si trasforma in ioni NO_2^- . In breve, gli ioni NO_2^- presenti nel dializzato sono stati usati per la diazotazione della sulfanilammide e la successiva reazione di copulazione con l' N-(1-naftil)-etilen-diammina (reattivo di Griess) (Figura 8). A 25 μL di dializzato per ogni campione sono stati aggiunti 25 μL di una soluzione tampone al 0.3% di NH_4Cl contenente 0.07% di EDTA a pH 8.0-8.5 (Carrier Solution) e 50 μL di una Reagent Solution contenente 0.1% di sulfanilammide, 0.01% di N-(1-naftil)-etilen-diammina e 1% di HCl. I campioni sono stati vortexati per circa 5 secondi ciascuno e messi in incubazione in un bagno termostato a 60 °C per 30 minuti. La curva standard di calibrazione è stata preparata utilizzando una soluzione di NaNO_2 a concentrazioni note (da 0.1 a 30 μM) per ogni determinazione.

Il colorante azoico formatosi è stato poi analizzato tramite HPLC attraverso l'impiego di un HPLC Waters 1525 (Binary HPLC Pump) accoppiato ad un detector con lampada a lunghezza d'onda variabile Waters 2487 (Dual λ Absorbance Detector) impostato per registrare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 546 nm, ed equipaggiato con una colonna UltrasphereTM Reverse Phase C18, 15 x 4.6 cm, grandezza delle particelle 5 μm (Beckman, Milano, Italia). Il campione è stato eluito isocraticamente a temperatura ambiente con una fase mobile costituita da una soluzione acquosa contenente acido trifluoroacetico (0.01%) e acetonitrile (13%), a flusso costante di 1 ml/min. L'analisi quantitativa dei risultati è stata eseguita attraverso l'utilizzo del software Breeze (Waters SpA, Milano, Italia). La sensibilità del saggio è di 0.1 μM e la risposta è lineare per concentrazioni di NO_2^- fino a 25 μM .

3.7 Verifiche istologiche

Per identificare il sito di iniezione, alla fine degli esperimenti i ratti sono stati iniettati nel BNST con il blu di metilene e dopo circa 5 minuti sono stati anestetizzati con idrato di cloralio e decapitati, il cervello è stato immediatamente rimosso e messo in una soluzione di paraformaldeide al 4% per circa 12-15 giorni. Sono state poi effettuate delle sezioni coronali

di 40 μm al criostato e posizionate su vetrino. I vetrini sono stati poi colorati con Rosso Neutro e osservati al microscopio a contrasto di fase per verificare se il sito di iniezione era corretto. Solo i ratti che presentavano la traccia dell'estremità della cannula da microiniezione (nei ratti con la cannula guida) e sia la traccia della cannula da dialisi e la traccia della cannula da microiniezione (nei ratti con la cannula da microiniezione/microdialisi) nel BNST sono stati utilizzati per l'analisi statistica dei risultati (Figura 9).

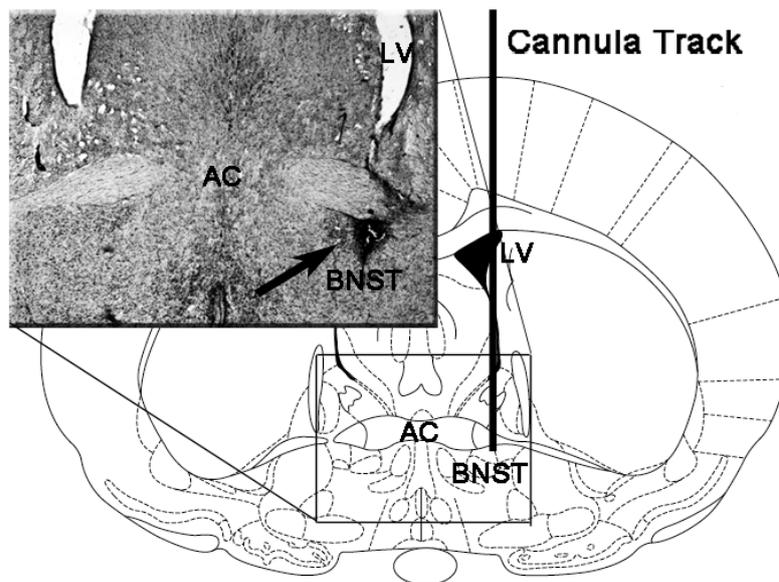


Figura 9: Rappresentazione schematica di una sezione coronale dell'encefalo di ratto che mostra l'estremità della cannula da microiniezione nel BNST (Paxinos e Watson, 2004). Abbreviazioni: AC = commessura anteriore; LV = ventricolo laterale.

3.8 Statistica

L'analisi statistica dei risultati ottenuti negli esperimenti nei quali sono state eseguite le microiniezioni è stata effettuata tramite l'ANOVA ad una via seguita dal test di Bonferroni per le comparazioni *post hoc* per gruppi appaiati al fine di rilevare le singole fonti di significatività. L'analisi statistica dei risultati ottenuti attraverso gli esperimenti di microdialisi è stata effettuata attraverso l'ANOVA a due vie per verificare le differenze tra i gruppi sia in funzione del tempo che del trattamento, seguita da confronti multipli con il test di Bonferroni. Inoltre, in questo caso, sono state anche calcolate per ciascun animale le aree

sotto la curva (AUC) in funzione del tempo, sia per l'analisi comportamentale che per la neurochimica. Prima di effettuare le analisi ANOVA sui valori AUC è stata verificata l'omogeneità dei dati attraverso l'analisi delle varianze mediante il test di Bartlett. Quando l'analisi delle varianze mostrava differenze significative tra i vari gruppi è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis, seguito da comparazioni multiple con test di Dunn, in caso contrario è stata effettuata l'ANOVA a una via seguita dal test di Tukey.

Infine, per permettere la comparazione diretta dei dati ottenuti in questi studi con dati ottenuti in studi simili ma eseguiti con metodologie diverse, sono state eseguite su tutti gli insiemi di dati delle analisi statistiche aggiuntive: per quanto riguarda i fattori generali considerati dall'ANOVA sono stati riportati per ogni fattore e per la loro interazione i valori di η^2 (quantità di varianza spiegata dal fattore o dall'interazione dei fattori). Al fine di facilitare la lettura questi valori sono stati trasformati in percentuale considerando 100 il totale della varianza. In aggiunta sono state eseguite su tutti i contrasti *post hoc* che hanno dato esito significativo i calcoli per ottenere la *d* di Cohen utilizzata come stimatore della grandezza dell'effetto.

In tutti i casi, i dati sono stati considerati significativi con $P < 0.05$ (GraphPad, versione 5.00, San Diego, Ca, USA).

4. RISULTATI

4.1 Effetto dell'iniezione di ossitocina nel BNST sull'erezione peniena e lo sbadiglio: curve dose-risposta e confronto con l'arg⁸-vasopressina.

Poiché non sono state rilevate differenze significative nell'erezione peniena e nello sbadiglio nelle curve dose-risposta ottenute utilizzando le coordinate di anteroposteriorità comprese tra 0.0 e -0.4 mm dal bregma in seguito a microiniezioni di ossitocina nel BNST (vedi figura 10), i dati relativi alle erezioni peniene e allo sbadiglio provenienti dai diversi siti di iniezione sono stati messi insieme per la rappresentazione grafica e le analisi statistiche delle curve dose-risposta.

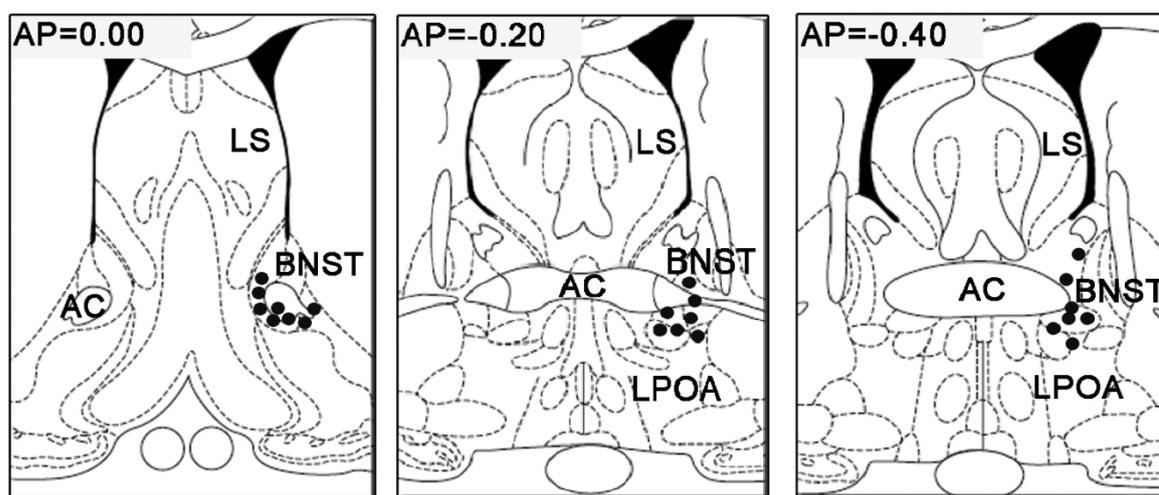


Figura 10. Rappresentazione schematica delle 3 sezioni coronali del cervello di ratto (da bregma 0.0 a bregma -0.4) che rappresentano la distribuzione dei siti di iniezione nei quali l'ossitocina ha stimolato erezioni peniene e sbadigli in questo studio. (Abbreviazioni: BNST = nucleo del letto della stria terminale; LS = setto laterale, AC = commessura anteriore; LPOA = area preottica laterale).

Come mostrato nella Figura 11, l'ossitocina (5-100 ng), ma non la vasopressina (100 ng), induce erezione peniena e sbadiglio in modo dose-dipendente quando iniettata unilateralmente nel BNST in un volume di 0.3 μ L. Le risposte comportamentali compaiono usualmente 15 minuti circa dopo il trattamento e sono presenti per circa un ora.

Infatti l'analisi dei risultati con le ANOVA a una via, ha rilevato differenze significative del trattamento [$F(6,84) = 19.27, P < 0.001, R^2 = 57.9$, e $F(6,84) = 18.10, P < 0.001, R^2 = 56.3$ per l'erezione peniena e per lo sbadiglio rispettivamente]. I confronti *post hoc* hanno inoltre rilevato che la dose efficace più bassa di ossitocina era quella di 20 ng per l'erezione peniena (2.50 ± 0.37 vs 0.33 ± 0.10 nei ratti trattati con salina, $P < 0.001, d = 2.57$) e di 5 ng per lo

sbadiglio (13.64 ± 2.76 contro 2.62 ± 0.46 nei ratti iniettati con salina, $P < 0.01$, $d = 1.70$), mentre la dose in grado di indurre la massima risposta comportamentale era di 100 ng per l'erezione peniena (3.61 ± 0.47 vs 0.33 ± 0.10 nei ratti trattati con salina, $P < 0.001$) e 20 ng per lo sbadiglio (24.83 ± 2.89 vs 2.62 ± 0.46 nei ratti trattati con salina, $P < 0.001$, $d = 3.69$), dopo le quali alle dosi più alte è stato osservato un effetto plateau (Figura 11).

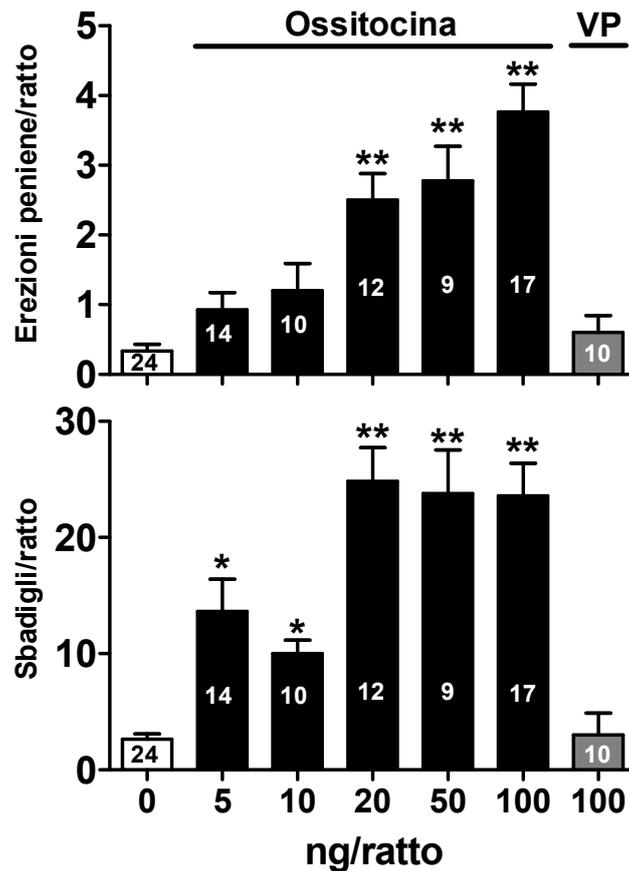


Figura 11. Effetto dell'iniezione di ossitocina nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio: curve dose-risposta e confronto con Arg⁸-vasopressina (VP). L'ossitocina (5-100 ng) o l'Arg⁸-vasopressina (100 ng) sono state disciolte in salina e iniettate nel BNST in un volume di 0.3 µL. I ratti utilizzati come controllo sono stati iniettati con lo stesso volume di soluzione salina (0). Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. I valori riportati sono la media ± SEM del numero di ratti per gruppo riportati in ciascuna colonna nel grafico. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con soluzione salina (ANOVA a una via seguita dal test *post hoc* di Dunnett).

4.2 Effetto dell'iniezione di ossitocina nel BNST sull'erezione peniena e lo sbadiglio: antagonismo da $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$.

Come mostrato nella Figura 12, la $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$, un potente antagonista selettivo dei recettori per l'ossitocina, antagonizza completamente l'effetto indotto dall'ossitocina sull'erezione peniena e lo sbadiglio, quando iniettata nel BNST alla dose di 1

$\mu\text{g}/0.3 \mu\text{L}$ 15 minuti prima dell'ossitocina ($100 \text{ ng}/0.3 \mu\text{L}$). Le ANOVA a una via [$F(3,32) = 20.63$, $P < 0.001$, $R^2 = 65.9$, e $F(3,32) = 21.91$, $P < 0.001$, $R^2 = 67.2$ per l'erezione peniena a lo sbadiglio rispettivamente] seguite dai confronti *post hoc*, non hanno rilevato differenze significative tra i ratti trattati con salina + salina e quelli trattati con $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina + ossitocina (entrambe $P > 0.05$) o con $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina + salina (entrambe $P > 0.05$), che invece risultano essere statisticamente significativi rispetto ai ratti trattati con salina + ossitocina ($P < 0.001$) (ratti trattati con salina + ossitocina contro ratti trattati con $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina + ossitocina : $d = -2.14$ e $d = -2.33$, per l'erezione peniena e lo sbadiglio rispettivamente) (vedi Figura 12).

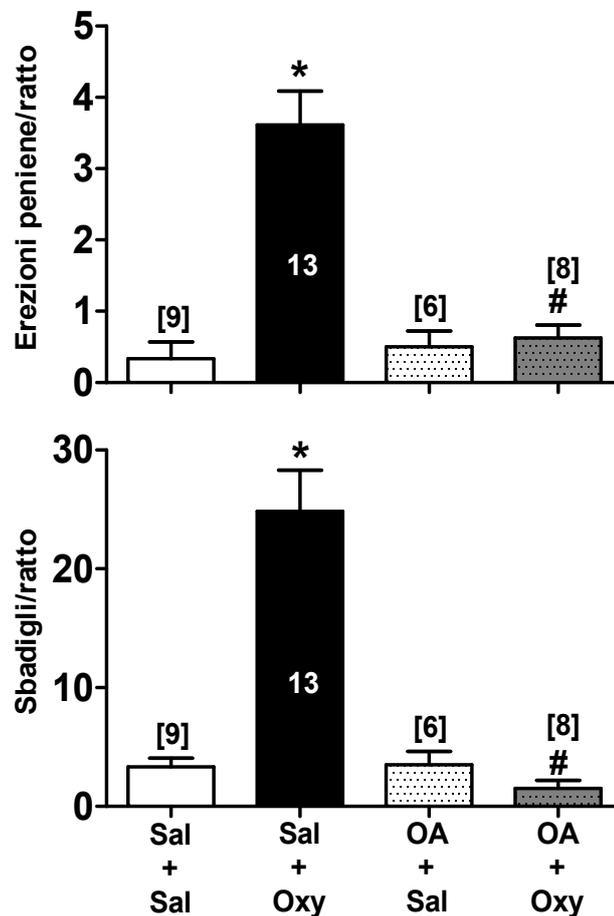


Figura 12. Effetto della $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina. La $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina (OA, $1 \mu\text{g}$) o la salina (Sal, $0.3 \mu\text{L}$) sono stati iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina (OXY, 100 ng) o della salina (Sal, $0.3 \mu\text{L}$). Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. I valori riportati sono la media \pm SEM del numero di ratti per gruppo riportati in ciascuna colonna nel grafico. * $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con soluzione salina; # $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con salina + ossitocina (ANOVA a una via seguita dal test *post hoc* di Bonferroni).

4.3 Effetto del (+)-MK-801, CNQX e SMTC iniettati nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST.

Come mostra la Figura 13, l'(+)-MK-801, un antagonista del recettore degli amino acidi eccitatori del tipo NMDA (1 $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{L}$), il CNQX, un antagonista del recettore degli amino acidi eccitatori del tipo AMPA (1 $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{L}$) e l'SMTC, inibitore selettivo della NOS neuronale (40 $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{L}$), aboliscono quasi completamente l'effetto pro-erettile dell'ossitocina quando iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina (100 ng/0.3 μL). L'ANOVA a una via [$F(7,59) = 7.11, P < 0.001, R^2 = 45.7$], seguita da confronti *post hoc* ha rilevato differenze significative per l'erezione tra i ratti trattati con (+)-MK-801, CNQX o SMTC + ossitocina e i ratti trattati con salina + ossitocina ($P < 0.001, d = -1.38, P < 0.05, d = -1.13$ e $P < 0.01, d = -1.34$ per (+)-MK-801, CNQX e SMTC, rispettivamente) ma non sono state riscontrate differenze significative tra i ratti trattati con (+)-MK-801 + ossitocina, CNQX + ossitocina e SMTC + ossitocina (per tutti $P > 0.05$).

Risultati simili a quelli descritti sopra per l'erezione peniena sono stati ottenuti anche sull'effetto pro-sbadiglio dell'ossitocina con l'(+)-MK-801 e l'SMTC, ma non con il CNQX. Infatti l'ANOVA a una via [$F(7,59) = 13,22, P < 0.001, R^2 = 61.0$] seguita dai confronti *post hoc* ha rilevato differenze significative sullo sbadiglio tra i ratti trattati con (+)-MK-801 o SMTC + ossitocina e i ratti trattati con salina + ossitocina ($P < 0.001, d = -2,14, e P < 0.01, d = -1.52$, per (+)-MK-801 e SMTC, rispettivamente), ma non tra i ratti trattati con CNQX + ossitocina e i ratti trattati con salina + ossitocina ($P < 0.001, d = 2.78$, quando si confrontano i ratti trattati con salina + salina e CNQX + ossitocina, ma $P > 0.05$ quando si confrontano i ratti trattati con salina + ossitocina e CNQX + ossitocina) (vedi Figura 13).

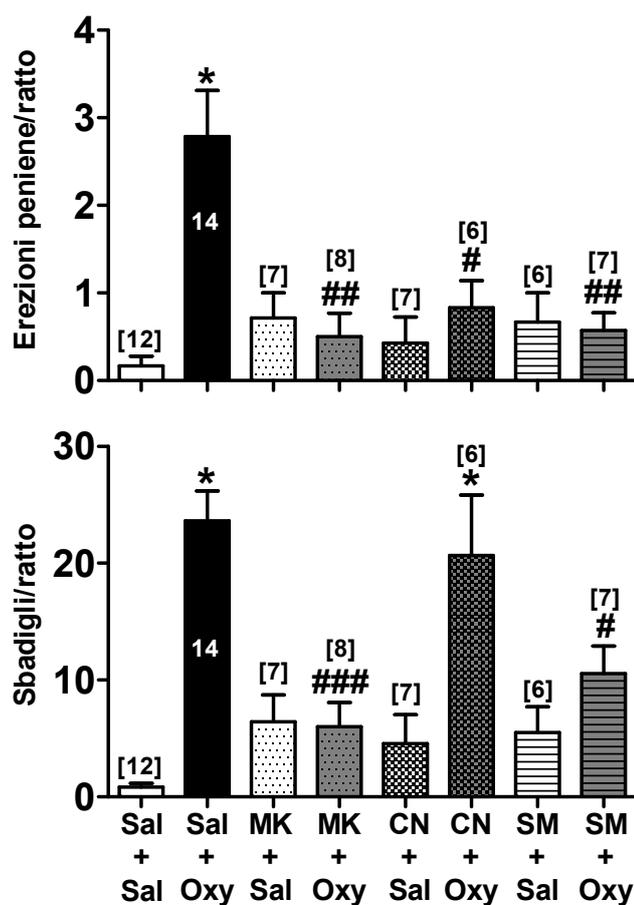


Figura 13. Effetto dell’(+)-MK-801, CNQX e SMTC sull’erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall’ossitocina nel BNST. L’(+)-MK-801 (MK, 1 µg), il CNQX (CN, 1 µg), l’SMTC (SM, 40 µg) o la salina (Sal, 0.3 µL) sono stati iniettati nel BNST 15 minuti prima dell’ossitocina (Oxy, 100 ng) o della salina (Sal, 0.3 µL). Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. I valori riportati sono la media ± SEM del numero di ratti per gruppo riportati in ciascuna colonna nel grafico. *P < 0.001 rispetto ai ratti trattati con soluzione salina; #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 rispetto ai ratti trattati con salina + ossitocina (ANOVA a una via seguita dal test *post hoc* di Bonferroni).

4.4 Effetto dell’aloperidolo e dell’ SCH-23390 iniettati nel BNST sull’erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall’ossitocina iniettata nel BNST

Come mostrato nella Figura 14, l’SCH 23390, un antagonista selettivo dei recettori dopaminergici D1 (1 µg/0.3 µL), ma non l’aloperidolo, un antagonista selettivo dei recettori dopaminergici D2, abolisce quasi completamente l’erezione peniena e lo sbadiglio indotti dall’ossitocina (100 ng/0.3 µL) quando iniettato nel BNST 15 minuti prima dell’ossitocina. L’ANOVA a una via [F(5,41) = 20.09, P < 0.001, R² = 71.0, e F(5,41) = 24.53, P < 0.001, R² = 74.9, per l’erezione peniena e lo sbadiglio rispettivamente] seguita dai test *post hoc*, rileva

differenze significative tra i ratti trattati con SCH-23390 + ossitocina e i ratti trattati con salina + ossitocina ($P < 0.001$, $d = -2.25$, e $P < 0.05$, $d = -1.57$, per l'erezione peniena e lo sbadiglio rispettivamente), mentre non sono state riscontrate differenze significative tra i ratti trattati con aloperidolo + ossitocina e i ratti trattati con salina + ossitocina (entrambe $P > 0.05$) (Figura 14).

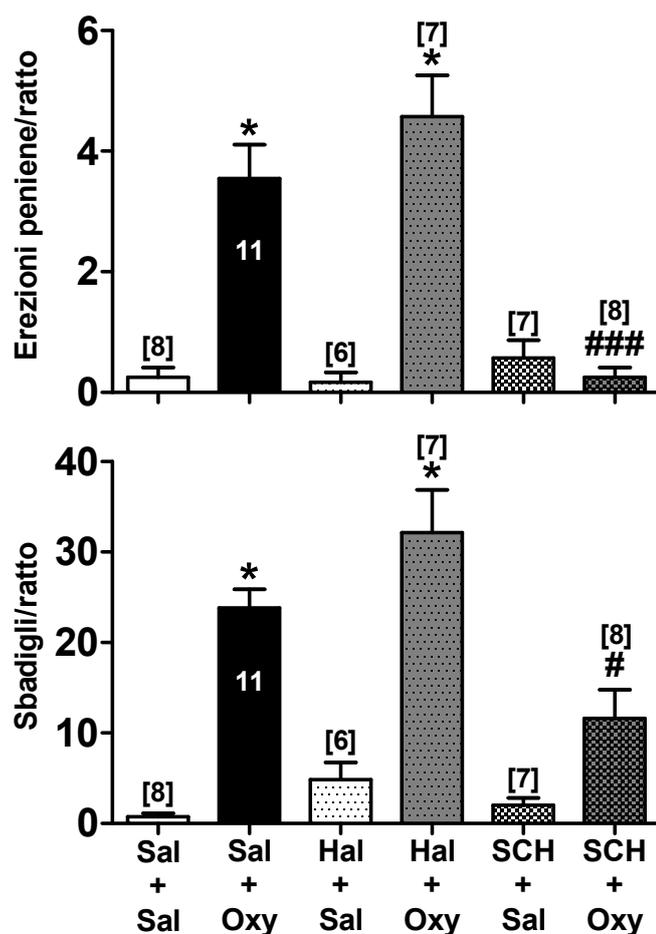


Figura 14. Effetto dell'SCH-23390 e dell'aloiperidolo sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina nel BNST. L'SCH-23390 (SCH, 1 μ g) l'aloiperidolo (Hal, 1 μ g) o la salina (Sal, 0.3 μ L) sono stati iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina (Oxy, 100 ng) o della salina (Sal, 0.3 μ L). Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. I valori riportati sono la media \pm SEM del numero di ratti per gruppo riportati in ciascuna colonna nel grafico. * $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con soluzione salina; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con salina + ossitocina (ANOVA a una via seguita dal test *post hoc* di Bonferroni).

4.5 Effetto della bicucullina e del faclofen iniettati nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST

Come mostrato nella Figura 15, la bicucullina, un antagonista selettivo del recettore GABAergico del tipo GABA_A (20 ng/0.3 μ L), e il faclofen, un antagonista selettivo del

recettore GABAergico del tipo GABA_B (5 µg/0.3 µL), non hanno avuto nessun effetto sull'erezione peniena e lo sbadiglio indotti dall'ossitocina (100 ng/0.3 µL) iniettata 15 minuti prima nel BNST. L'ANOVA a una via [$F(5,42) = 9.18, P < 0.001, R^2 = 52.2$, e $F(5,42) = 34.84, P < 0.001, R^2 = 80.5$, per l'erezione peniena e lo sbadiglio rispettivamente] seguita dai confronti *post hoc* non ha rilevato differenze significative nell'erezione peniena tra i ratti trattati con faclofen o bicucullina + ossitocina e i ratti trattati con salina + ossitocina ($P > 0.05$), mentre è stato riscontrato un antagonismo parziale dell'effetto pro-sbadiglio indotto dall'ossitocina nei ratti trattati con bicucullina + ossitocina ($P < 0.001, d = -3.04$, quando si confrontano i ratti trattati con salina + ossitocina contro i ratti trattati con bicucullina + ossitocina) (vedi Figura 15).

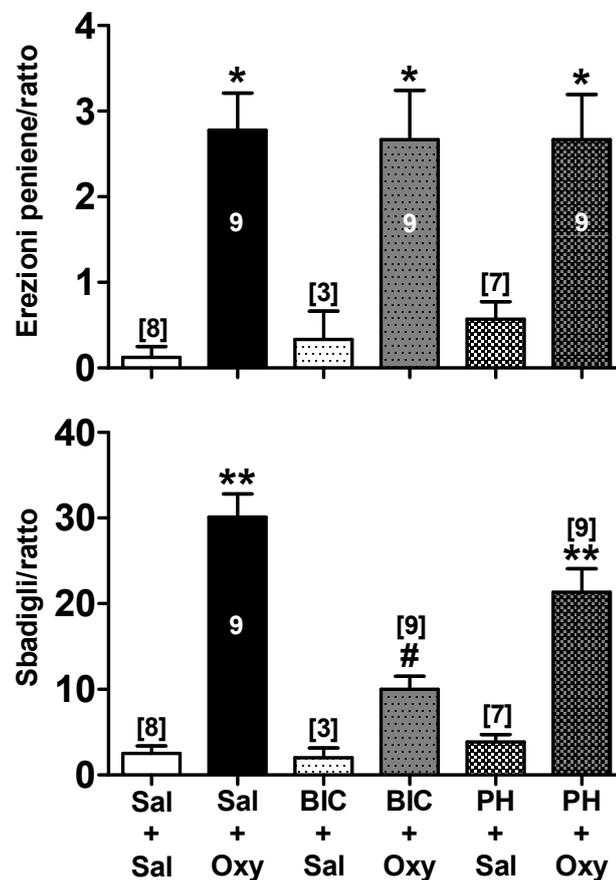


Figura 15. Effetto della bicucullina e del faclofen sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina nel BNST. La bicucullina (BIC, 20 ng), il faclofen (PH, 5µg) o la salina (Sal, 0.3 µL) sono stati iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina (Oxy, 100 ng) o della salina (Sal, 0.3 µL). Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. I valori riportati sono la media ± SEM del numero di ratti per gruppo riportati in ciascuna colonna nel grafico. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con soluzione salina; # $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con salina + ossitocina (ANOVA a una via seguita dal test *post hoc* di Bonferroni).

4.6 Effetto del CP-154526 e dell'astressina 2B iniettati nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST

Come mostrato nella Figura 16, il CP 376395 (5 µg/0.3 µL) e l'astressina-2B (150 ng/0.3 µL), antagonisti selettivi dei recettori CRF-1 e CRF-2 rispettivamente, non inducono nessuna riduzione dell'erezione peniena e dello sbadiglio indotti dall'ossitocina quando iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina (100 ng/0.3 µL). L'ANOVA a una via [$F(5,40) = 10.76$, $P < 0.001$, $R^2 = 57.3$, e $F(5,40) = 12.33$, $P < 0.001$, $R^2 = 60.6$, per l'erezione peniena e lo sbadiglio, rispettivamente] seguita dai confronti *post hoc* non ha rilevato differenze significative nell'erezione peniena e nello sbadiglio tra i ratti trattati con CP 376395 o astressina-2B + ossitocina e i ratti trattati con salina + ossitocina ($P > 0.05$) (vedi Figura 16).

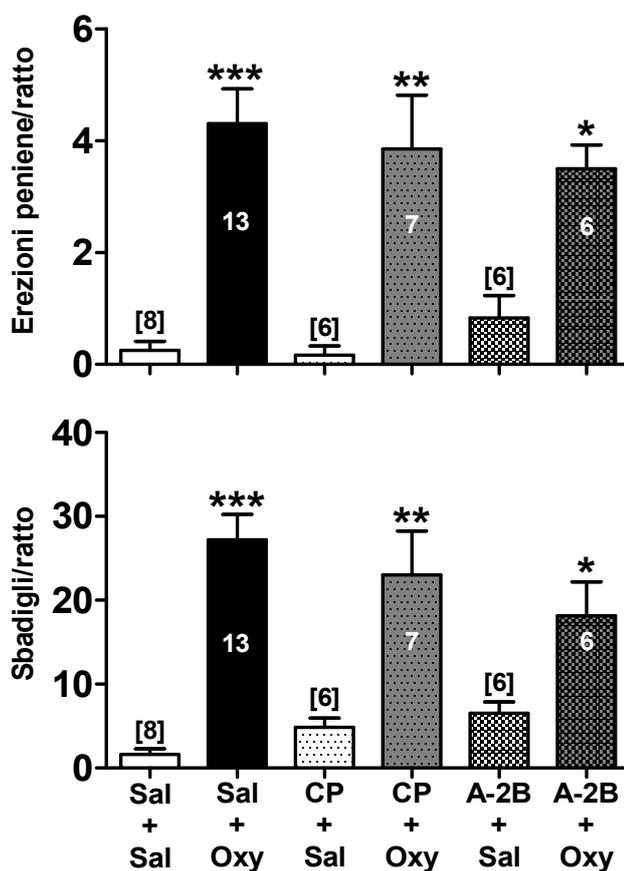


Figura 16. Effetto del CP 376395 e dell'astressina 2B sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina nel BNST. Il CP 376395 (CP, 5 µg), l'astressin-2B (A-2B, 150 ng) o la salina (0.3 µL) sono stati iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'ossitocina (Oxy, 100 ng) o della salina (Sal, 0.3 µL). Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. I valori riportati sono la media ± SEM del numero di ratti per gruppo riportati in ciascuna colonna nel grafico. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con soluzione salina (ANOVA a una via seguita dal test *post hoc* di Bonferroni).

4.7 Effetto dell'iniezione di NMDA nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio: confronto con l'ossitocina

Come mostrato nella Figura 17, l'NMDA (100 ng/0.3 μ L), agonista selettivo dei recettori glutamatergici di tipo NMDA, iniettato unilateralmente nel BNST, induce erezione peniena e sbadigli nei ratti maschi, che si manifestano 15 minuti dopo il trattamento e continuano per circa 60 minuti, sebbene con una frequenza minore rispetto a quella riscontrata con l'ossitocina. Come previsto l'induzione dell'erezione peniena e dello sbadiglio da parte dell'NMDA è abolita dall' (+)-MK-801 (1 μ g), che abolisce anche gli effetti comportamentali indotti dall'ossitocina. Tuttavia, a differenza dell'ossitocina, l'erezione e lo sbadiglio indotti dall'NMDA non sono stati antagonizzati dalla $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (1 μ g), che blocca i recettori ossitocinergici, iniettata nel BNST prima dell'ossitocina. In accordo a ciò l'ANOVA a una via ha rilevato effetti significativi del trattamento [$F(6,70) = 13.28$, $P < 0.001$, $R^2 = 53.2$ e $F(6,70) = 21.02$, $P < 0.001$, $R^2 = 64.3$, per l'erezione peniena e lo sbadiglio, rispettivamente]. Inoltre i confronti *post hoc* hanno rilevato differenze significative tra i ratti trattati con salina + salina e i ratti trattati con salina + NMDA ($P < 0.05$, $d = 1.18$, and $P < 0.05$, $d = 1.66$, per l'erezione peniena e lo sbadiglio, rispettivamente) mentre non sono state riscontrate differenze tra i ratti trattati con salina + salina e i ratti trattati con (+)-MK-801 + NMDA ($P > 0.05$), che al contrario mostrano differenze significative per l'erezione peniena ($P < 0.05$, $d = 1.58$), ma non per lo sbadiglio ($P > 0.05$) dai ratti trattati con $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ + NMDA.

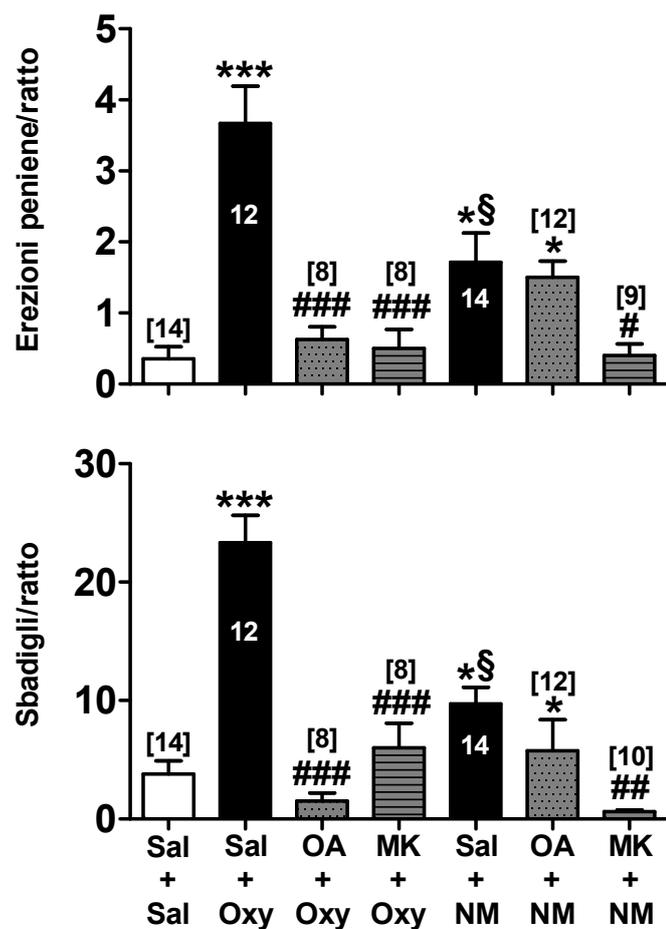


Figura 17. Effetto dell'iniezione di NMDA nel BNST sull'erezione peniena e sullo sbadiglio indotti dall'ossitocina. L' NMDA (NM, 100 ng) o l' ossitocina (Oxy, 100 ng) sciolti in salina, o la sola salina (Sal, 0.3 μ L) sono stati iniettati nel BNST. L'(+)MK-801 (MK, 1 μ g) o la d(CH₂)₅Tyr(Me)²-Orn⁸-vasotocina (OA, 1 μ g) sciolti in salina o la sola salina (0.3 μ L) sono stati iniettati nel BNST 15 minuti prima dell'NMDA o dell'ossitocina. Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti e sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio. I valori riportati sono la media \pm SEM del numero di ratti per gruppo riportati in ciascuna colonna nel grafico. *P < 0.05, ***P < 0.001 rispetto ai ratti trattati con soluzione salina; #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 rispetto ai ratti trattati con NMDA o ossitocina; §P < 0.001 tra i ratti trattati con NMDA e quelli trattati con ossitocina (ANOVA a una via seguita dal test *post hoc* di Bonferroni).

4.8 Concentrazioni basali di acido glutamico e di ioni NO_2^- nel dializzato ottenuto dal BNST mediante microdialisi intracerebrale

Nelle condizioni sperimentali utilizzate nel mio studio, la quantità di acido glutamico e di NO_2^- nel dializzato ottenuto dal BNST dei ratti con la punta della cannula da microiniezione e da microdialisi impiantata correttamente nel BNST (Figura 18) sono circa 0.242 ng di acido glutamico e 0.315 ng di NO_2^- in un volume di dializzato di 5 μl e 25 μl , rispettivamente. Questo corrisponde ad una concentrazione di 339 nM per l'acido glutamico e di 274 nM per l' NO_2^- . Questi valori sono stati trovati nel dializzato ottenuto dal BNST dopo un periodo di perfusione per equilibrare il tampone di perfusione con il liquido extracellulare intracerebrale di almeno 2 ore. Poiché il recupero reale di acido glutamico e NO_2^- passati nella cannula da microdialisi è intorno al 20%, nel liquido extracellulare del BNST, la concentrazione di dell'acido glutamico può essere stimata intorno a 1.69 μM e dei NO_2^- intorno a 1.37 μM .

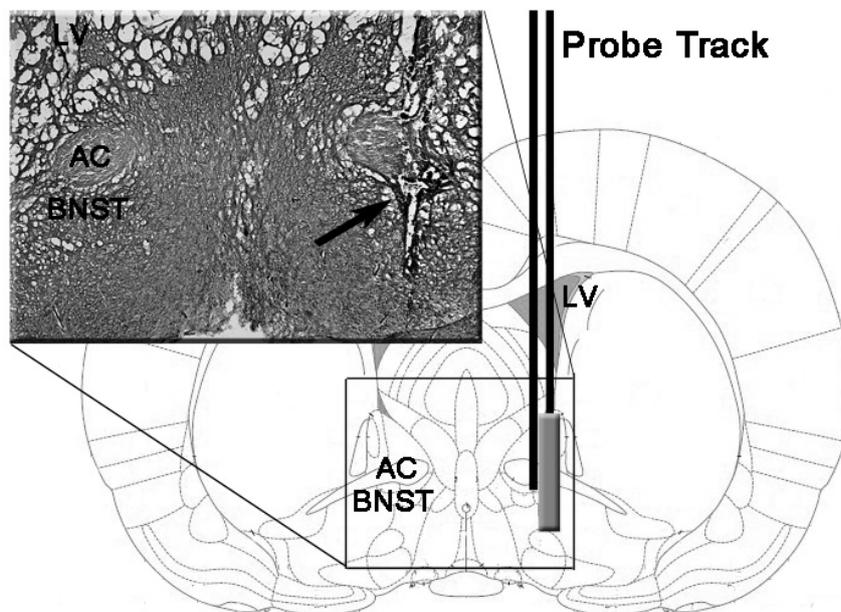


Figura 18: Rappresentazione schematica di una sezione coronale dell'encefalo di ratto che mostra sia il sito di microiniezione indicato dalla freccia, che la porzione dializzante della cannula da dialisi nel BNST (Paxinos e Watson, 2004). Abbreviazioni: AC = commessura anteriore; LV = ventricolo laterale.

4.9 L'ossitocina iniettata nel BNST induce erezione peniena e sbadiglio e aumenta la concentrazione di acido glutamico e di ioni NO_2^- nel dializzato ottenuto dal BNST: effetto del pre-trattamento con $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina

Come atteso, l'iniezione di ossitocina (100 ng) nel BNST dei ratti con una cannula da microiniezione abbinata ad una cannula da microdialisi perfusa con la soluzione Ringer come descritto nei Materiali e Metodi, sottosezione Microdialisi, induce episodi di erezione peniena e sbadigli. Entrambe le risposte comportamentali si osservano 15 minuti dopo il trattamento e durano circa 45 minuti. Il numero di erezioni e di sbadigli aumenta da valori basali praticamente uguali a 0 (prima del trattamento) a valori superiori a 3-4 per le erezioni e 40 per gli sbadigli nei 60 minuti di osservazione. Erezioni e sbadigli si verificano in concomitanza ad un aumento delle concentrazioni di acido glutamico e di NO_2^- nel dializzato ottenuto dal BNST rispetto alle concentrazioni basali dei due composti, misurate prima dell'iniezione dell'ossitocina. L'aumento di acido glutamico e di NO_2^- è già massimo nei primi 15 minuti dal trattamento con ossitocina e dura per almeno 30 minuti (Figura 19), con un aumento di circa 200% per l'acido glutamico e di circa il 77% per il NO_2^- al di sopra dei valori basali dei due composti misurati prima della iniezione della ossitocina (Figura 19). Sia l'aumento del numero di erezioni peniene e di sbadigli che l'aumento della concentrazione di acido glutamico e di NO_2^- sono praticamente aboliti dall'iniezione di $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina nel BNST alla dose di 1 μg 15 minuti prima dell'ossitocina. Infatti, una prima analisi statistica sui valori AUC dei parametri comportamentali e neurochimici ha rilevato differenze significative sia negli episodi di erezione peniena e sbadiglio che nelle concentrazioni di acido glutamico e NO_2^- nei ratti trattati con Salina + Ossitocina rispetto ai ratti trattati con Salina + Salina e Ossitocina antagonista + ossitocina (vedi Tabella 2).

Inoltre, analisi più approfondite condotte con l'ANOVA a due vie sui valori delle erezioni peniene e sbadigli e sui valori delle concentrazioni di acido glutamico e NO_2^- in funzione del tempo hanno rilevato un effetto significativo per diversi dei parametri considerati (vedi Tabella 3).

In aggiunta a ciò, le analisi *post hoc* eseguite con la correzione di Bonferroni hanno messo in evidenza differenze significative negli episodi di erezione peniena sia prima e dopo il trattamento ma solo nel caso dell'ossitocina (tempo: Sal + Oxy, 30 min: $P < 0.001$, $d = 1.50$), sia tra i gruppi Sal + Oxy e Sal + Sal (trattamento: 30 min: $P < 0.001$, $d = 1.17$) che tra i gruppi Sal + Oxy e Oxy-ant + Oxy (trattamento: 30 min: $P < 0.001$, $d = 1.14$).

Tabella 2. Effetto dell'ossitocina sugli episodi di erezione peniena e sbadiglio e sulle concentrazioni di acido glutamico e NO_2^- misurati con le AUCs calcolate sui dati mostrati nella Figura 19: effetto del pretrattamento con $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina.

| Trattamenti | AUC Acido glutamico | AUC NO_2^- | AUC Erezioni peniene | AUC Sbadigli |
|---|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Sal + Sal (0.3 μL) | 2598 \pm 497.7 | 1912 \pm 226.6 | 0.0 \pm 0.0 | 3.75 \pm 1.52 |
| Sal + Oxy (100 ng) | 6410 \pm 1512* | 3743 \pm 403.8* | 55.76 \pm 7.45*** | 577.8 \pm 35.89* |
| Oxy-Ant (1 μg) + Oxy (100 ng) | 2016 \pm 522.0 | 2863 \pm 621.8 | 7.5 \pm 3.45 #### | 27.50 \pm 12.12 # |

Le analisi statistiche delle AUCs sono state eseguite con ANOVA a una via seguita dal test di Tukey ($F(2,46) = 26.15$, $P < 0.001$) per l'erezione peniena, e test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Dunn per lo sbadiglio ($KW(2,46) = 37.52$, $P < 0.001$); mentre per l'acido glutamico e i NO_2^- sono stati effettuati il test di Kruskal-Wallis ($KW(2, 17) = 9.025$, $P < 0.05$) e il test di Tukey ($F(2,20) = 4,875$, $P < 0.05$) rispettivamente. I valori sono espressi come media \pm SEM.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con sal + sal, #### $P < 0.001$ Oxy-ant + Oxy rispetto a Sal + Oxy.

Tabella 3. Valori di F, Eta quadro (η^2) e livelli di significatività dei dati mostrati nella Figura 19, ottenuti mediante ANOVA a due vie per misure ripetute, confrontando gli animali trattati con Sal + Oxy con gli animali trattati con Sal + Sal e con Oxy-ant + Oxy.

| Parametri | F | | | dl |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|
| | Trattamento | Tempo | Trattamento X tempo | |
| Erezioni Peniene | 29.48** ($\eta^2 = 7.1$) | 5.95** ($\eta^2 = 11.8$) | 4.97** ($\eta^2 = 11.3$) | 2,7,14,322 |
| Sbadigli | 121.6** ($\eta^2 = 23.1$) | 41.87** ($\eta^2 = 14.2$) | 41.71** ($\eta^2 = 28.3$) | 2,7,14,322 |
| Acido Glutamico | ns | 5.7** ($\eta^2 = 7.0$) | 5.58** ($\eta^2 = 13.6$) | 2,7,14,119 |
| NO_2^- | 5.7* ($\eta^2 = 5.4$) | 8.4* ($\eta^2 = 21.0$) | 1.98* ($\eta^2 = 9.8$) | 2,7,14,140 |

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

Risultati analoghi sono stati ottenuti con lo sbadiglio, infatti, anche in questo caso i confronti *post hoc* eseguiti con la correzione di Bonferroni hanno messo in evidenza differenze significative nella frequenza dello sbadiglio prima e dopo il trattamento nel caso del

trattamento con ossitocina (tempo: Sal + Oxy, 30 min: $P < 0.001$, $d = 4.13$) e differenze significative tra i gruppi Sal + Oxy e Sal + Sal (trattamento: 30 min: $P < 0.001$, $d = 3.68$) e tra i gruppi Sal + Oxy e Oxy-ant + Oxy (trattamento: 30 min: $P < 0.001$, $d = 3.13$).

Per quanto riguarda la concentrazione di acido glutamico e NO_2^- , le analisi *post hoc* eseguite con la correzione di Bonferroni hanno messo in evidenza differenze significative nei valori di acido glutamico prima e dopo il trattamento con ossitocina (tempo: Sal + Oxy, 15 min: $P < 0.001$, $d = 2.15$ e $P < 0.001$, $d = 1.64$, per acido glutamico e NO_2^- , rispettivamente) e differenze significative tra i gruppi Sal + Oxy e Sal + Sal (trattamento: $P < 0.05$, $d = 2.04$) e Sal + Oxy e Oxy-ant + Oxy (trattamento: $P < 0.05$, $d = 1.67$) per l'acido glutamico, e tra i gruppi Sal + Oxy e Sal + Sal (trattamento: $P < 0.001$, $d = 1.51$) e Sal + Oxy e Oxy-ant + Oxy (trattamento: $P < 0.05$, $d = 1.07$) per NO_2^- nei primi 15 minuti dopo il trattamento.

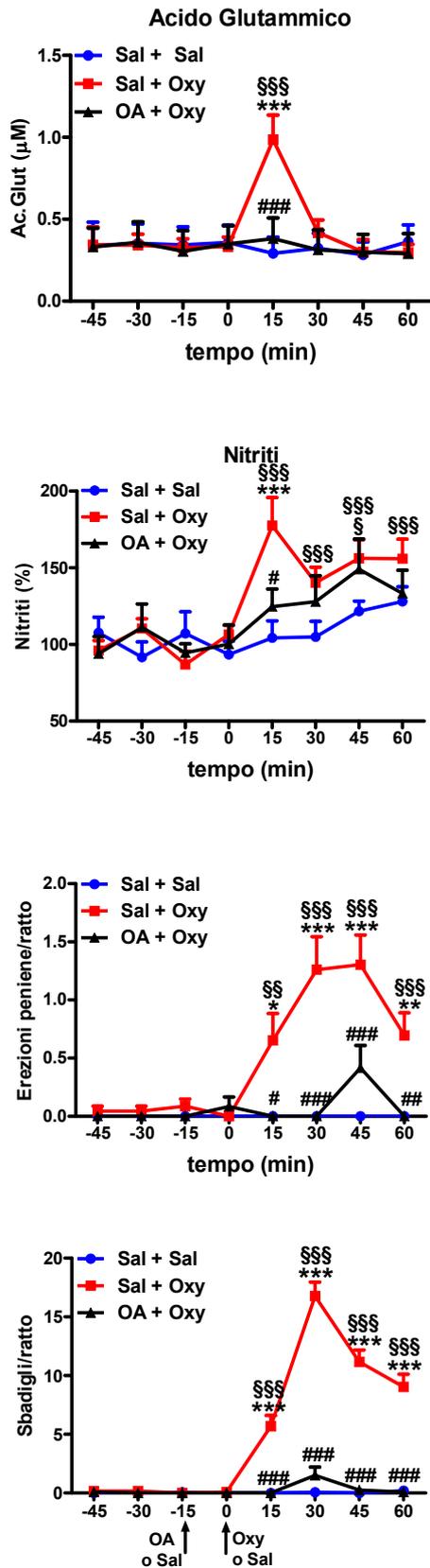


Figura 19. Effetto dell'iniezione di ossitocina nel BNST sull'erezione peniena e lo sbadiglio e sulle concentrazioni di acido glutammico e NO_2^- : antagonismo da parte della $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina. L'ossitocina (Oxy, 100 ng) disciolta in salina è stata iniettata nel BNST in un volume di 0.3 μL . Quando è stato utilizzato l'antagonista dei recettori per l'ossitocina $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina (OA) (1 μg) questo è stato sciolto in salina e iniettato nel BNST in un volume di 0.3 μL 15 minuti prima dell'ossitocina. I ratti di controllo sono stati iniettati con gli stessi volumi di soluzione salina (Sal+Sal). Dopo il trattamento i ratti sono stati osservati per 60 minuti durante i quali sono stati registrati gli episodi di erezione peniena e sbadiglio e sono state raccolte ogni 15 minuti le aliquote di dializzato per la determinazione della concentrazione di acido glutammico e NO_2^- all'interno del BNST. I valori sono espressi come media \pm SEM. § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$ rispetto ai valori basali; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con la soluzione salina; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con Sal + Oxy; (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

5. DISCUSSIONE

Da quanto risulta da un'analisi della letteratura, questo è il primo lavoro che dimostra che l'ossitocina iniettata unilateralmente nel BNST induce episodi di erezione peniena e sbadiglio in modo dose-dipendente. Gli effetti dell'ossitocina sono significativi già alle dosi di 20 ng per l'erezione e 5 ng (5 picomoli) per lo sbadiglio e raggiungono la risposta massima alla dose di 100 ng per l'erezione e 20 ng per lo sbadiglio. Questi risultati sono simili a quelli osservati con l'ossitocina iniettata unilateralmente nel nucleo paraventricolare, dove il neuropeptide è in grado di indurre erezione e sbadiglio quando somministrato alla dose di 3 ng e in tale area l'effetto plateau è raggiunto alla dose di 30 ng (Melis et al., 1986).

L'erezione peniena e lo sbadiglio indotti dall'iniezione di ossitocina nel BNST sono apparentemente mediati dalla stimolazione dei recettori ossitocinergici. Infatti, entrambe le risposte sono abolite dall'iniezione di $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$, un potente antagonista selettivo del recettore per l'ossitocina (Bankowski et al., 1980) nel BNST prima dell'ossitocina. Il recettore della vasopressina sembra non essere coinvolto, infatti l'iniezione di $\text{Arg}^8\text{-vasopressina}$ unilateralmente nel BNST alla dose di 100 ng è completamente inefficace nell'indurre queste risposte comportamentali. In linea con questa ipotesi: i) il BNST riceve fibre ossitocinergiche dal nucleo paraventricolare e dalla regione periventricolare circostante, da cui provengono tutte le fibre neuronali ossitocinergiche centrali (Swanson e Sawchenko, 1983; Sofroniew, 1983; Sawchenko e Swanson, 1983); ii) i recettori per l'ossitocina e il mRNA per tali recettori sono stati identificati nel BNST (Wilson et al., 2005; Consiglio et al., 2005; Dabrowska et al., 2011; Calcagnoli et al., 2014; Dumais et al., 2016), e iii) l'ossitocina iniettata nel BNST induce dei cambiamenti in diverse risposte comportamentali, che vanno dall'aggressività e dal comportamento aggressivo materno (Consiglio et al., 2005; Calcagnoli et al., 2014) all'erezione e lo sbadiglio (questo studio).

Questo lavoro di tesi mostra anche che l'erezione peniena e lo sbadiglio indotti dall'ossitocina iniettata nel BNST sono ridotti o aboliti non solo dall'antagonista selettivo del recettore per l'ossitocina $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$, ma anche dal (+)-MK-801, un antagonista selettivo del recettore glutamatergico di tipo NMDA, dal SCH-23390, antagonista selettivo del recettore dopaminergico D1 e dal SMTC, inibitore della NO sintetasi neuronale. A differenza del (+)-MK-801, il CNQX, antagonista selettivo del recettore glutamatergico di tipo AMPA, abolisce completamente gli episodi di erezione peniena ma non lo sbadiglio. Poiché questi composti influenzano l'attività degli aminoacidi eccitatori, dopamina e NO,

neurotrasmettitori tutti presenti nel BNST (vedi Crestani et al., 2013; Stamakis et al., 2014), questo suggerisce che l'ossitocina iniettata nel BNST induce erezione peniena e sbadiglio attraverso l'interazione con questi sistemi neurotrasmettitoriali. Al contrario, le risposte indotte dall'ossitocina sembrano non coinvolgere il neurotrasmettitore GABA o il neuropeptide CRF, infatti la bicucullina, un potente antagonista dei recettori GABA_A, il faclofen, antagonista dei recettori GABA_B, il CP-376395 e l'astressina 2B, antagonisti rispettivamente dei recettori CRF-1 e CRF-2, sono risultati inefficaci sulle risposte indotte dall'iniezione di ossitocina nel BNST quando iniettati nel BNST prima dell'ossitocina.

Un'interpretazione dei risultati ottenuti che spiega come l'ossitocina iniettata nel BNST induca l'erezione peniena e lo sbadiglio potrebbe essere la seguente (Figura 20): l'ossitocina iniettata nel BNST induce tali risposte comportamentali agendo sui recettori ossitocinergici localizzati nelle sinapsi di neuroni eccitatori glutamatergici, i cui corpi cellulari sono localizzati nell'amigdala e/o nel subicolo ventrale dell'ippocampo (de Olmos e Ingram, 1972; Phelix et al., 1992; Morari et al., 1998; Hasue e Shammah-Lagnado, 2002; Meloni et al., 2006).

L'attivazione dei recettori dell'ossitocina porta a sua volta alla liberazione di acido glutamico, che agisce sui recettori degli amminoacidi eccitatori localizzati principalmente nei neuroni glutamatergici che proiettano all'ipotalamo (ipotalamo laterale, area preottica mediale e nucleo paraventricolare) e/o, tramite proiezioni di ritorno, all'area tegmentale ventrale, all'amigdala e al subicolo ventrale dell'ippocampo (de Olmos e Ingram, 1972; Phelix et al., 1992; Morari et al., 1998; Hasue e Shammah-Lagnado, 2002; Meloni et al., 2006).

In linea con quest'ipotesi: i) l'erezione peniena e lo sbadiglio indotti dall'iniezione dell'ossitocina nel BNST è abolita o ridotta non solo dalla $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina ma anche dal (+)-MK-801 che blocca i recettori glutamatergici di tipo NMDA; ii) l'attivazione dei recettori per gli amminoacidi eccitatori nel BNST da parte dell'NMDA induce sia erezione peniena che sbadigli, che sono aboliti dalla previa iniezione non solo di $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina, ma anche di (+)-MK-801 nel BNST (Figura 10). In accordo con questo meccanismo, l'ossitocina iniettata nel BNST a dosi che inducono erezione peniena e sbadiglio, induce anche un aumento significativo della concentrazione extracellulare di acido glutamico nel dializzato ottenuto dal BNST mediante microdialisi intracerebrale, aumento che è abolito dalla somministrazione di $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina, che blocca i recettori ossitocinergici, nel BNST prima dell'ossitocina a dosi che aboliscono anche l'aumento del numero di erezioni peniene e di sbadigli indotti sempre dall'ossitocina. Questa interpretazione può anche spiegare il coinvolgimento dell'NO nei

meccanismi attivati dall'ossitocina a livello BNST nell'induzione dell'erezione peniena e dello sbadiglio. Infatti entrambe le risposte sono ridotte dalla SMTC, un inibitore selettivo della NO sintetasi neuronale Ca^{2+} -calmodulina-dipendente, che generalmente si trova localizzata nei corpi cellulari dei neuroni attivati dagli amminoacidi eccitatori, in questo caso neuroni glutamatergici che proiettano all'ipotalamo (ipotalamo laterale, area preottica mediale e nucleo paraventricolare) e/o, tramite proiezioni di ritorno, all'area tegmentale ventrale, all'amigdala e al subicolo ventrale dell'ippocampo. Quando questi neuroni sono attivati dalla stimolazione dei recettori per gli amminoacidi eccitatori, aumenta la produzione del NO nel corpo cellulare di questi neuroni, portando all'attivazione di diverse vie di trasduzione. In accordo con questa interpretazione, questo studio dimostra anche che l'ossitocina iniettata nel BNST a dosi che inducono erezione peniena e sbadiglio fa anche aumentare la concentrazione extracellulare di ioni NO_2^- nel dializzato ottenuto dal BNST, aumento anche questo abolito dalla somministrazione di $\text{d}(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})^2\text{-Orn}^8$ -vasotocina nel BNST prima dell'ossitocina, al pari dell'aumento dell'acido glutamico (vedi prima) a dosi che aboliscono anche l'aumento del numero di erezioni peniene e di sbadigli indotti sempre dall'ossitocina.

Un aumento nel dializzato intracerebrale degli ioni NO_2^- , il principale metabolita dell'NO, indica un aumento della produzione *ex novo* di NO che fa seguito alla attivazione della NO sintetasi (vedi Melis et al., 1996 e bibliografia inclusa) presente nei corpi cellulari dei neuroni su cui agisce l'acido glutamico e che mediano la risposta erettile e lo sbadiglio indotti dall'ossitocina. Quanto alle vie di trasduzione attivate dall'NO che portano all'attivazione di questi neuroni, la più conosciuta è sicuramente l'attivazione della guanilato ciclasi che converte il GTP in cGMP. In linea con quest'ipotesi è stato riportato che il sistema NO-guanilato ciclasi è coinvolto nell'induzione dell'erezione peniena e dello sbadiglio da parte dell'ossitocina nell'area tegmentale ventrale (Succu et al., 2008). Questo non si verifica però nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, dove la guanilato ciclasi invece sembra non essere coinvolta nell'induzione di tali comportamenti indotti dall'ossitocina. Infatti è stato visto che l'iniezione nel nucleo paraventricolare di 8Br-cGMP, analogo del cGMP resistente alle fosfodiesterasi, non è in grado di indurre l'erezione peniena e lo sbadiglio (Melis e Argiolas, 1995a, 1995b), sebbene induca erezione peniena quando iniettato nell'area tegmentale ventrale (Succu et al., 2008). Anche se sono necessari ulteriori esperimenti per identificare l'esatto meccanismo di trasduzione attivato dall'aumento di NO all'interno del BNST, la capacità del SMTC di prevenire l'erezione peniena e lo sbadiglio indotti dall'ossitocina quando iniettata in tale area, suggerisce che un meccanismo simile possa contribuire

all'attivazione di questi neuroni del BNST che proiettano probabilmente al nucleo paraventricolare, all'area preottica mediale, all'area tegmentale ventrale e al subicolo ventrale

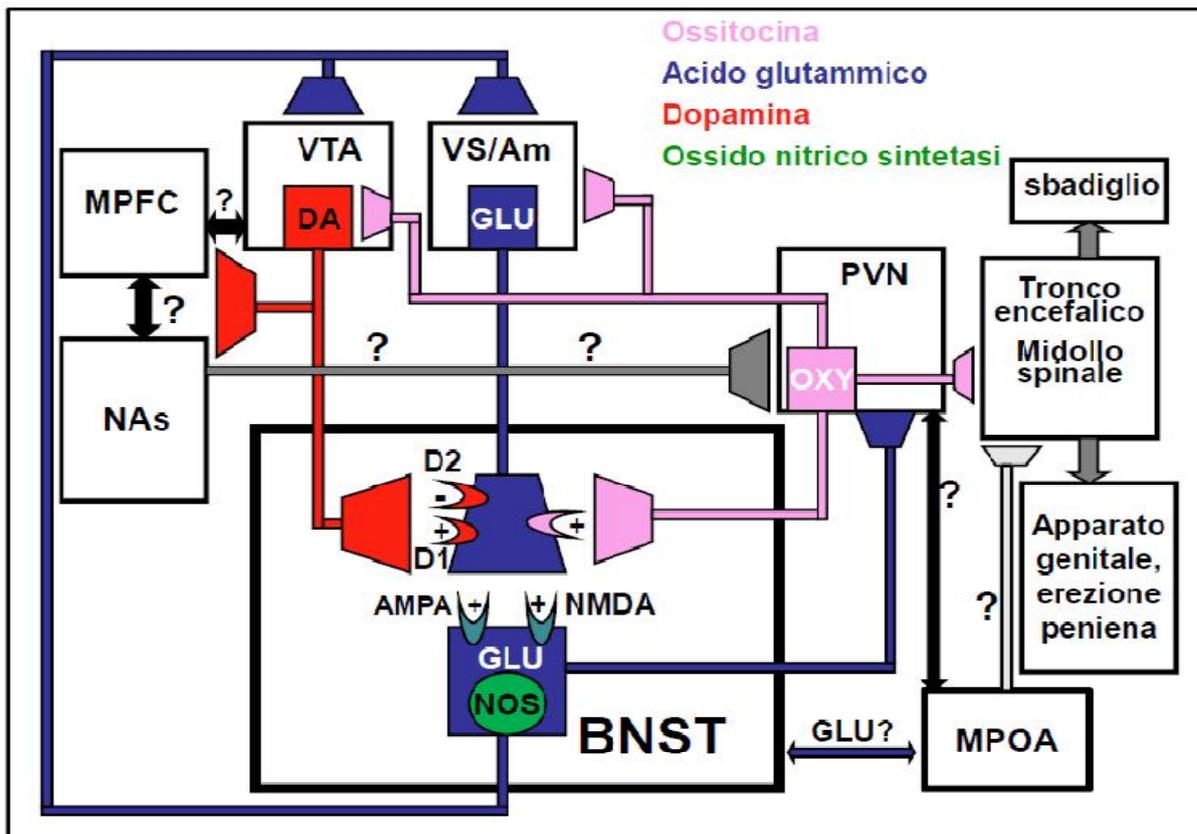


Figura 20. L'ossitocina iniettata nel BNST induce erezione peniena e sbadiglio: ipotetico meccanismo d'azione. In accordo con questo meccanismo, l'ossitocina (OXY) iniettata all'interno del BNST attiva la trasmissione glutamatergica (GLU) attraverso l'attivazione dei recettori ossitocinergici localizzati nella sinapsi dei neuroni glutamatergici che originano nel subicolo ventrale/amigdala (Vs/Am). Queste sinapsi impingono nei corpi cellulari dei neuroni glutamatergici contenenti NO sintetasi (NOs) che inviano proiezioni al nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVN, dove sono presenti i neuroni ossitocinergici che proiettano al BNST) e inviano proiezioni di ritorno al subicolo ventrale/amigdala e all'area tegmentale ventrale (VTA): la stimolazione di questi neuroni glutamatergici (mediata in parte dall'aumento della produzione del NO) porta all'attivazione di circuiti neurali presenti non solo in queste aree, ma anche con le aree connesse ad esse [nucleo accumbens (NAs) e corteccia prefrontale mediale (MPFC)], coinvolte nel controllo dell'erezione peniena e dello sbadiglio (Melis e Argiolas, 2011). Infatti, il blocco dei recettori glutamatergici di tipo NMDA (da parte del (+)-MK-801) nel BNST blocca l'erezione peniena e lo sbadiglio indotti dall'ossitocina. Tuttavia, visto che il blocco dei recettori AMPA (da parte del CNQX) abolisce l'erezione peniena ma non lo sbadiglio indotto dall'ossitocina, è probabile che una via neurale differente da quella che controlla la risposta erettile sia coinvolta nel controllo di questa risposta a livello del BNST. Le sinapsi glutamatergiche su cui sono presenti i recettori ossitocinergici sono anche ricche di recettori dopaminergici (DA) del tipo D1/D2 attivati dalla liberazione di dopamina dai neuroni che originano nella VTA (Morari et al., 1998). Il blocco dei recettori D1 (da parte del SCH-23390), ma non dei recettori D2 (da parte dell'aloiperidolo), abolisce le risposte indotte dall'ossitocina, suggerendo che i recettori dopaminergici D1 e D2 esercitano un ruolo opposto nel controllo del rilascio di acido glutammico nel BNST quindi nei neuroni che provengono dal VS/Am. Infine, è anche possibile che l'attivazione della trasmissione glutamatergica da parte dell'ossitocina nel BNST attivi anche una via neurale che raggiunge l'area preottica mediale (MPOA), area ben nota per esercitare anche essa un ruolo chiave nel controllo dell'erezione peniena e del comportamento sessuale (Dominguez et al., 2006).

dell'ippocampo e amigdala, aree tutte implicate nel controllo della risposta erettile e dello sbadiglio direttamente o indirettamente attraverso altre aree interconnesse.

Tra queste ultime, le più conosciute sono il nucleo accumbens e la corteccia prefrontale mediale, che ricevono rispettivamente le proiezioni dopaminergiche dei sistemi mesolimbico e mesocorticale i cui corpi cellulari sono localizzati nell'area tegmentale ventrale e sono coinvolti anche nel controllo di queste risposte comportamentali (erezione peniena e sbadiglio, ma anche comportamento copulatorio) (vedi Hull et al., 1992; Dominguez et al., 2004, 2006; Iwasaki et al., 2010; Melis et al., 2010; Succu et al., 2011; Melis e Argiolas, 2011; Sanna et al., 2012a, 2015, 2017; Vigdorichik et al., 2012; Maejima et al., 2015).

Quanto all'abolizione dell'effetto pro-erettile e pro-sbadiglio dell'ossitocina iniettata nel BNST da parte dell'SCH-23390, antagonista dei recettori dopaminergici D1, ma non da parte dell'aloiperidolo, antagonista dei recettori dopaminergici D2, occorre ricordare che le sinapsi glutamatergiche dei neuroni che originano nel subicolo ventrale e nell'amigdala e in cui sono localizzati i recettori ossitocinergici la cui attivazione induce erezione peniena e sbadiglio, sono ricche di recettori dopaminergici D2, che inibiscono il rilascio di acido glutamico in analogia con quanto accertato sulla loro azione nel caudato-putamen (Morari et al., 1998). Infatti il BNST (così come lo shell del nucleo accumbens) riceve importanti proiezioni dopaminergiche dall'area tegmentale ventrale (de Olmos e Ingram, 1972; Phelix et al., 1992; Hasue e Shammah-Lagnado, 2002; Meloni et al., 2006). Dal momento che l'iniezione di aloiperidolo, antagonista dei recettori dopaminergici D2, nel BNST non previene l'erezione e lo sbadiglio indotti dall'ossitocina, l'effetto dell'ossitocina non sembra essere influenzato dall'aumento della liberazione di acido glutamico che si dovrebbe verificare dopo il blocco dei recettori D2 da parte dell'aloiperidolo (anche se esiste una tendenza all'aumento dell'erezione e sbadiglio indotta dall'ossitocina nei ratti trattati con aloiperidolo + ossitocina rispetto a quelli ratti con salina + ossitocina (vedi Figura 6).

Tuttavia, a differenza dell'aloiperidolo, l'SCH-23390, che blocca i recettori dopaminergici D1, abolisce l'erezione peniena e lo sbadiglio quando iniettata nel BNST prima dell'ossitocina. Questi risultati suggeriscono che l'ossitocina iniettata nel BNST aumenti anche la liberazione di dopamina, che agendo principalmente sui recettori D1, ma non D2, contribuisca ad aumentare la liberazione di acido glutamico indotta dall'ossitocina dalle suddette sinapsi glutamatergiche; acido glutamico che a sua volta attiva i neuroni glutamatergici che dal BNST proiettano all'ipotalamo (ipotalamo laterale, area preottica mediale e nucleo paraventricolare) e/o, tramite proiezioni di ritorno, all'area tegmentale ventrale, all'amigdala e al subicolo ventrale dell'ippocampo. È interessante ricordare che la capacità dell'SCH-23390 e

l'incapacità dell'aloiperidolo di inibire erezione peniena e sbadiglio indotte dall'ossitocina sono alquanto sorprendenti. Infatti, è ben noto che l'erezione e lo sbadiglio sono indotti da agonisti della dopamina principalmente del tipo D2 ma non del tipo D1 (Argiolas e Melis, 1995, 1998; Melis e Argiolas, 1995a, 1995b; Sanna et al., 2011, 2012b) (vedi anche Hull et al., 1992). Ciò suggerisce che il blocco dei recettori D1 (ma non D2) nel BNST in qualche modo interferisce con i meccanismi attivati dall'ossitocina nel BNST per indurre l'erezione peniena e lo sbadiglio. Se i recettori D1, il cui blocco da parte dell'SCH-23390 elimina le risposte indotte dall'ossitocina, si trovassero nelle stesse sinapsi glutamatergiche che presentano anche i recettori D2, ciò potrebbe indicare che i recettori D1 e D2 nelle terminazioni nervose glutamatergiche svolgono un ruolo opposto nel controllo della liberazione dell'acido glutamico, con il recettore D1 aumentandone e il D2 inibendone la liberazione. In linea con questa possibilità, è stato riportato che l'SCH-23390 iniettato nel BNST è in grado di bloccare l'auto-somministrazione endovenosa di cocaina nei ratti (Epping-Jordan et al., 1998) e di ridurre l'assunzione di alcool, mentre l'eticlopride, antagonista dei recettori D2 è risultato inefficace (Eiler et al., 2003). Anche se in parte complicata da pareri contrastanti riguardo alla presenza di recettori D1 nel BNST (alcuni autori riportano la loro presenza e altri la loro assenza, vedi Daniel e Rainnie, 2016), in accordo con questa interpretazione, esperimenti preliminari, fatti nel laboratorio dove si è svolto questo lavoro di tesi, suggeriscono che l'ossitocina iniettata nel BNST aumenta la liberazione di dopamina in questo nucleo (Bratzu et al., risultati non pubblicati). Ulteriori studi sono però necessari per dimostrare che il blocco dei recettori D1 davvero porti ad una diminuzione della trasmissione glutamatergica. Infatti, in alternativa alla suddetta ipotesi, i recettori dopaminergici D1, il cui blocco da parte del SCH-23390 elimina le risposte dell'ossitocina, potrebbero essere localizzati in altri neuroni ancora da identificare (eventualmente anche non glutamatergici), che potrebbero proiettare all'ipotalamo (nucleo laterale o paraventricolare), all'area preottica mediale, all'area tegmentale ventrale e/o al subicolo ventrale e amigdala, portando a sua volta all'attivazione delle vie neurali presenti non solo in queste aree ma anche con le aree connesse ad esse e che mediano la risposta erettile e lo sbadiglio.

Anche se non è ancora chiaro che ruolo abbia la dopamina nei meccanismi attivati dall'ossitocina per indurre l'erezione peniena e lo sbadiglio, i risultati discussi sinora suggeriscono che l'ossitocina iniettata nel BNST induce queste risposte comportamentali attivando principalmente la trasmissione glutamatergica. Qualche complicazione a questa interpretazione viene dall'incapacità del CNQX, antagonista selettivo dei recettori AMPA, di

abolire lo sbadiglio indotto dall'iniezione di ossitocina nel BNST. La ragione per cui il CNQX e l'(+)-MK-801 danno queste differenti risposte è sconosciuta. Una spiegazione potrebbe essere che il blocco selettivo dei recettori AMPA e NMDA nel BNST porti a cambiamenti differenti dell'attività dei circuiti neurali che controllano queste due risposte comportamentali.

Nell'interpretazione sopra riportata, non è stato assegnato nessun ruolo al GABA (uno dei neurotrasmettitori maggiormente presenti nel BNST) e ai neuroni GABAergici, sia quelli che originano nell'amigdala e nell'ippocampo e che proiettano al BNST (Dong e Swanson, 2006a,b,c), sia quelli che proiettano dal BNST all'ipotalamo e ai suoi nuclei (paraventricolare), e all'area tegmentale ventrale (Dong et al., 2001) nella mediazione dell'erezione peniena e dello sbadiglio indotti dall'iniezione di ossitocina nel BNST. Ciò è dovuto all'inefficacia degli antagonisti dei recettori GABAergici nell'influenzare le risposte comportamentali indotte dall'ossitocina nel BNST. Tuttavia, l'incapacità degli antagonisti GABAergici di alterare la risposta indotta dall'ossitocina, non esclude un possibile ruolo *per sé* dei neuroni GABAergici o quelli che proiettano alle aree al di fuori del BNST o quelli che innervano il BNST. Infatti, il rilascio di acido glutamico indotto dall'attivazione dei recettori per l'ossitocina nel BNST probabilmente non attiva solo i neuroni glutamatergici ma anche i neuroni GABAergici che proiettano alle aree coinvolte nell'erezione peniena e nello sbadiglio interferendo quindi con le risposte indotte dall'ossitocina. Anche se è improbabile che i neuroni GABAergici che proiettano al nucleo paraventricolare siano attivati dall'ossitocina iniettata nel BNST per facilitare l'erezione e lo sbadiglio, poiché gli agonisti GABAergici iniettati nel nucleo paraventricolare sono noti per ridurre queste risposte indotte dall'ossitocina (Argiolas e Melis, 2004, 2005; Melis e Argiolas, 2011), questa possibilità non può essere esclusa per i neuroni GABAergici che proiettano all'area tegmentale ventrale, all'ippocampo o all'amigdala. Inoltre, forse più rilevante per questo lavoro, i neuroni GABAergici originari dell'amigdala e che innervano il BNST, non solo contengono CRF, ma sono anche ricchi di mRNA per il recettore per l'ossitocina (Dabrowska et al., 2011). Ciò aumenta la possibilità che l'ossitocina iniettata nel BNST possa attivare anche sinapsi contenenti GABA e CRF per rilasciare GABA e CRF, come suggerito sopra per le sinapsi glutamatergiche. Tuttavia, dato che il blocco dei recettori GABA e CRF nel BNST da parte degli antagonisti GABA e degli antagonisti CRF, non è in grado di ridurre/abolire le risposte dell'ossitocina, è probabile che GABA e CRF rilasciati nel BNST siano coinvolti in altre funzioni in cui si ritiene che l'ossitocina svolga un ruolo importante (per esempio nell'ansia,

nello stress, ecc.) (Dabrowska et al., 2013a,b) piuttosto che nell'induzione dell'erezione peniena e dello sbadiglio.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati di questo studio mostrano che l'ossitocina iniettata nel BNST induce erezione peniena e sbadiglio. Evidenze neuroanatomiche, neurofarmacologiche e neurochimiche suggeriscono che quest'effetto è mediato dall'attivazione dei recettori per l'ossitocina localizzati nelle terminazioni sinaptiche glutamatergiche che impingono su neuroni che proiettano all'ipotalamo e al nucleo paraventricolare, all'area preottica mediale e/o all'area tegmentale ventrale, al subicolo ventrale dell'ippocampo e all'amigdala. Questi neuroni sono probabilmente glutamatergici e contengono NO sintetasi neuronale, che partecipa al meccanismo di attivazione di questi neuroni aumentando la produzione di NO.

Sebbene siano necessari ulteriori esperimenti per verificare questa possibilità, i risultati dello studio dimostrano che il BNST è un'altra area del cervello che partecipa al circuito complesso che controlla lo sbadiglio e sia la fase consumatoria (erezione peniena e comportamento sessuale) che la fase anticipatoria del comportamento sessuale (eccitazione sessuale e motivazione). In linea con questa ipotesi, il BNST è reciprocamente connesso a molte delle aree che partecipano a questo complesso circuito attraverso la dopamina, l'acido glutamico e le vie ossitocinergiche (Melis e Argiolas, 2011).

7. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

Alheid, G.F., 2003. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985, 185-205.

Alheid, G.F., Beltramino, C.A., De Olmos, J.S., Forbes, M.S., Swanson, D.J., Heimer, L., 1998. The neuronal organization of the supracapsular part of the stria terminalis in the rat: the dorsal component of the extended amygdala. *Neuroscience*.84(4), 967-96.

Alheid, G.F.; Heimer, L., 1988. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27, 1-39.

Anderson, J.R., Myowa-Yamakoshi, M., Matsuzawa, T., 2004. Contagious yawning in chimpanzees. *Proc Biol Sci.* 271 Suppl 6, S468-70.

Andersson, K.E. 2001. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev*; 53:417-450.

Argiolas A., Melis M.R., 1995. Neuromodulation of penile erection: an overview of the role of neurotransmitters and neuropeptides. *Prog. Neurobiol.* 47, 235-255.

Argiolas, A., 2002. Fisiologia dell'erezione peniena. La disfunzione erettile: sintomi e malattie. Cleup Editrice-Padova.

Argiolas, A., Melis, M.R., 2003. Neuroanatomia della funzione sessuale: sessualità appetitiva e sessualità consumatoria. *Seminari Pavesi di urologia.* 10, 61-71.

Argiolas, A., Melis, M.R., 2004. Meccanismi centrali dell'induzione erettiva fisiologica. *Andrologia e riproduzione.* Cleup Editrice-Padova.

Argiolas, A. 2005. Male erectile dysfunction: the chemical pharmacology of penile erection. *Drugs Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2005; 2:31-36.

Argiolas, A., Gessa, G.L., 1991. Central functions of oxytocin. *Neurosci Biobehav Rev.* 15(2), 217-31.

Argiolas, A., Melis, M.R., 1998. The neuropharmacology of yawning. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 1-16.

Argiolas, A., Melis, M.R., 2004. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol. Behav.* 83, 309-317.

Argiolas, A., Melis, M.R., 2005. Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog. Neurobiol.* 76, 1-21.

Argiolas, A., Melis, M.R., 2013. Neuropeptides and central control of sexual behavior from the past to the present: a review. *Prog. Neurobiol.* 108, 80-107.

- Argiolas, A., Melis, M.R., Gessa, G.L. 1986. Oxytocin: an extremely potent inducer of penile erection and yawning in male rats. *Eur J Pharmacol* 130(3), 265-72.
- Arletti, R., Calzà, L., Giardino, L., Benelli, A., Cavazzutti, E., Bertolini, A., 1997. Sexual impotence is associated with a reduced production of oxytocin and an increased production of opioid peptides in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neurosci Lett* 1997. 233,65-68.
- Bankowski, K., Manning, M., Seto, J., Halder, I., Sawyer, W.H., 1980. Design and synthesis of potent in vivo antagonists of oxytocin. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 16, 382-391.
- Baskerville, T.A., Douglas, A.J., 2010. Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neurosci Ther.* 16(3), e92-123.
- Beloate, L.N., Omrani, A., Adan, R.A., Webb, I.C., Coolen, L.M., 2016. Ventral tegmental area dopamine cell activation during male rat sexual behaviour regulates neuroplasticity and Damphetamine cross-sensitization following sex abstinence. *J. Neurosci.* 36, 9949-9961.
- Bertolini, A., Gessa, G.L., 1981. Behavioural effects of ACTH and MSH peptides. *J. Endocrinol. Inv.* 4, 241–251.
- Bota, M., Sporns, O., Swanson, L.W., 2012. Neuroinformatics analysis of molecular expression patterns and neuron populations in gray matter regions: the rat BST as a rich exemplar. *Brain Res.* 1450, 174-93.
- Cadeddu, R., Ibba, M., Sadile, A., Carboni, E., 2014. Antidepressants share the ability to increase catecholamine output in the bed nucleus of stria terminalis: a possible role in antidepressant therapy? *Psychopharmacology (Berl)*. 231(9), 1925-33.
- Calcagnoli, F., de Boer, S.F., Beidrbeck, D.I., Althaus, M., Koolhaas, J.M., Neumann, I.D., 2014. Local oxytocin expression and oxytocin receptor binding in the male rat brain is associated with aggressiveness. *Behav. Brain Res.* 261, 315-322.
- Caldwell, H.K., Lee, H.J., Macbeth, A.H., Young, W.S. 2008. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Prog Neurobiol.* 84, 1-24.
- Caldwell, H.K., Young, W.S. 2006. Oxytocin and Vasopressin: Genetics and Behavioral Implications, *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer US, pp. 573-607.
- Campbell, M.W., de Waal, F.B., 2011. Ingroup-outgroup bias in contagious yawning by chimpanzees supports link to empathy. *PLoS One.* 6(4), e18283.

Carboni, E., Silvagni, A., Rolando, M.T., Di Chiara, G., 2000. Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. *J. Neurosci.* 20:RC102.20.

Carmichael, M.S., Humbert, R., Dixen, J., Palmisano, G., Greenleaf, W., Davidson, J.M., 1987. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J Clin Endocrinol Metab.* 64(1), 27-31.

Choi D.C., Furay, A.R., Evanson, N.K., Ostrander, M.M., Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2007. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic pituitaryadrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J. Neurosci.* 27, 2025–2034.

Consiglio, A.R., Borsoi, A., Pereira, G.A.M., Lucion, A.B., 2005. Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bed nucleus of the stria terminalis on maternal aggressive behaviour in rats. *Phys. Behav.* 85, 354-362.

Coolen, L.M., Peters, H.J., Veening, J.G. 1996. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.* 738(1),67-82.

Coolen, L.M., Peters, H.J., Veening, J.G. 1998. Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. *J Comp Neurol.*397(3),421-35.

Crestani, C.C, Alves, F.H.F., Gomes, F.V., Resstel, L.B.M., Correa, F.M.A., Herman, J.P. 2013. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr. Neuropharmacology* 11, 141-159.

Cullinan, W.E.; Herman, J.P.; Watson, S.J., 1993.Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 332, 1-20.

Dabrowska, J., Hazra, R., Ahern, T.H., Guo, J.-D., McDonald, A.J., Mascagni, F., Muller, J.F., Young, L.J., Rainnie, D.G., 2011. Neuroanatomical evidence for reciprocal regulation of the corticotrophin-releasing factor and oxytocin systems in the hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: implications for balancing stress and affect. *Psychoneuroendocrinology* 36, 1312–1326.

Dabrowska, J., Hazra, R., Guo, J.-D., Dewitt, S., Rainnie, D.G., 2013a. Central CRF neurons are not created equal: phenotypic differences in CRF-containing neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis. *Front. Neurosci.* 7: 156.

Dabrowska, J., Hazra, R., Guo, J.-D., Li, C.C., DeWitt, S., Xu, J., Lombroso, P.J., Rainnie, D.G., 2013b. Striatal enriched protein tyrosine phosphatase-STEPs toward understanding chronic stress-induced activation of corticotrophin releasing factor neurons in the rat bed nucleus of the stria terminalis. *Biol. Psychiatry* 74, 817–826.

Daniel, S.E., Rainnie, D.G., 2016. Stress modulation of opposing circuits in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology* 41, 103-125.

De Olmos, J.S., Ingram, W.R., 1972. The projection field of the stria terminalis in the rat brain. An experimental study. *J. Comp. Neurol.* 146, 303-334.

Di Chiara, G., Tanda, G., Carboni, E., 1996. Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity. *Behav. Pharmacol.* 7, 640-657.

Dominguez, J.M., Gil, M., Hull, E.M., 2006. Preoptic glutamate facilitates male sexual behavior. *J. Neurosci.* 26, 1699-1703.

Dominguez, J.M., Muschamp, J.W., Schmich, J.M., Hull, E.M., 2004. Nitric oxide mediates glutamate-evoked dopamine release in the medial preoptic area. *Neuroscience* 125, 203-210.

Donaldson, Z.R., Young, L.J., 2008. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *322(5903)*, 900-4.

Dong, H.W., Petrovich, G.D., Swanson, L.W., 2001. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 192-246.

Dong, H.W., Swanson, L.W., 2003. Projections from the rhomboid nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis: Implications for cerebral hemisphere regulation of ingestive behaviors. *J. Comp. Neurol.* 463, 434–472.

Dong, H.W., Swanson, L.W., 2004. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 468, 277-298.

Dong, H.W., Swanson, L.W., 2006a. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine autonomic and drinking responses. *J. Comp. Neurol.* 494, 75–107.

Dong, H.W., Swanson, L.W., 2006b. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, magnocellular nucleus: Implications for cerebral hemisphere regulation of micturition, defecation, and penile erection. *J. Comp. Neurol.* 494, 108–141.

Dong, H.W., Swanson, L.W., 2006c. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J. Comp. Neurol.* 494, 142–178.

Du Vigneaud, V., 1954. Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. *Harvey Lect.* 50, 1-26.

Du Vigneaud, V., Ressler, C., Trippett, S., 1953. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *Biol Chem.* 205(2), 949-57.

Dumais, K.M., Alonso, A.G., Immormino, M.A., Bredewold, R., Veenema, A.H., 2016. Involvement of the oxytocin system in the bed nucleus of the stria terminalis in the sex-specific regulation of social recognition. *Psychoneuroendocrinology* 64, 79-88.

Eiler, W.J.A., Seyoum, R., Foster, K.L., Mailey, C., June, H.L., 2003. D1 dopamine receptor regulates alcohol-motivated behaviors in the bed nucleus of the stria terminalis in alcoholpreferring (P) rats. *Synapse* 48, 45–56.

Epping-Jordan, M.P., Markou, A., Koob, G.F., 1998. The dopamine D-1 receptor antagonist SCH-23390 injected into the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis decreased cocaine reinforcement in the rat. *Brain Res.* 784, 105-115.

Forray, M.I., Gysling, K., 2004. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res. Rev.* 47, 145-160.

Freedman, L.J., Cassell, M.D., 1994. Distribution of dopaminergic fibers in the central division of the extended amygdala of the rat. *Brain Res.* 633(1-2), 243-52.

Freund-Mercier, M.J., Stoeckel, M.E., Palacios, J.M., Pazos, A., Reichhart, J.M., Porte, A., Richard, P., 1987. Pharmacological characteristics and anatomical distribution of [3H]oxytocin-binding sites in the Wistar rat brain studied by autoradiography. *Neuroscience.* 20(2), 599-614.

Gafford, G.M., Ressler, K.J., 2015. GABA and NMDA receptors in CRF neurons have opposing effects in acquisition and anxiety in central amygdala vs. bed nucleus of the stria terminalis. *Horm. Behav.* 76, 136-142.

Gil, M., Bhatt, R., Picotte, K.B., Hull, E.M., 2011. Oxytocin in the medial preoptic area facilitates male sexual behavior in the rat. *Horm. Behav.* 59, 435-443.

Gil, M., Bhatt, R., Picotte, K.B., Hull, E.M., 2013. Sexual experience increases oxytocin receptor gene expression and protein in the medial preoptic area of the male rat. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1688-1697.

Giovenardi, M., Padoin, M.J., Cadore, L.P., Lucion, A.B., 1998. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav.* 63(3), 351-9.

- Giuliano, F., Rampin, O., 2000. Central neural regulation of penile erection. *Neurosci Biobehav* 24(5), 517-33.
- Grinevich, V., Knobloch-Bollmann, H.S., Eliava, M., Busnelli, M., Chini, B., 2016. Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. *Biol Psychiatry*. 79(3), 155-64.
- Guastella, A.J., Hickie, I.B., 2016. Oxytocin Treatment, Circuitry, and Autism: A Critical Review of the Literature Placing Oxytocin Into the Autism Context. *Biol Psychiatry*. 79(3),234-42.
- Hasue, R.H., Shammah-Lagnado. S.J., 2002. Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 454, 15–33.
- Heaton, J.P. 2000. Central neuropharmacological agents and mechanisms in erectile dysfunction: the role of dopamine. *Neurosci Biobehav Rev*; 24:561-569.
- Heimer, L., Alheid, G.F., 1991. Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 295, 1-42.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78-84.
- Hott, S.C., Gomes, F.V., Uliana, D.L., Vale, G.T., Tirapelli, C.R., Resstel, L.B.M., 2017. Bed nucleus of the stria terminalis NMDA receptors and nitric oxide modulate contextual fear conditioning in rat. *Neuropharmacology* 112, 135-143.
- Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2007. Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav.* 52(1), 45-55.
- Hull, E.M., Eaton, R.C., Markowski, V.P., Moses, J., Lumley, L.A., Loucks, J.A., 1992. Opposite influence of medial preoptic D1 and D2 receptors on genital reflexes: implications for copulation. *Life Sci.* 51, 1705-1713.
- Hull, E.M., Meisel, R.L., Sachs, B.D., 2002. Male sexual behavior. *Hormones, Brain and Behavior.* pp. 3-137. Eds. DW Pfaff, AP Arnold, AM Etgen, SE Fahrbach, RT Rubin. New York: Academic Press.
- Insel, T.R., 1992. Oxytocin--a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology.*17(1), 3-35.
- Insel, T.R., Shapiro, L.E. 1992. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(13), 5981-5.

- Insel, T.R., Young, L., Wang, Z. 1997. Central oxytocin and reproductive behaviours. *Rev Reprod.* 2(1), 28-37.
- Iwasaki, H., Jodo, E., Kawauchi, A., Miki, T., Kayama, Y., Hoyama, Y., 2010. Role of the lateral preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of penile erection. *Brain Res.* 1357, 70-78.
- Jalabert, M., Aston-Jones, G., Herzog, E., Manzoni, O., Georges, F., 2009. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the control of ventral tegmental area dopamine neurons. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 1336–1346.
- Jirikowski, G.F., Ramalho-Ortigao, F., Seliger, H., 1988. In situ hybridization with complementary synthetic oligonucleotide and immunocytochemistry: a combination of methods to study transcription and secretion of oxytocin by hypothalamic neurons. *Mol Cell Probes.* 2(1), 59-64.
- Ju, G. Han, Z.S., 1989. Coexistence of corticotropin releasing factor and neurotensin within oval nucleus neurons in the bed nuclei of the stria terminalis in the rat. *Neurosci Lett.* 99(3), 246-50.
- Kash, T.L., Pleil, K.E., Marcinkiewicz, C.A., Lowery-Gionta, E.G., Crowley, N., Mazzone, C., Sugam, J., Hardaway, J.A., McElligott, Z.A., 2015. Neuropeptide regulation of signaling and behavior in the BNST. *Mol Cells.* 38(1), 1-13.
- Kimura, T., Saji, F., Nishimori, K., Ogita, K., Nakamura, H., Koyama, M., Murata, Y., 2003. Molecular regulation of the oxytocin receptor in peripheral organs. *J Mol Endocrinol.* 30(2), 109-15.
- Krawczyk, M., Georges, F., Sharma, R., Mason, X., Berthet, A., Bézard, E., Dumont, E.C., 2011. Double-dissociation of the catecholaminergic modulation of synaptic transmission in the oval bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurophysiol.* 105(1), 145-53.
- Krawczyk, M., Mason, X., DeBacker, J., Sharma, R., Normandeau, C.P., Hawken, E.R., Di Prospero, C., Chiang, C., Martinez, A., Jones, A.A., Doudnikoff, É., Caille, S., Bézard, E., Georges, F., Dumont, É.C., 2013. D1 dopamine receptor-mediated LTP at GABA synapses encodes motivation to self-administer cocaine in rats. *J Neurosci.* 33(29), 11960-71.
- Lebow, M.A., Chen, A., 2016. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 21, 450-463.
- Lien, Y.J., Chang, H.H., Tsai, H.C., Kuang Yang, Y., Lu, R.B., See Chen, P., 2017. Plasma oxytocin levels in major depressive and bipolar II disorders. *Psychiatry Res.* S0165-1781(17)30101-4.

- Liu, Y.C., Salamone, J.D., Sachs, B.D., 1997a. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J. Neurosci.* 17, 5245–5253.
- Liu, Y.C., Salamone, J.D., Sachs, B.D., 1997b. Impaired sexual response after lesions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in male rats. *Behav Neurosci.* 111, 1361–1367.
- Love, T.M., Oxytocin, motivation and the role of dopamine. 2014. *Pharmacol Biochem Behav.* 119, 49-60.
- Maejima, S., Ohishi, N., Yamaguchi, S., Tsukahara, S., 2015. A neural connection between the central part of the medial preoptic nucleus and the bed nucleus of the stria terminalis to regulate sexual behavior in male rats. *Neurosci. Lett.* 606, 66–71.
- McKenna, K.E. 2000. Some proposals regarding the organization of the central nervous system control of penile erection. *Neurosci Biobehav.* 24: 535-540.
- Meisel, R.L., Sachs, B.D., 1994. The physiology of male sexual behaviour. In: *The Physiology of Reproduction.* 2, 3-96.
- Meisel, R.L., Sachs, B.D., 1994. The physiology of male sexual behaviour. In *The Physiology of Reproduction*, vol. 2, second edition. pp. 3-96. Eds. E. Knobil, J. Neil. New York: Raven Press.
- Melis, M.R., Argiolas A., 1995. Dopamine and sexual behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19:19- 38.
- Melis, M.R., Argiolas, A. 2003. Central oxytocinergic neurotransmission: A drug target for the therapy of psychogenic erectile dysfunction. *Curr Drug Targets;* 4:55-66.
- Melis, M.R., Argiolas, A., 1995. Nitric oxide donors induce penile erection and yawning when injected in the central nervous system of male rats. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 1-9.
- Melis, M.R., Argiolas, A., 2011. 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.* 35, 939-955.
- Melis, M.R., Argiolas, A., Gessa, G.L., 1986. Oxytocin-induced penile erection and yawning: site of action in the brain, *Brain Res.* 398, 259-265.
- Melis, M.R., Melis, T., Cocco, C., Succu, S., Sanna, F., Pillolla, G., Boi, A., Ferri, G.L., Argiolas, A., 2007. Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extra-cellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1026-1035.

- Melis, M.R., Succu, S., Argiolas, A., 1996. Dopamine agonists increase nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: correlation with penile erection and yawning. *Eur J Neurosci.* 8, 2056-2063.
- Melis, M.R., Succu, S., Cocco, C., Caboni, E., Sanna, F., Boi, A., Ferri, G.L., Argiolas, A., 2010. Oxytocin induces penile erection when injected into the ventral subiculum: role of nitric oxide and glutamic acid. *Neuropharmacology* 58, 1153-1160.
- Melis, M.R., Succu, S., Mauri, A., Argiolas, A., 1998. Nitric oxide production is increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats during non-contact penile erections and copulation. *Eur J Neurosci.* 10, 1968-1974.
- Melis, M.R., Succu, S., Sanna, F., Boi, A., Argiolas, A., 2009. Oxytocin injected into the ventral subiculum or the posteromedial cortical nucleus of the amygdala induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens of male rats. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1349-1357.
- Meloni, E.G., Gerety, L.P., Knoll, A.T., Cohen, B.M., Carlezon, W.A., 2006. Behavioral and anatomical interactions between dopamine and corticotropin-releasing factor in the rat. *J. Neurosci.* 26, 3855–3863.
- Monteleone, A.M., Scognamiglio, P., Volpe, U., Di Maso, V., Monteleone, P., 2016. Investigation of Oxytocin Secretion in Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa: Relationships to Temperament Personality Dimensions. *Eur Eat Disord Rev.* 24(1), 52-6.
- Morari, M., Marti, M., Sbrenna, S., Fuxe, K., Bianchi, C., Beani, L., 1998. Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. *Neurochem. Int.* 33, 383-397.
- Paxinos, G., Watson, C., 2004. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed., Academic Press - Elsevier.
- Murphy, M.R., Seckl, J.R., Burton, S., Checkley, S.A., Lightman, S.L., 1987. Changes in oxytocin and vasopressin secretion during sexual activity in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 65(4), 738-41.
- Palagi, E., Leone, A., Mancini, G., Ferrari, P.F., 2009. Contagious yawning in gelada baboons as a possible expression of empathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(46), 19262-7.
- Park, J., Bucher, E.S., Budygin, E.A., Wightman, R.M., 2015. Norepinephrine and dopamine transmission in 2 limbic regions differentially respond to acute noxious stimulation. *Pain.* 156(2), 318-27.
- Parker, K.J., Oztan, O., Libove, R.A., Sumiyoshi, R.D., Jackson, L.P., Karhson, D.S., Summers, J.E., Hinman, K.E., Motonaga, K.S., Phillips, J.M., Carson, D.S., Garner, J.P., Hardan, A.Y., Intranasal oxytocin treatment for social deficits and biomarkers of response in children with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(30), 8119-8124.

- Paukner, A., Anderson, J.R., 2006. Video-induced yawning in stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *Biol Lett.* 2(1), 36-8.
- Pedersen, C.A., Caldwell, J.D., Peterson, G., Walker, C.H., Mason, G.A., 1992. Oxytocin activation of maternal behavior in the rat. *652*, 58-69.
- Pedersen, C.A., 1997. Oxytocin control of maternal behavior. Regulation by sex steroids and offspring stimuli. *807*, 126-45.
- Petersson, M. 2002. Cardiovascular effects of oxytocin. *Prog Brain Res.* 139, 281-8.
- Petrulis, A., 2013. Chemosignals and hormones in the neural control of mammalian sexual behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 34, 255–267.
- Pfaff, D., Keiner, M., 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol.* 151(2), 121-58.
- Phelix, C.F., Liposits, Z., Paull, W.K., 1992. Serotonin-CRF interaction in the bed nucleus of the stria terminalis: a light microscopic double-label immunocytochemical analysis. *Brain Res. Bull.* 28, 943-948.
- Phelix, C.F., Liposits, Z., Paull, W.K., 1994. Catecholamine-CRF synaptic interaction in a septal bed nucleus: afferents of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res Bull.* 33(1), 109-19.
- Radley, J.J., Sawchenko, P.E., 2011. A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *J. Neurosci.* 31, 9683-9695.
- Sachs, B.D., Barfield, R.J., 1976. Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. *Adv. Stud. Behav.* 7, 91-154.
- Sachs, B.D. 2000. Contextual approaches to the physiology and classification of erectile function, erectile dysfunction, and sexual arousal. *Neurosci Biobehav Rev*; 24: 541-560.
- Sachs, B.D., 2007. A contextual definition of male sexual arousal. *Horm Behav.* 51(5), 569-78.
- Sanna, F., Argiolas, A., Melis, M.R., 2012a. Oxytocin-induced yawning: sites of action in the brain and interaction with mesolimbic/mesocortical and incertohypothalamic dopaminergic neurons in male rats. *Horm. Behav.* 62, 505-514.
- Sanna, F., Bratzu, J., Piludu, M.A., Corda, M.G., Melis, M.R., Giorgi, O., Argiolas, A., 2017. Dopamine, noradrenaline and differences in sexual behavior between Roman High- and Low Avoidance male rats: a microdialysis study in the medial prefrontal cortex. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 108.

- Sanna, F., Piludu, M.A., Corda, M.G., Melis, M.R., Giorgi, O., Argiolas, A., 2015. Involvement of dopamine in the differences in sexual behavior between roman high and low avoidance rats: an intracerebral microdialysis study. *Behav. Brain Res.* 281, 177-186.
- Sanna, F., Succu, S., Hubner, H., Gmeiner, P., Argiolas, A., Melis, M.R., 2011. 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.* 225, 169-176.
- Sanna, F., Succu, S., Melis, M.R., Argiolas, A., 2012b. Dopamine agonist-induced penile erection and yawning: differential role of D2 like receptors and correlation with nitric oxide production in the paraventricular nucleus of male rats. *Behav. Brain Res.* 230, 355-64.
- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., 1983. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 218, 121-144.
- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Vale W.W., 1984. Corticotropin releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin- and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J. Neurosci.* 4, 1118-1129.
- Scibilia, R.J., Lachowicz, J.E., Kilts, C.D., 1992. Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse.* 11(2), 146-54.
- Sofroniew, M.V., 1983. Morphology of vasopressin and oxytocin neurons and their central and vascular projections. *Prog. Brain Res.* 60, 101-114.
- Stamatakis, A.M., Sparta, D.R., Hennings, J.H., McElligott, Z.A., Decot, H., Stuber, G.D., 2014. Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis circuitry: implications for addiction-related behaviors. *Neuropharmacology* 76, 320-328.
- Succu, S., Sanna, F., Argiolas, A., Melis, M.R., 2011. Oxytocin injected into the hippocampal ventral subiculum induces penile erection in male rats by increasing glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* 61, 181-188.
- Succu, S., Sanna, F., Cocco, C., Melis, T., Boi, A., Ferri, G.L., Argiolas, A., Melis, M.R., 2008. Oxytocin induces penile erection when injected into the ventral tegmental area of male rats: role of nitric oxide and cyclic GMP. *Eur. J. Neurosci.* 28, 813-821.
- Sun, N., Cassell, M.D., 1993. Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol.* 330(3), 381-404.

- Valcourt, R.J., Sachs, B.D., 1979. Penile reflexes and copulatory behavior in male rats following lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res. Bull.* 4, 131–133.
- Veening, J.G., Coolen, L.M., 2014. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav.* 121, 170-83.
- Vigdorchik, A.V., Parrish, B.P., Lagoda, G.A., McHenry, J.A., Hull, E.M., 2012. An NMDA antagonist in the MPOA impairs copulation and stimulus sensitization in male rats. *Behav. Neurosci.* 126, 186-195.
- Walaas, I., Fonnum, F. 1979. The distribution and origin of glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in ventral pallidum and other basal forebrain regions. *177(2)*, 325-36.
- Walker, D.L., Miles, L.A., Davis, M. 2009. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(8), 1291-308.
- Walusinski, O. 2009. Yawning in diseases. *Eur Neurol.* 62(3),180-7.
- Wilson, B.C., Terenzi, M.G., Ingram, C.D., 2005. Differential excitatory responses to oxytocin in sub-divisions of the bed nuclei of the stria terminalis. *Neuropeptides* 39, 403-407.
- Yang, H.P., Wang, L., Han, L., Wang, S.C., 2013. Nonsocial functions of hypothalamic oxytocin. *ISRN Neurosci.*179272.