



Università di Pisa

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E
SPERIMENTALE

Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia

**RELAZIONE TRA OSSITOCINA E
ATTACCAMENTO ROMANTICO**

Anno accademico 2013/2014

Candidata:

Giulia Tonini

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa
Liliana Dell'Osso

INDICE

Riassunto.....	4
Indice delle figure	7
Capitolo 1. Ossitocina.....	8
1.1 Cenni storici.....	8
1.2 Aspetti generali.....	10
1.3 Sintesi dell'ossitocina	13
1.4 Sintesi e localizzazione	18
1.5 Gene dell'ossitocina.....	23
1.6 Recettore dell'ossitocina	25
1.7 Funzioni dell'ossitocina.....	30
<i>1.7.1 Funzioni periferiche dell'ossitocina.....</i>	<i>30</i>
<i>1.7.2 Funzioni dell'ossitocina a livello del sistema nervoso centrale</i>	<i>33</i>
Capitolo 2. L'attaccamento.....	41
2.1 Introduzione	41
2.2 Attaccamento infantile	48
2.3 Attaccamento materno.....	52
2.4 La motivazione materna: il ratto.....	53
2.5 Comportamento materno selettivo: la pecora	57
2.6 BDNF e attaccamento: studi sull'animale.....	61
Capitolo 3. L'attaccamento romantico come prototipo dell'attaccamento umano	66
3.1 Attaccamento romantico.....	66
<i>3.1.1 Aspetti neurobiologici dell'attrazione.....</i>	<i>69</i>
<i>3.1.2 Aspetti neurobiologici dell'attaccamento.....</i>	<i>77</i>

3.1.3	<i>Stili di attaccamento</i>	84
3.2	Scopo della tesi	93
3.3	Materiali e metodi	94
3.3.1	<i>Soggetti</i>	94
3.3.2	<i>Strumenti</i>	95
3.3.3	<i>Preparazione del plasma</i>	96
3.3.4	<i>Cromatografia</i>	97
3.3.5	<i>Estrazione del peptide dal plasma</i>	101
3.3.6	<i>Determinazione della concentrazione proteica...</i>	103
3.3.7	<i>Dosaggio Radioimmunologico (RIA)</i>	105
3.3.8	<i>Dosaggio Radioimmunologico dell'ossitocina</i>	117
3.3.9	<i>Analisi Statistiche</i>	120
3.4	Risultati	121
3.4.1	<i>Curva di Taratura Standard</i>	123
3.4.2	<i>Correlazione tra livelli plasmatici di ossitocina e scala "ansietà" dell'ECR</i>	124
3.4.3	<i>Distribuzione degli stili di attaccamento</i>	125
3.4.4	<i>Grafico confronto maschi-femmine</i>	126
3.5	Discussione	127
	APPENDICE	131
	BIBLIOGRAFIA	134
	RINGRAZIAMENTI	148

Riassunto

E' noto da tempo che l'ossitocina gioca un ruolo chiave durante il parto, l'allattamento e le corrispondenti attività nell'ipotalamo, adenoipofisi e sistema nervoso autonomo. Negli ultimi anni, a queste funzioni "classiche", si sono aggiunti numerosi dati che hanno evidenziato un suo spettro di azioni più ampie che riguardano principalmente la modulazione del cosiddetto comportamento sociale. In particolare, sembra che l'ossitocina sia uno dei mediatori principali dei meccanismi neurobiologici che sottendono ogni tipologia di attaccamento, da quello materno-infantile a quello tra due partner adulti.

Obiettivi: Dato che l'attaccamento romantico è uno dei prototipi delle relazioni sociali umane, scopo del presente studio è stato quello di valutare le possibili relazioni tra i livelli plasmatici di ossitocina e l'attaccamento romantico in un gruppo di soggetti sani.

Soggetti e Metodi: Sono stati inseriti nello studio quarantacinque soggetti fisicamente sani e con anamnesi negativa per disturbi psichiatrici, di cui dodici di sesso maschile e trentatré di sesso femminile, di età compresa tra i 31.5 ± 6.2 anni, selezionati tra gli specializzandi della Clinica Psichiatrica dell'ospedale S.Chiera di

Pisa. Tali soggetti hanno compilato il questionario “Experiences in Close Relationships” (ECR), per valutare l’attaccamento romantico. L’ECR permette di classificare ciascun partecipante secondo uno dei quattro stili di attaccamento romantico identificati, vale a dire “preoccupato”, “timoroso”, “distanziante” o “sicuro”.

Ai soggetti sono stati prelevati 20 cc di sangue, da cui si è ottenuto il plasma trattato con aprotinina e conservato a -70°C . Per l’estrazione del peptide ogni campione è stato acidificato con eguale quantità di soluzione A (1% acido trifluoroacetico in H_2O) e poi centrifugato. Il soprannatante ottenuto è stato poi caricato su colonna cromatografica C18, al fine di ottenere un eluato contenente il peptide. Quest’ultimo è stato poi sottoposto a dosaggio radioimmunologico (RIA).

Risultati: I livelli plasmatici di ossitocina ottenuti erano compresi in un intervallo tra 0.13 e 4.59 pg/ml, senza differenze legate al sesso o tra soggetti che avevano o non avevano una relazione affettiva.

E’ stata osservata una correlazione significativa e positiva tra la scala “ansietà” dell’ ECR e i livelli plasmatici di ossitocina ($r = 0.30$, $p = 0.045$). Per quanto riguarda gli stili di attaccamento individuati, è stata osservata la tendenza a maggiori concentrazioni di ossitocina nel plasma dei soggetti “preoccupati”.

Conclusione: In accordo con la maggior parte dei dati attualmente disponibili, è possibile avanzare l'ipotesi che la relazione positiva tra i livelli di ossitocina e la scala "ansietà" dell' ECR possa rappresentare un meccanismo compensatorio per favorire l'attaccamento verso un partner, ossia un estraneo che istintivamente genera timore e paura. L'ossitocina, quindi, modulando l'ansia e riducendola, promuoverebbe l'accettazione da parte dell' individuo del rischio implicito nei legami sociali e, come tale, può essere considerata un elemento essenziale nell'assicurare il piacere ed i benefici insiti nell'incontro degli altri.

Indice delle figure

Figura 1. Sequenza completa preproossifisina e specifici siti di taglio.	14
Figura 2. Neuroipofisi e neuroni ipotalamici.	19
Figura 3. Recettore dell'ossitocina.	29
Figura 4. Autoradiografia cervello di <i>Microtus monogama</i> in confronto a cervello di <i>Microtus promiscua</i>	37
Figura 5. Circuito del sistema di “reward”	51
Figura 6. Processo di derivattizzazione.....	101
Figura 7. Retta di taratura dell'albumina bovina.	105
Figura 8. Retta di taratura dell'ossitocina.	123
Figura 9. Correlazione tra livelli plasmatici di ossitocina e scala “ansietà” dell'ECR.	124
Figura 10. Distribuzione dei quattro stili di attaccamento romantico dell'ECR e livelli plasmatici di ossitocina.....	125
Figura 11. Livelli plasmatici di ossitocina nei soggetti di sesso maschile e femminile.	126

Capitolo 1. Ossitocina

1.1

Cenni storici

Le origini della ricerca sui neuropeptidi risalgono alla fine del 1800, quando G. Oliver e E.A. Schafer fornirono le prime evidenze riguardo alle diverse funzioni svolte dalla ghiandola pituitaria posteriore. Il ricercatore R.Y. Cajal, nel medesimo periodo storico, descrisse per la prima volta l'azione dei nuclei ipotalamici sull'ipofisi posteriore.

Nel 1930 B. Sherrer dimostrò che certi neuroni nell'ipotalamo dei vertebrati secernono sostanze per esocitosi come cellule neurosecretrici.

Successivamente, nel 1951, W. Bargmon e E. Scharrer stabilirono definitivamente l'esistenza e l'importanza dei due neuropeptidi ossitocina e vasopressina, definendo come questi siano sintetizzati nell'ipotalamo e trasportati attraverso le vie sopraottica e paraventricolare alla parte posteriore della ghiandola.

Qualche anno più tardi, nel 1955, W. Du Vigneaud isolò, sequenziò e sintetizzò l'ossitocina a partire da omogenato di ghiandola ipofisaria posteriore.

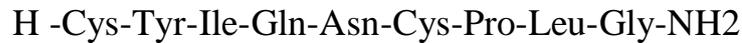
Intorno agli anni '70, sono state descritte proiezioni rilascianti l'ossitocina dall'ipotalamo ad aree limbiche, e si così aperta la strada a nuovi studi a livello del sistema nervoso centrale, fino al 1991, in cui il ricercatore F. Loup ed i suoi collaboratori effettuarono la prima autoradiografia su cervelli umani per definire la localizzazione dei recettori dell'ossitocina nelle diverse aree cerebrali.

Da allora, si sono sviluppati diversi filoni di ricerca che hanno portato a stabilire come l'ossitocina sia un mediatore fondamentale di numerosi processi e comportamenti, tra cui, in particolare, il comportamento sociale (Buijss et al., 1979; Loup et al., 1991; Landgraf et al., 2004).

1.2

Aspetti generali

L'ossitocina è un ormone peptidico, costituito da una sequenza di soli nove aminoacidi, comprendente un ponte disolfuro tra due residui di cisteina. Tale caratteristica determina una conformazione ciclica della sua struttura, nonché la definizione di nonapeptide ciclico:



È un ormone tipico dei mammiferi. La sede principale della sua sintesi è l'ipotalamo, da cui è trasportata in altre sedi, in particolare alla neuroipofisi, nonché a numerose altre aree del SNC, come dimostrato da studi dell'ultimo ventennio.

È stata purificata e sequenziata nel 1953, ed è stata il primo ormone peptidico ad essere stato sintetizzato in laboratorio a scopo farmacologico in forma biologicamente attiva (Du Vigneaud et al., 1953).

Il gene corrispondente è stato isolato nel 1984 (Ivell et. al., 1984), mentre la struttura del recettore è stata definita nel 1992 (Kimura et al., 1992).

All'ossitocina è strettamente relazionata un altro ormone peptidico, vale a dire, l'arginin-vasopressina, di struttura molto simile al precedente, fatta eccezione dei due residui in posizione 3 e 8, occupati in questo caso da fenilalanina e arginina, determinanti nell'interazione con i rispettivi recettori.

Questi due peptidi sono presenti esclusivamente nei mammiferi placentati e fanno parte della superfamiglia dei nonapeptidi ciclici vasopressina-ossitocina, la quale comprende diverse specie di peptidi correlati tra loro strutturalmente, funzionalmente e filogeneticamente, diffusi dagli invertebrati ai vertebrati, e che nel corso dell'evoluzione hanno conservato le loro funzioni. La diffusione nei vari phyla dei nonapeptidi omologhi, in particolare la loro presenza nei ciclostomi e negli invertebrati (con vasotocina, conopressina), le somiglianze tra ossitocina e vasopressina e la vicinanza dei loci dei rispettivi geni, localizzati sullo stesso cromosoma, hanno fondato l'ipotesi che le due famiglie si siano evolute parallelamente a partire dalla duplicazione di un gene ancestrale avvenuta molto precocemente rispetto all'evoluzione dei vertebrati, ossia, circa 600 milioni di anni fa, prima della divergenza tra invertebrati e vertebrati (Van Kesteren et al., 1992).

Nonostante le strette relazioni tra i due composti, questi sono coinvolti in funzioni diverse e molto spesso opposte.

Risalenti teorie attribuivano a questi peptidi il ruolo e la denominazione di ormoni, in quanto il sistema ipotalamo-ipofisario era considerato l'unico sito di sintesi. Tuttavia, molte scoperte effettuate nelle ultime decadi hanno maturato la convinzione che oggi tali peptidi siano veri e propri neuromodulatori e neurotrasmettitori.

Difatti, non sono state individuate solo loro azioni come ormoni nel SNC, ma anche un loro rilascio come neurotrasmettitori classici (Raggenbas et al., 2000).

I ruoli dell'ossitocina finora individuati nei mammiferi sono molteplici, sia a livello periferico che centrale. Innanzitutto è noto da tempo il suo coinvolgimento nella gravidanza e nell'allattamento (Russel et al., 1998; 2001).

Più di recente, si è visto, che l'ossitocina sarebbe fondamentale nella regolazione dei comportamenti sociali e nell'attaccamento dei mammiferi, compreso l'uomo (Keverne et al., 2004). In definitiva, favorirebbe le attività tipiche dei mammiferi. Per questo motivo, questo minuscolo peptide viene considerato essenziale per la sopravvivenza e il perpetuarsi della specie (Keverne et al., 2004).

1.3

Sintesi dell'ossitocina

L'ossitocina viene sintetizzata a partire da un precursore polipeptidico più grande, ovvero un proormone chiamato preproossifisina. Quest'ultima comprende una sequenza segnale, la sequenza dell'ormone stesso e quella della sua proteina vettore, chiamata neurofisina I. Queste ultime due sequenze sono legate tra loro dalla sequenza GKR, rappresentata dal tripeptide Gly-Lys-Arg.

La preprossifisina è stata isolata nel 1977 attraverso tecniche di focalizzazione isoelettrica (Gainer et al., 1980) e sequenziata successivamente grazie alla sintesi del cDNA, ottenuto nel 1983 da lisato di ipofisi di bovino (Land et al., 1983). È composta da una sequenza di oltre 100 aminoacidi (AA) con un peso molecolare di 20 kDa. Nell'uomo è generata dall'espressione di un gene costituito da tre esoni localizzato nel cromosoma 20 (Rao et al., 1992). Il primo esone codifica per la sequenza segnale, per il nonapeptide, per il tripeptide GKR e per i primi 10 AA della neurofisina. Il secondo e terzo esone codificano rispettivamente per la parte centrale e carbossi-terminale della neurofisina. Quest'ultima, a sua volta, è costituita da circa 95 residui, tra cui molti aminoacidi cisteina impegnati in ponti

disolfuro. La funzione della neurofisina non è ancora ben chiara, ma si ritiene che sia fondamentale nel trasporto, nel ripiegamento e nell'immagazzinamento dell'ormone ossitocina prima che questo venga rilasciato.

La sequenza del proormone può essere dunque così rappresentata:

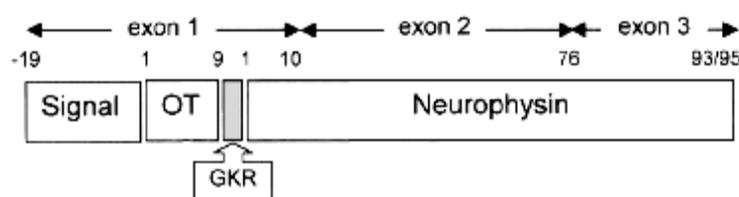


Figura 1. Sequenza completa preproossifisina e specifici siti di taglio.

Questa struttura, una volta sintetizzata, va incontro a un processamento enzimatico post-traduzionale, dato dalla combinazione di diverse attività enzimatiche agenti in modo consecutivo a diversi livelli e determinanti nella liberazione della forma biologicamente attiva dell'ossitocina.

Innanzitutto, un enzima ad attività endoproteasica dibasica opera un taglio endoproteolitico tra l'AA basico arginina della sequenza GKR ed il resto della neurofisina, dando così luogo all'intermedio ossitocinil-Gly-Lys-Arg, pertanto separato dalla neurofisina (Clamagirand et al., 1986). Tale enzima, individuato e purificato nel

1986, è stato recentemente classificato come appartenente ad una famiglia di endoproteasi tipica dei mammiferi, definita proormone convertasi (PC). Tali enzimi riconoscono con alta specificità substrati rappresentati da uno o due AA basici. In merito alla preproossifisina, questa attività enzimatica è svolta dal membro PC2 (von Eggelkraut-Gottanka et al., 2004).

Successivamente, avviene la rimozione sequenziale dei due residui lisina e arginina per azione di un secondo enzima ad attività esoproteasica specifica per coppie di AA basici terminali, rappresentato da una carbossipeptidasi di tipo B, anch'essa isolata da lisato di neuroipofisi di bovino (Fricker et al., 1986).

Da questa rimozione si ottiene il peptide intermedio ossitocinil-Gly, che subisce l'azione di un enzima peptidil-glicina alfa-amidato-monoossigenasi (alfa-AE), ovvero un enzima con attività di alfa ammidazione sul residuo aggiuntivo gly (gly numero 10 della sequenza GKR), con l'impiego di ossigeno molecolare. L'enzima converte il precursore ossitocinil-gli-COOH nel composto finale ossitocinil-NH₂, vale a dire la forma matura dell'ormone (Eipper et al., 1983; 1993).

Dopo l'ultimo passaggio la molecola dell'ossitocina è caratterizzata a una delle estremità dalla presenza di un gruppo amminico terminale

aggiuntivo. All'altra estremità è presente una struttura ciclica, generata dalla formazione all'interno della molecola, di un ponte disolfuro tra i due residui di cisteina. L'ammino-gruppo terminale, la struttura ciclica, insieme agli aminoacidi cisteina 1, tirosina 2 e leucina 8, sembrano fondamentali per le attività biologiche dell'ormone (Gimpl et al., 2001).

Tramite studi di cristallografia, si è osservato che dopo il taglio endoproteolitico, i precursori intermedi del peptide e il peptide maturo stesso rimangono intimamente legati alla neurofisina tramite legami di tipo non covalente, rappresentati da interazioni elettrostatiche e da legami idrogeno. Tali interazioni, nel precursore di partenza e nel processato, risultano analoghe e sostenute principalmente dai residui cisteina e tirosina in posizione 1 e 2 dell'anello dell'ormone. E' stata infatti dimostrata sperimentalmente una certa affinità di questi composti intermedi per la neurofisina corrispondente (Eubanks et al., 1999).

Tali interazioni determinano innanzitutto la formazione di dimeri di neurofisina che, tramite folding ed assemblamento multimolecolare, si organizzano in aggregati macromolecolari ordinati di maggiore entità. Quest'ultimo aspetto modulerebbe l'attività degli enzimi sopra citati, proteggendo l'intera struttura da un'eccessiva digestione enzimatica

prima della liberazione dell'ormone maturo al momento opportuno
(Shojio et al., 1988).

1.4

Sintesi e localizzazione

Nei mammiferi l'ossitocina, come la vasopressina, viene sintetizzata principalmente nell'ipotalamo, precisamente a livello dei neuroni magnocellulari presenti nei nuclei Soprattico (SON) e Paraventricolare (PVN), nonché in piccoli nuclei accessori, localizzati tra i primi due. Gli assoni di tali neuroni si dirigono al lobo posteriore dell'ipofisi, o neuroipofisi. In quest'ultima sede, costituita essenzialmente dalle terminazioni di questi neuroni, vengono trasportati i due peptidi che vengono immagazzinati e rilasciati nel circolo sistemico in risposta a determinati stimoli. La vasopressina viene prodotta prevalentemente nel SON, mentre l'ossitocina soprattutto nel PVN: in entrambi i nuclei sono presenti cellule secernenti uno dei due, o entrambi gli ormoni. L'organizzazione di questi neuroni è simile in tutti i mammiferi (Sukhov et al., 1993).

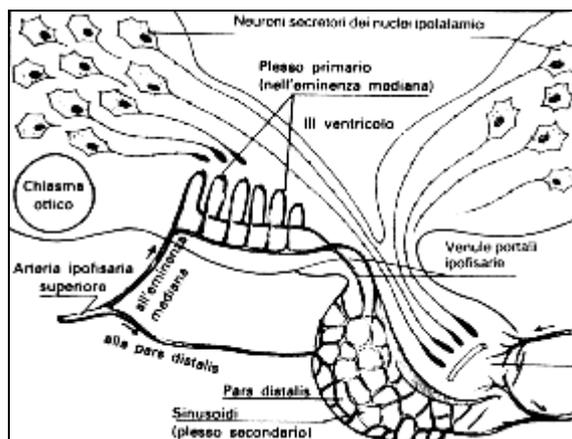


Figura 2. Neuroipofisi e neuroni ipotalamici.

Nel nucleo paraventricolare, oltre ai magnocellulari, è stata individuata una seconda popolazione di cellule che sintetizzano i due peptidi, ovvero i neuroni parvocellulari che mandano proiezioni a tutto il SNC e nessuna verso la neuroipofisi.

Studi su animali e campioni umani autoptici hanno dimostrato che tali neuroni proiettano alle aree limbiche (amigdala, nucleo basale della stria terminale, setto laterale, locus coeruleus e diverse aree ippocampali) e ai centri mesencefalici, tronco-encefalici e spinali (Swanson e Kuypers, 1980; Sofroniew et al., 1981; Buijs et al., 1983; Wagner e Clements, 1983; Fliers et al., 1986).

L'ampia diffusione delle terminazioni parvocellulari nel SNC dei mammiferi deriva dai numerosi studi effettuati sui ratti. Infatti, nel cervello di ratto le proiezioni ossitocinergiche dei neuroni parvocellulari riguardano i nuclei ipotalamici dorso-mediali, i nuclei

talamici, l'ippocampo dorsale e ventrale, il subiculum, la corteccia entorinale, i nuclei settali medio e laterale, amigdala, il bulbo olfattivo, il nucleo mesencefalico centrale, la substantia nigra, il locus coeruleus, i nuclei del rafe, il nucleo del tratto solitario, il nucleo motore dorsale del nervo vago, la ghiandola pineale, il cervelletto e il midollo spinale (Buijs et al., 1985; Sawchenko et al., 1985; Sofroniew et al., 1985; Kozłowski et al., 1986; Richard et al., 1991).

La vasopressina è sintetizzata anche nel nucleo soprachiasmatico che fa parte dell'ipotalamo ed è coinvolto nella regolazione dei ritmi circadiani.

I neuroni magnocellulari sono considerati il prototipo dei neuroni peptidergici e, per questo, sono ampiamente utilizzati negli studi della struttura e fisiologia di questo tipo di cellule secretici. Si tratta di neuroni classici caratterizzati da uno a tre dendriti e il cui unico assone si estende verso la neuroipofisi (Leng et al., 1998). L'ossitocina è sintetizzata nei ribosomi presenti nel corpo cellulare sotto forma di proormone che subisce il taglio della sequenza nel reticolo endoplasmatico. Successivamente, a livello del Golgi, le molecole vengono impacchettate in granuli secretori, detti corpi di Herring, che vengono trasportati dal flusso assoplasmatico attraverso l'assone fino alle terminazioni dell'ipofisi posteriore. Qui sono immagazzinate fino

al momento del rilascio nel circolo sanguigno. E' ormai appurato che il processamento del precursore, precedentemente descritto, avviene all'interno di questi corpi durante lo spostamento, cosicché a livello della terminazione i granuli contengono il peptide distinto dalla neurofisina. Infatti, all'interno dei granuli sono stati individuati non solo il proormone e il peptide maturo stesso, ma anche i prodotti intermedi e gli enzimi coinvolti. Più in particolare, si può dire che nei granuli presenti a livello della terminazione sono presenti gli aggregati ot-neurofisina prima citati, determinati da legami non covalenti. Il rilascio, che avviene in seguito al propagarsi di un potenziale d'azione fino alla terminazione, consiste in un processo di esocitosi calcio-dipendente. Avviene, così, la liberazione nel sangue dell'ormone maturo e dalla corrispondente neurofisina, di cui non sono note le attività biologiche nell'organismo. Con l'esocitosi, ossia con il passaggio dall'interno dei granuli al sangue, gli aggregati ot-neurofisina, subiscono un cambiamento di pH (da 5.5 a 7.4), che determina la rottura dei vari legami deboli, inducendo la separazione netta tra l'ossitocina e la neurofisina (Gainer et al., 1980; Leng et al., 1998 ; Gimpl et al., 2001).

Solitamente si usava fare una distinzione tra l'ossitocina rilasciata nelle diverse aree del SNC e quella liberata nel circolo periferico dalla

neuroipofisi, dato che la prima sembrava espletare le sue funzioni nel SNC e la seconda in periferia, ma più di recente questa distinzione sembra meno rigida.

In tutti i mammiferi l'ossitocina, oltre che nell'encefalo, è sintetizzata anche in diversi organi periferici, che sono in rappresentati da utero, placenta, amnion, corpo luteo, testicoli, prostata, timo, cuore e, pare, anche nel pancreas dell'uomo (Gimpl et al., 2001).

1.5

Gene dell'ossitocina

Nel 1984 la struttura del gene dell'ossitocina è stata definita inizialmente nel ratto (Ivell et al., 1984) e successivamente anche in altre specie tra cui, nel 1992, l'uomo (Rao et al., 1992).

In tutte gli animali, questo gene è adiacente a quello della vasopressina, da cui è separato da pochi kb, ed espresso in direzione opposta. Questo significherebbe, secondo molti, una duplicazione a partire da un unico gene ancestrale, seguita dall'inversione di uno dei due geni (Sausville et al., 1985).

Nell'uomo il gene è localizzato nel cromosoma 20, nel locus p13 ed è formato da tre esoni, già ben sequenziati, di struttura molto simile a quelli individuati in altri mammiferi. Il promotore è dato da una sequenza di circa 200 bp e presenta una regione altamente conservata oltre che nell'uomo, anche in ovini, bovini, topi e ratti (Gainer et al., 1990).

L'espressione di tale gene, studiata soprattutto con l'uso di linee transgeniche, è soggetta ad una fine e complicata regolazione tessuto-specifica da parte di diversi elementi capaci di agire su specifiche regioni del promotore.

Sono stati individuati numerosi membri appartenenti a importanti famiglie di recettori nucleari, capaci di interagire con questa regione e regolare così l'espressione del gene. Nell'uomo e nel ratto è ormai noto che il promotore di tale gene può essere stimolato dai recettori nucleari ER α e ER β , specifici degli estrogeni, dal recettore THR α dell'ormone tiroideo e dai recettori dell'acido retinoico RAR α e RAR β (Adan et al., 1993; Richard et al., 1990, 1991). L'espressione del gene dell'ossitocina, nelle varie specie e nei diversi tessuti, è regolata da numerosi promotori e repressori interagenti tra loro in modalità complesse ancora da chiarire (Gimpl et al., 2001).

1.6

Recettore dell'ossitocina

Tutte le azioni dell'ossitocina sono mediate, sia a livello del SNC che periferico, dall'unico recettore finora individuato. Si tratta di un polipeptide costituito da 388 aminoacidi disposti in sette domini transmembrana, che è stato classificato come membro della classe I della famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs family) (Fig. 3) (Kimura et al., 1992).

I sette domini transmembrana, dati da α -eliche, sono altamente conservati nei vari membri di questa famiglia, in cui singoli residui presenti nei vari domini, si suppone che siano coinvolti in un meccanismo comune di attivazione della proteina G. Alla base del suddetto processo vi è un cambiamento di conformazione dell'intera struttura, dovuto principalmente ad una variazione di orientamento dei domini 3 e 6 (Bockaert et al., 1999).

Nell'interazione tra questa struttura e la molecola dell'ossitocina, è stato osservato che la parte ciclica di quest'ultima prende contatto con i domini 3, 4, 6 e con il secondo loop extracellulare. La parte lineare tripeptidica, che rimane rivolta verso la superficie, interagisce con i domini transmembrana 2, 3, con il primo loop extracellulare e con il

dominio glicosilato N-terminale extracellulare (Postina et al., 1996; Barberis et al., 1998).

Più in particolare, sono state individuate regioni e residui fondamentali nell'interazione, sia del recettore che dell'ormone. Tra questi si possono citare: una regione di 12 AA nella porzione N-terminale extracellulare, un'interazione tra il residuo L8 dell'ossitocina e il residuo 103 del recettore, le interazioni tra i residui 209 e 284 con i residui tirosina 2 e isoleucina 3 dell'ormone. Quest'ultimo è uno dei due AA che determina la differenza di struttura rispetto al peptide vasopressina e quindi fondamentale nel riconoscimento specifico dell'ormone da parte del recettore (Zingg et al., 2003).

Anche il gene corrispondente a questo recettore è stato isolato e sequenziato in diverse specie. Nel genoma umano è localizzato nel cromosoma 3, nel locus p25-3p26.2, dove è presente in singola copia ed è costituito da una sequenza di 17 kb comprendente 3 introni e 4 esoni (Inoue et al., 1994; Michelini et al., 1995).

L'espressione di tale gene è soggetta a una regolazione che differisce nelle varie specie ed è tessuto-specifica. In ogni caso può avvenire da parte di diversi elementi, capaci di interagire, direttamente o indirettamente, con la regione del promotore. Ad esempio, è ormai

certo che gli estrogeni stimolano l'espressione del recettore nell'utero, nella ghiandola pituitaria, nei reni e nei nuclei ventro-mediali dell'ipotalamo (Ivell et al., 1999). E' possibile trovare, nelle cellule del miometrio umano, una regolazione negativa ad opera delle interleuchine IL-1 β , IL-6 e citochine, agenti direttamente su specifici elementi di risposta del promotore del gene (Schmid et al., 2001). Anche in questo caso, come nel caso del gene dell'ossitocina, è possibile affermare l'esistenza di una regolazione complicata sul promotore da parte di attivatori e repressori.

La localizzazione di tali recettori è stata ampiamente studiata nel ratto e nell'uomo e, come per la diffusione dell'ossitocina, gli studiosi tendono a fare distinzione tra distribuzione a livello periferico e quella centrale, con molte analogie tra i vari mammiferi.

Nel primo caso la presenza del recettore è stata accertata a livello di vari distretti, quali utero (miometrio, endometrio, amnion, corion, decidua), ovaio e corpo luteo, testicoli e ghiandola prostatica, ghiandola mammaria, reni, pancreas, timo, cuore (in atri e ventricoli) e endotelio vascolare. Inoltre, è stata rilevata la presenza di tale struttura anche in altri tipi di cellule come adipociti, osteoblasti, mioblasti, e in linee cellulari di diversi tumori umani, come cancro al seno, neuroblastoma, glioma e adenocarcinoma dell'endometrio, dove

sembra essere coinvolto nella regolazione della crescita cellulare (Gimpl et al., 2001; Guzzi et al., 2002; Zingg et al., 2003).

La distribuzione del recettore a livello centrale, come la presenza dell'ormone stesso, è oggetto da un decennio a questa parte, di continui studi atti a trovare correlazioni tra l'influenza dell'ossitocina nelle diverse aree del cervello e i nuovi ruoli attribuiti a questo neuropeptide nei mammiferi. Tali studi sono stati effettuati, oltre che nel ratto e nell'uomo, anche in un tipo particolare di roditore (genere *Microtus Ocrogaster*) impiegato come modello per i suoi comportamenti più sociali (Bielsky et al., 2005).

Nel ratto possiamo trovare i recettori per l'ossitocina nel sistema olfattivo, aree corticali, gangli basali, sistema limbico (con alta densità nell'amigdala centrale, nel subiculum ventrale e nel nucleo della stria terminale), talamo, ipotalamo, tronco encefalico e colonna vertebrale (Barberis e Tribollet et al., 1996; Zingg et al., 2003).

Nell'uomo è stato individuato nella parte compatta della substantia nigra, nel globus pallidus, nel cingolato anteriore e nella media insula (queste quattro regioni ne sono particolarmente ricche), nel caudato putamen, nel nucleo basale di Meynert, nella porzione ventrale del setto laterale, nel nucleo basale della stria terminale, nel nucleo ventro-mediale e nucleo paraventricolare dell'ipotalamo,

nell'amigdala, nell'area tegmentale ventrale, nell'ippocampo, nel nucleo olfattorio anteriore, nel tubercolo olfattorio, nell'area preottica, nella corteccia del cingolo e frontale, nella sostanza gelatinosa del nucleo caudale del trigemino e nel corno posteriore della porzione rostrale del midollo spinale (Loup et al., 1991; Viero et al., 2010).

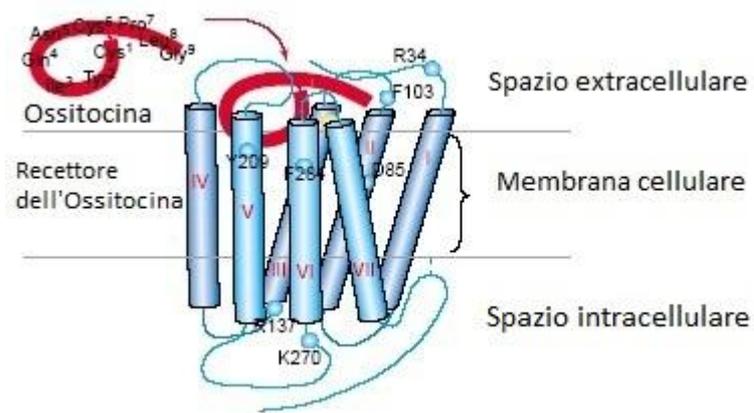


Figura 3. Recettore dell'ossitocina.

1.7

Funzioni dell'ossitocina

Nei mammiferi l'ossitocina presenta numerose funzioni che si esplicano a differenti livelli. Sono noti ormai da tempo gli effetti che l'ormone produce durante la gravidanza, il parto e l'allattamento e le corrispondenti attività nell'ipotalamo, adenoipofisi e sistema nervoso autonomo. Negli ultimi anni, a queste funzioni "classiche" dell'ossitocina, si sono aggiunti numerosi dati che hanno evidenziato uno spettro di azioni più ampie che riguardano la modulazione del cosiddetto comportamento sociale.

1.7.1

Funzioni periferiche dell'ossitocina

A livello periferico i due principali organi bersaglio dell'ossitocina sono le cellule muscolari lisce dell'utero e le cellule mioepiteliali della ghiandola mammaria nel periodo della gravidanza.

Durante la gestazione, si possono rilevare l'ormone e il suo recettore non solo nell'utero, ma anche nella placenta, amniom, corion e decidua. L'ossitocina agisce da forte induttore del parto, determinando la contrazione delle cellule muscolari lisce dell'utero,

facilitando l'espulsione del feto. E' interessante come in questo periodo, nei vari mammiferi non sono rilevabili aumenti significativi dei livelli plasmatici di ossitocina, mentre nel miometrio si verifica un incremento consistente del numero dei recettori, stimolato dagli estrogeni, proporzionalmente al progredire della gravidanza. Pertanto, non ci deve stupire se l'ossitocina sintetica viene comunemente usata per indurre il parto, mentre i suoi antagonisti sono utilizzati per impedire che avvenga precocemente (Fuchs et al., 1995; Russel et al., 1998).

L'ossitocina svolge un ruolo fondamentale anche nell'allattamento, dato che determina la contrazione delle cellule mioepiteliali delle ghiandole mammarie favorendo la fuoriuscita del latte. Questo avviene in risposta al riflesso determinato dalla suzione del capezzolo che, tramite vie nervose, raggiunge l'ipotalamo, stimolando la secrezione di ossitocina nel plasma (McNelly et al., 1983).

Oltre a queste due azioni, l'ossitocina esplica la sua influenza anche in altri distretti periferici, quali:

- Ovaio e corpo luteo: agisce come fattore follicolo-stimolante, rilascio e sintesi progesterone e più genericamente nella fertilità.

- Cuore: effetti cardiaci e vascolari, differenziazione embrionale dei cardiomiociti, rilascio del peptide natriuretico.
- Reni: funzione di agente natriuretico osmoregolatore.
- Timo: differenziazione e proliferazione cellulare.
- Pancreas: stimola il rilascio di glucagone e il minore rilascio di insulina.
- Testicoli: spermatogenesi, modulazione steroidogenesi, contrazione dei tubuli seminiferi ed erezione.
- Prostata: contrazione, eiaculazione e crescita cellulare.
- Adipociti: stimolazione della ossidazione del glucosio e della lipogenesi.

(Paolisso et al. 1988; Nicholson et al., 1992, 1995, 1996, 1999; Furuya et al., 1995; Geenen et al., 1996; Favaretto et al., 1997; Gutkowska et al., 1997; Okuda et al., 1997; Copland et al., 2002; Jankowski et al., 2004).

1.7.2

Funzioni dell'ossitocina a livello del sistema nervoso centrale

Come abbiamo visto nel SNC l'ossitocina è ampiamente distribuita e implicata in azioni molto eterogenee a seconda della sua sede.

Innanzitutto, agisce a livello dell'ipotalamo, mediante il suo rilascio intranucleare da parte del corpo cellulare e dei dendriti dei neuroni magnocellulari. Tale rilascio produce effetti autoregolatori sull'ipotalamo stesso e sembra deprimere proiezioni GABAergiche presenti in vicinanza di quest'ultimo (Brussaard et al., 1996; Landgraf et al., 2004).

Azioni dell'ossitocina sono state rilevate anche a livello dell'adenoipofisi, dove è implicata nella regolazione del rilascio della prolattina, delle gonadotropine e dell'ormone ACTH (Legros et al., 1988; Page et al., 1990; Robinson et al., 1990).

Effetti dell'ossitocina sono stati rilevati anche a livello del SNA a carico delle seguenti funzioni: regolazione della frequenza cardiovascolare, analgesia, attività motoria, termoregolazione, motilità gastrica, osmoregolazione e respirazione (Bodnar et al., 1984; Naylor et al., 1986; Richard et al., 1991; Flanagan et al., 1992; Yang, 1994;

Gutkowska et al., 1997; Petersson et al., 1997; Franchini et al., 1999; Mack et al., 2002).

L'identificazione dell'ossitocina e del suo recettore in numerose aree cerebrali dei mammiferi ha fatto ipotizzare che essa abbia, oltre alle azioni precedentemente descritte, anche altri effetti centrali. Negli ultimi vent'anni si sono appunto approfonditi quelli che si definiscono ruoli non "classici" dell'ossitocina. È emerso così che l'ossitocina è un ormone fondamentale per la sopravvivenza, dato che sembra implicata nella regolazione del comportamento sociale e sessuale. Questa molecola di nove aminoacidi agirebbe facilitando le interazioni sociali, permettendo la formazione e il protrarsi di legami sociali fondamentali, quali il legame madre-figlio e tra due partner adulti, e, più in generale, l'attaccamento (Storm et al., 2005; Tobias et al., 2005).

Molte di queste ipotesi derivano dai numerosi studi fatti sul *Microtus Ochrogaster*, o arvicola. Si tratta di un piccolo roditore che vive abitualmente nel nord America che ha la caratteristica di presentare nella specie delle praterie un'organizzazione sociale particolare che, rispetto agli altri mammiferi, è più simile a quella umana. Infatti, tale specie mostra la tendenza a formare legami monogami duraturi e a prendersi cura della prole, fino alla formazione di veri e propri nuclei

familiari, con tanto di “nonni” e genitori. Questo aspetto ha attirato l’attenzione degli studiosi i quali hanno definito tali roditori un modello importante per lo studio della neurobiologia dell’attaccamento sociale cui fare riferimento anche per gli studi sulla specie umana (Smeltzer et al., 2005).

Tramite esperimenti di autoradiografia, si è cercato di individuare la localizzazione dei recettori dell’ossitocina nelle diverse aree cerebrali del *Microtus*. Da tali esperimenti, si è accertata la presenza dei recettori del peptide in aree quali nucleus accumbens, corteccia prefrontale, setto laterale, bulbo olfattivo, organo vomero-nasale, amigdala, area preottica e ipotalamo. Queste diverse aree cerebrali, nei mammiferi, sono note per essere coinvolte nella regolazione delle relazioni sociali, nel comportamento materno, nel rapporto di coppia, nella memoria sociale (permette il riconoscimento e la discriminazione di altri individui), nel comportamento sessuale e riproduttivo (per quanto riguarda sia il corteggiamento, che l’attività sessuale) e, soprattutto per quanto riguarda l’amigdala, anche ansia e paura (Bielsky et al., 2004; Young et al., 2004; Quentin et al., 2005).

Una conferma che l’ossitocina possa regolare tali funzioni deriva dal confronto tra due specie diverse di *Microtus*, quello montano con quello della prateria. La prima specie è promiscua, solitaria e non ha

cura della prole, mentre la seconda è monogama, con legami di coppia lunghi ed accudisce la prole.

Le arvicole di prateria formano legami stabili dopo l'accoppiamento.

L'accoppiamento determina il rilascio di ossitocina e vasopressina.

L'iniezione a livello del SNC dei due peptidi, facilita l'insorgenza di comportamenti monogami nelle arvicole di prateria, anche nel caso in cui l'accoppiamento sia impossibile. Al contrario, la somministrazione di antagonisti di vasopressina e ossitocina nella corteccia prefrontale e nel nucleus accumbens, prima dell'accoppiamento, inibisce la comparsa di legami stabili (Young et al., 2001). Gli antagonisti non alterano l'accoppiamento in sé, ma impediscono lo sviluppo della preferenza di partner che normalmente si manifesta nelle arvicole di prateria a seguito dell'accoppiamento. Da queste osservazioni si può dedurre che nelle arvicole di prateria entrambi i peptidi neuroipofisari sono necessari alla formazione dei legami di coppia. Al contrario, né l'ossitocina né la vasopressina hanno effetti di rilievo sul comportamento sociale delle arvicole di montagna (promiscue). Nonostante non si siano rilevate differenze evidenti nell'espressione dei neuropeptidi tra le due specie di arvicola, mediante autoradiografia, si è visto che la distribuzione regionale e la densità dei recettori dell'ossitocina sono diverse. In particolare, i roditori

monogami presentano, rispetto all'altra specie, un'alta densità di recettori nel nucleo accumbens (NAcc) e nel nucleo caudato putamen (CP). Entrambe le specie di roditori presentano recettori nella corteccia prefrontale, coinvolta nel riconoscimento olfattivo (Fig.4), mentre quelle promiscue un'elevata espressione recettoriale nel setto laterale.

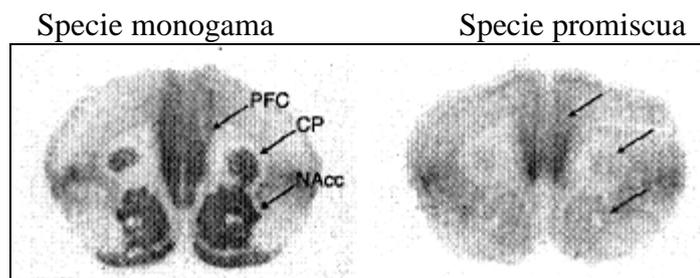


Figura 4. Autoradiografia cervello di *Microtus monogama* in confronto a cervello di *Microtus promiscua*. E' visibile la minore densità dei recettori nel secondo caso.

Altri dati interessanti sono derivati dai numerosi esperimenti con topi knock-out per il gene dell'ossitocina che risultano del tutto privi di riconoscimento sociale verso conspecifici a cui sono stati precedentemente esposti. Questo deficit viene annullato mediante iniezione locale di ossitocina nell'amigdala, il che ha dimostrato come questa sia essenziale per il riconoscimento sociale (Fergusson et al., 2000, 2001).

L'attenzione degli studiosi si è concentrata anche sugli ovini, che rappresentano un modello eccellente di cure parentali. In questa specie animale, è stato dimostrato che un'infusione intracerebrale di ossitocina in pecore non gravide e senza prole induce un forte legame materno verso gli agnellini altrui (Kendrick et al., 1987, 1997).

Per quanto riguarda l'uomo, i recettori dell'ossitocina sono stati individuati nella substantia nigra, globus pallidus e area preottica, zone che si è visto, mediante risonanza magnetica, attivarsi in soggetti adulti alla vista di una foto del proprio figlio o del partner. Altre aree in cui sono state individuati i recettori per l'ossitocina sono il cingolato anteriore e l'insula media, che fanno parte del cosiddetto "cervello sociale" (Bartels et al., 2000; Adolphs et al., 2001).

Tra i pochi dati a disposizione per un ruolo dell'ossitocina nel comportamento sociale nell'uomo, si può essere citare uno studio basato su una simulazione di un gioco finanziario, in cui alcuni soggetti dovevano fare investimenti affidando il tutto a un investitore. Per questo studio sono stati reclutati 29 soggetti, trattati con inalazione intranasale di ossitocina, e altri 29 soggetti a cui veniva somministrato placebo. Complessivamente i soggetti trattati con ossitocina presentavano maggiore fiducia nel proprio investitore, rischiando di più rispetto a quelli di controllo. Pare, dunque che l'ossitocina possa

servire a superare il timore degli estranei o “neofobia” (Kosfeld et al., 2005).

Esistono anche dati preliminari che l’ossitocina possa essere implicata nella fisiopatologia di alcuni disturbi psichiatrici, quali autismo, schizofrenia, disturbo ossessivo-compulsivo e sindrome di Prader-Willi. In effetti, in soggetti autistici sono state evidenziate alterazioni del processamento enzimatico della preproossifisina, a carico degli enzimi PC2 e PC5; si ipotizzano anche alterazioni a livello genetico e recettoriale (Green et al., 2001; Modahl et al., 1998). In accordo a questi risultati, è stato suggerito l’impiego terapeutico dell’ossitocina per promuovere le abilità sociali nell’autismo (Hollander et al., 2003), ma occorrono ovviamente dati più numerosi ed effettuati in campioni più ampi prima di giungere a conclusioni definitive sulla possibile efficacia dell’ossitocina nelle patologie psichiatriche.

Sembra, dunque, che l’ossitocina svolga un ruolo chiave nella formazione dei legami sociali, dell’attaccamento e della memoria sociale che permette di discriminare tra i vari individui. Inoltre, è stato osservato che l’ossitocina aumenta nelle situazioni di stress e di ansia, attenuandole (Nishioka et al., 1998; Esch et al., 2005; Storm et al., 2005; Marazziti et al., 2014).

L'ossitocina sembra coinvolta nel comportamento riproduttivo, in particolare nel corteggiamento, nella selezione e riconoscimento del partner. Durante il rapporto sessuale nelle varie specie, compreso l'uomo, si è visto che i livelli plasmatici di ossitocina aumentano (Murphy et al., 1987; Blaicher et al., 1999).

Inoltre, ormai è certo che l'ossitocina, insieme ad altri ormoni e neurotrasmettitori, è coinvolta nella neurobiologia di quel sentimento tipicamente umano che è l'"amore", che è ritenuto un processo adattativo in grado di assicurare la sopravvivenza. E' essenziale per la formazione del rapporto di coppia che è ulteriormente rafforzato dall'instaurarsi da quella forma di attaccamento verso il partner che si definisce attaccamento romantico (Marazziti et al., 2006).

Capitolo 2. L'attaccamento

2.1

Introduzione

L'attaccamento è una dimensione della mente umana che si struttura a partire dalle prime relazioni che il neonato instaura con chi si prende cura di lui o lei (che si indica con il termine inglese *caregiver*), e include emozioni, processi cognitivi e comportamenti, mantenendosi pressoché inalterato nel corso della vita, e influenzando in maniera permanente i rapporti sociali del singolo individuo. È difficile immaginare per la specie umana un qualunque processo che sia più importante dell'attaccamento per la sopravvivenza, dato che alla nascita la nostra immaturità è sconcertante, se confrontata con quella degli animali più vicini, per cui nessun neonato potrebbe sopravvivere se non fosse “sociale”.

La teoria dell'attaccamento, proposta originariamente da Bowlby integrò il modello psicoanalitico classico con osservazioni comportamentali del mondo animale di stampo etologico, con particolare riguardo alle relazioni madre-cucciolo e madre-bambino. La teoria dell'attaccamento scardinò il primato delle pulsioni (libido o

pulsione di vita e aggressività o pulsione di morte), ponendo al centro del comportamento e della psiche umana il sistema di attaccamento che diviene, quindi, il principale sistema motivazionale. Le interazioni tra madre e bambino, che iniziano già durante la gravidanza e che vanno dall'abbraccio allo scambio di sguardi, alla nutrizione, alla consolazione ecc., strutturano ciò che viene definito sistema di attaccamento, il sistema che guida, anche nella vita adulta, le interazioni e gli scambi relazionali affettivi. La relazione di attaccamento può essere definita dalla presenza di tre caratteristiche: in primo luogo la ricerca di vicinanza di una persona preferita, in secondo luogo l'effetto base sicura, e infine, la protesta per la separazione. La base sicura rappresenta per il bambino un trampolino per sviluppare la curiosità e l'esplorazione. La funzione di base sicura, che nei primi anni di vita viene assolta fisicamente dalla mamma, diviene poi, attraverso l'interiorizzazione dei comportamenti e degli affetti suscitati dalla mamma stessa, una struttura interna capace di consolare e proteggere. In questo modo il bambino, e poi l'adulto, può sentirsi libero di allontanarsi e differenziarsi gradualmente dal *caregiver* e iniziare a esplorare il mondo esterno, con la sicurezza di poterlo ritrovare al suo ritorno. La protesta per la separazione rappresenta la risposta primaria alla separazione dai genitori. La

funzione della protesta è duplice: riparare il legame di attaccamento la cui rottura è minacciata dalla separazione e punire il *caregiver* per evitare ulteriori separazioni.

L'ontogenesi del sistema di attaccamento può essere suddivisa in tre fasi:

1. la prima fase (*orientamento e pattern di riconoscimento*), corrisponde al periodo che va dalla nascita ai primi sei mesi di vita. Alla nascita i bambini non sono in grado di distinguere le persone tra loro, ma reagiscono intensamente al contatto umano; verso la quarta settimana rispondono con un sorriso al volto umano, evocando, di riflesso, il sorriso negli altri; al terzo mese ha inizio la relazione di attaccamento;
2. la seconda fase (*attaccamento "set-goal"*), va dai sei mesi ai tre anni, periodo in cui compare "l'ansia per l'estraneo" e in cui lo scopo programmato del bambino (*set-goal* appunto) è mantenersi sufficientemente vicino alla madre che diventa la base sicura per le esplorazioni, e manifestare proteste per la separazione o in caso di pericolo;
3. la terza fase (*formazione di una relazione reciproca*) inizia con il terzo anno di vita e si caratterizza per un pattern relazionale più complesso in virtù dell'avvento del linguaggio, il bambino comincia a

pensare ai genitori come a persone separate, con propri scopi e progetti e a escogitare modi per influenzarli.

Ciascun individuo possiede un particolare stile di attaccamento che caratterizza le sue interazioni affettive (relazioni di coppia, relazioni intime ecc.) e che influenzerà a sua volta lo stile d'attaccamento del proprio bambino. Lo stesso Bowlby aveva ipotizzato che nell'attaccamento vi fosse una solida base genetica e biologica, ma solo negli ultimi 30 anni, una serie di ricerche in vari animali e anche nell'uomo hanno cominciato a esplorare le sue basi anatomiche e neurobiologiche.

L'attaccamento sociale è fondamentale nella vita dei mammiferi e in particolare della specie umana, tuttavia il suo studio risulta particolarmente complesso. Le prime descrizioni relative ai processi comportamentali che sono alla base dell'attaccamento infantile, genitoriale e tra adulti risalgono al 1970. I legami di attaccamento implicano percezioni multisensoriali, prevalentemente olfattive nei roditori e visive nei primati, e complesse risposte motorie (ricerca di vicinanza, comportamenti di accudimento e di difesa).

L'attaccamento inoltre è sotteso da numerosi processi cognitivi quali l'attenzione, la memoria, il riconoscimento sociale e soprattutto la spinta motivazionale, che lega gli input sensoriali agli output motori.

Negli animali non primati, l'aspetto motivazionale dell'attaccamento può essere valutato in termini di desiderio di vicinanza, di preferenza sociale o di risposta alla separazione; nell'uomo l'espressione più evoluta di questo particolare sistema motivazionale è l'esperienza amorosa.

A eccezione degli studi sulla maternità delle scimmie e di indagini recenti di *neuroimaging* sull'uomo, le ricerche relative alla neurobiologia dell'attaccamento fino a ora sono state condotte su mammiferi non primati.

Come già detto, dati recenti evidenziano che i peptidi neuroipofisari ossitocina e vasopressina sono particolarmente importanti nella formazione delle relazioni sociali, tra cui la formazione di legami di coppia nei mammiferi monogami, l'inizio dei comportamenti parentali sia nei maschi sia nelle femmine e con tutta probabilità anche aspetti relativi all'attaccamento infantile. Inoltre, il ruolo di questi ormoni avrebbe una specificità di genere, con aspetti comportamentali mediati dall'ossitocina nelle femmine e dalla vasopressina nei maschi. Molti altri sistemi neurotrasmettitoriali sembrano comunque implicati nella regolazione dei meccanismi di attaccamento: prolattina, oppioidi, dopamina e acido gamma-aminobutirrico (GABA) in quello materno; GABA, oppioidi e serotonina in quello infantile, ma è importante

sottolineare come nessuno di questi sistemi neurotrasmettitoriali funzioni in maniera indipendente. Per esempio, i recettori dell'ossitocina sono specificamente localizzati a livello delle cellule lattotrope dell'ipofisi, gli oppioidi regolano il rilascio dell'ossitocina, ossitocina e vasopressina agiscono a livello di numerosi nuclei autonomici del tronco encefalico. Molte di queste interazioni presentano una specificità regionale, dipendente dalla presenza di recettori o dall'influenza degli steroidi sessuali.

Il coinvolgimento di ossitocina e vasopressina in forme diverse di attaccamento, da quella infantile a quella genitoriale a quella di coppia, ha sollevato l'ipotesi dell'esistenza di un unico circuito neuronale, già presente alla nascita, in grado di regolare le varie tipologie di attaccamento presenti nel corso della vita sulla base del contesto sociale ed endocrino. I dati provenienti dalla ricerca in questo settore suggeriscono piuttosto l'implicazione di vari circuiti nella regolazione sia dei comportamenti riproduttivi sia nell'attaccamento. Alcune regioni dell'amigdala laterale e del setto laterale e le loro proiezioni all'ipotalamo rostrale (area preottica mediale), attraverso il nucleo interstiziale della stria terminale, appaiono importanti per il comportamento parentale e per i legami di coppia. I circuiti che

collegano l'ipotalamo rostrale all'area ventrale tegmentale potrebbero essere fondamentali per integrare le informazioni sociali con le vie della gratificazione, soprattutto in specie altamente affiliative che rispondono agli stimoli sociali con l'attivazione di potenti meccanismi di rinforzo. Molte di queste regioni sono ricche di recettori per ossitocina e vasopressina. Nei roditori, molte delle aree implicate nei comportamenti di attaccamento sono quelle limbiche che processano stimoli di natura olfattiva. Nei primati le aree limbiche implicate nei sistemi di attaccamento processano stimoli prevalentemente di natura visiva, ma anche provenienti da altre modalità sensoriali (Marazziti et al., 2008).

2.2

Attaccamento infantile

I pulcini appena nati mostrano un *imprinting* visivo che si estrinseca attraverso la tendenza duratura a seguire selettivamente la madre (o oggetti simili alla madre). Nel pulcino, il processo di *imprinting* consta di almeno tre stadi indipendenti: in primo luogo vi è la risposta di approccio che si associa a un'attivazione neurovegetativa e a un'inibizione dell'evitamento. Questa fase è seguita dallo stadio di acquisizione o di apprendimento, fase in cui i pulcini formano una memoria a lungo termine nei confronti dello stimolo che è stato loro impresso, e che è parzialmente precostituito. Infine, vi è un'inversione di tendenza, dall'approccio all'evitamento: in questo stadio, che coincide con il termine del periodo di apprendimento, i pulcini cominciano a evitare nuovi oggetti mentre continuano a seguire l'oggetto familiare che ha dato loro l'*imprinting*. La porzione intermedia mediale del nucleo striato ventrale (IMHV) del cervello del pulcino riveste un ruolo chiave nell'acquisizione e nel precoce consolidamento della memoria degli stimoli visivi responsabili dell'*imprinting*. La regione a essa adiacente, il neostriato medio-rostrale, riceve l'*imprinting* esclusivamente da parte di stimoli uditivi.

L'*imprinting* di natura visiva o uditiva determina nel pulcino sia un incremento precoce e persistente del rilascio presinaptico di aminoacidi, sia modificazioni ultrastrutturali postsinaptiche in specifiche regioni corticali. I piccoli di ratto riconoscono la madre attraverso un processo prevalentemente olfattivo in cui sono implicati circuiti noradrenergici e risultano facilmente condizionabili da stimoli associati all'odore o alle cure materne. L'ossitocina sembra facilitare l'apprendimento di stimoli di natura sociale (come quelli che provengono dalla madre), fenomeno che risulta invece inibito dalla somministrazione di un suo antagonista. A differenza degli studi sui pulcini, finora non è stata identificata nel cervello dei neonati di mammifero una regione corticale specificamente deputata all'attaccamento. Benché le esperienze sociali rivestano un ruolo cruciale nel normale sviluppo cerebrale e comportamentale dei mammiferi, non conosciamo il motivo per cui l'attaccamento sociale, ma non l'arricchimento ambientale generico, sia in grado di modulare lo sviluppo cerebrale.

Nella specie umana i bambini formano un legame con i *caregivers* fin dalla nascita e tale legame continuerà a influenzare le relazioni emotive anche nell'età adulta. I sistemi dell'ossitocina e della vasopressina sono influenzati dalle esperienze sociali precoci. Nei

mammiferi l'interazione del bambino con la madre ha profondi effetti sul comportamento che a loro volta possono determinare modificazioni durature di natura sia neuroanatomica sia neuroendocrina. Per esempio, le prime esperienze di vita sembrano in grado di influenzare i processi di neurogenesi in risposta allo stress nell'adulto, così come sono state dimostrate alterazioni persistenti dell'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene in conseguenza di eventi vitali stressanti avvenuti in epoca precoce. È possibile che l'ossitocina sia il mediatore in grado di tradurre esperienze precoci quali la nascita, l'allattamento al seno e altri aspetti dell'interazione madre-bambino, in modificazioni comportamentali a breve e a lungo termine. La mancanza delle cure materne sembra alterare il normale sviluppo dei sistemi dell'ossitocina e della vasopressina nei bambini piccoli e potrebbe interferire con gli effetti calmanti e confortanti prodotti dall'interazione dei bambini con i *caregivers*.

I livelli di ossitocina e vasopressina infatti sono aumentati dalle esperienze sensoriali piacevoli di natura sociale come le carezze e gli odori. Studi in animali non primati hanno dimostrato che, quando le concentrazioni di questi ormoni aumentano, gli animali incrementano le loro interazioni sociali positive, per esempio formano legami

sociali, mostrano un attaccamento selettivo nei confronti dei genitori e creano una memoria di queste interazioni sociali.

L'ossitocina e i suoi recettori compaiono assai precocemente durante l'ontogenesi e, nelle prime due settimane dopo la nascita (sia nei roditori che nei primati), ne è stata riscontrata un'iperproduzione marcata in aree cerebrali limbiche. La somministrazione esogena di ossitocina riduce la risposta alla separazione nei cuccioli di ratto, in accordo alla teoria secondo cui questo peptide avrebbe un ruolo sia nell'attaccamento sia nella risposta alla separazione.

La localizzazione dei recettori dell'ossitocina in aree cerebrali appartenenti al circuito della gratificazione quale il *nucleus accumbens* sembra rivestire un ruolo determinante nel rendere piacevoli le interazioni sociali (Fig. 5) (Marazziti et al., 2008).

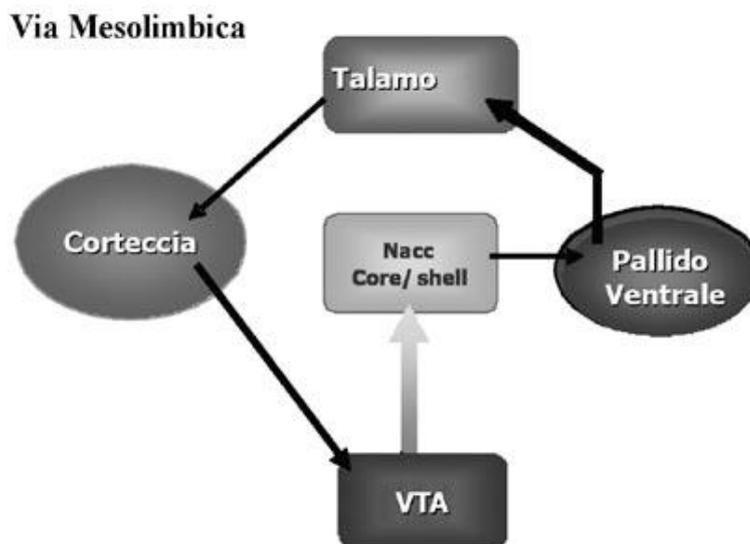


Figura 5. Circuito del sistema di “reward”.

2.3

Attaccamento materno

Il comportamento materno dei mammiferi è estremamente variabile. Da una parte ci sono le specie con minimi comportamenti di accudimento come i topo-ragni e i conigli che trascorrono soltanto pochi minuti al giorno con la prole, dall'altra vi sono specie, compresi molti primati, che manifestano comportamenti di accudimento durante tutto il ciclo di vita. Tra questi due estremi troviamo numerose specie in cui il comportamento materno è ristretto al periodo del *post-partum*, con un inizio e una fine ben definiti, e che offrono pertanto l'opportunità di studiare i meccanismi neuronali che ne sono alla base (Marazziti et al., 2008).

2.4

La motivazione materna: il ratto

Il ratto norvegese è una specie in cui le femmine evitano il contatto o addirittura attaccano i più giovani fino a poco prima del parto, momento in cui iniziano a costruire il nido, a difendere i piccoli e a sviluppare una postura arcuata della schiena adatta all'allattamento.

I fattori neuroendocrini associati alla gestazione, al parto e all'allattamento rivestono probabilmente una funzione cruciale nell'indurre il passaggio da comportamenti di evitamento a quelli di accudimento: infatti le variazioni nei livelli di estrogeni e progesterone che si verificano durante la gestazione e il parto sono sufficienti a determinare comportamenti materni in femmine vergini.

Nel cervello del ratto non è stato identificato un circuito specifico deputato alla maternità, tuttavia sembrano coinvolte numerose zone:

l'area preottica mediale (MPOA), il nucleo della stria terminale (BNST), l'abenula laterale e l'area ventrale tegmentale (VTA). La MPOA in particolare, sembra rivestire un ruolo centrale nell'integrazione di stimoli sensoriali periorali che permettono la costruzione del nido e il recupero dei piccoli. Nel ratto, i neuropeptidi che regolano la lattazione, ossitocina e prolattina, sono anche i

mediatori centrali del comportamento materno, in particolare la somministrazione di prolattina facilita lo sviluppo di comportamenti materni in femmine non gravide esposte a steroidi gonadici, mentre gli inibitori ne riducono l'espressione. Topi geneticamente privi del recettore della prolattina manifestano difficoltà nel comportamento di recupero dei piccoli e nella costruzione del nido. Anche l'ossitocina facilita l'insorgenza dei comportamenti materni: è stato infatti dimostrato che l'iniezione di ossitocina nei ventricoli laterali di femmine di ratto nullipare e ovariectomizzate induceva la comparsa di comportamenti materni. Tali comportamenti risultavano invece inibiti dalla somministrazione di un antagonista o da lesioni ipotalamiche a carico delle cellule produttrici di ossitocina. La somministrazione di antagonisti dell'ossitocina, tuttavia, non è in grado di inibire i comportamenti materni una volta che questi si sono instaurati. Gli estrogeni sono fondamentali nel modulare la neurotrasmissione dell'ossitocina. Le variazioni fisiologiche degli steroidi sessuali che si verificano durante la gravidanza inducono, al momento o poco prima dell'espletamento del parto, un incremento dei recettori dell'ossitocina in due regioni del sistema limbico, il nucleo della stria terminale e il nucleo ventromediale dell'ipotalamo, determinando l'insorgenza della maternità. Questi risultati suggeriscono un possibile ruolo

dell'ossitocina nell'indurre il passaggio dall'evitamento all'approccio nei confronti dei piccoli. Probabilmente la funzione dell'ossitocina si estrinseca a livello della VTA, della MPOA e del bulbo olfattivo dato che l'iniezione in tali aree di antagonisti specifici del neuropeptide inibisce lo sviluppo del comportamento materno. In molte specie di mammiferi e nel ratto in particolare, l'esordio dei comportamenti materni implica il superamento della naturale tendenza all'evitamento dell'odore dei neonati. Nelle femmine di ratto l'inizio dell'accudimento dei piccoli è favorito da lesioni che riducono la processazione degli stimoli olfattivi. L'ossitocina, rilasciata a livello centrale al momento del parto, sembra ridurre il *firing* delle cellule mitrali e granulari nel bulbo olfattivo, determinando pertanto un'inibizione all'integrazione degli stimoli olfattivi e facilitando così i comportamenti di approccio.

Finora il ruolo dell'ossitocina nello sviluppo del comportamento materno nella specie umana non è stato studiato in maniera sistematica. Alcune ricerche hanno evidenziato come l'allattamento al seno, entro un'ora dalla nascita, quando i livelli di ossitocina sono molto elevati, potrebbe sottendere lo sviluppo di una relazione di attaccamento stabile e di lunga durata tra la madre e il bambino, oltre

ad avere un effetto benefico sullo sviluppo del bambino (Marazziti et. Al., 2008).

2.5

Comportamento materno selettivo: la pecora

Dopo il parto, la femmina di ratto alleva qualunque piccolo si trovi all'interno del suo nido, manifestando un attaccamento generico, non selettivo nei confronti dei neonati, le pecore invece presentano modelli di attaccamento materno più rigorosi e selettivi, rifiutando, nel *post-partum*, qualunque agnello che non sia il proprio. Analogamente a quanto si verifica nel ratto, gli steroidi sessuali sono importanti nell'induzione del comportamento materno nella pecora; la prolattina invece sembra avere un ruolo marginale in tal senso.

È stato osservato che la stimolazione cervico-vaginale (VCS) induce comportamenti materni in pecore non gravide sottoposte a steroidi gonadici ed è in grado di determinare l'accettazione di un agnello estraneo anche due o tre giorni dopo la formazione del legame di attaccamento al proprio agnello. L'anestesia epidurale inibisce gli effetti della VCS, suggerendo l'esistenza di un *feedback* a livello centrale.

La VCS e la nascita stimolano potentemente il rilascio di ossitocina nel sistema nervoso centrale (SNC) della pecora, favorendo la

comparsa del comportamento materno. L'iniezione di ossitocina nei ventricoli cerebrali (IVC) determina, entro 30 secondi, l'accettazione di un agnello estraneo anche in pecore non gravide.

La somministrazione IVC di ossitocina, inoltre, può indurre la comparsa, nel *post-partum*, del comportamento materno precedentemente inibito dall'anestesia epidurale. Fino a ora non sono state identificate le aree cerebrali che mediano gli effetti dell'ossitocina sul comportamento materno, tuttavia, gli studi presenti in letteratura lasciano supporre l'esistenza di regioni cerebrali coinvolte nel processo di selettività dell'attaccamento e altre nella determinazione dell'insorgenza. L'iniezione di ossitocina nella MPOA o nel bulbo olfattivo riduce l'atteggiamento di rifiuto nei confronti di agnelli estranei (in misura minore rispetto a quanto descritto nel ratto), tuttavia non rappresenta uno stimolo sufficiente alla comparsa del comportamento di accudimento. L'iniezione di ossitocina in prossimità delle cellule del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVN), produttrici esse stesse di questo neuropeptide, è in grado di indurre l'intero complesso dei comportamenti materni nella pecora. Tale fenomeno probabilmente è spiegabile con la presenza di autorecettori che mediano un breve circuito a *feedback* positivo che incrementa il *firing* cellulare e il rilascio coordinato di ossitocina in

molte aree terminali. Considerevoli dati avvalorano l'ipotesi di un ruolo centrale dell'ossitocina nell'induzione del comportamento materno, tuttavia l'esperienza di una precedente maternità sembra interagire con i suoi effetti a livello del SNC: l'ossitocina può indurre l'accettazione dell'agnello in una pecora senza esperienza di maternità in cui l'anestesia peridurale abbia inibito il comportamento materno, ma il rilascio di ossitocina nel bulbo olfattivo in femmine senza precedenti esperienze materne è ridotto durante il parto e virtualmente assente dopo VCS, se confrontate con femmine che hanno già sperimentato la maternità. Il ruolo degli stimoli olfattivi è supportato da una serie di esperimenti che hanno evidenziato che l'attività elettrica delle cellule mitrali del bulbo olfattivo della pecora nelle prime settimane dopo il parto rivela un incremento del 60% nel numero di quelle che rispondono in maniera preferenziale all'odore dei piccoli, rispetto a quanto si verifica durante la fase tardiva della gestazione: inoltre il 30% circa di queste cellule presenta una risposta specifica all'odore del proprio agnello. Entro 24 ore dal parto, l'odore del proprio agnello stimola selettivamente un forte incremento nella concentrazione intracellulare di glutammato e GABA nell'ambito del bulbo olfattivo. La pecora impara a riconoscere l'identità del suo agnello a seguito di un processo mediato dall'ossido nitrico che si

verifica entro poche ore dalla nascita e che comporta un incremento del tono eccitatorio rispetto a quello inibitorio nelle sinapsi tra cellule mitrali e cellule granulo nel bulbo olfattivo. Tali modificazioni neurochimiche a livello del bulbo olfattivo sono influenzate dagli steroidi sessuali. Anche nel topo sembra presente un analogo meccanismo di condizionamento olfattivo (Marazziti et al., 2008).

2.6

BDNF e attaccamento: studi sull'animale

Il BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) rappresenta un membro della famiglia delle neurotrofine (NT), composta da proteine strutturalmente simili, che hanno un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza, della differenziazione e del funzionamento di popolazioni neuronali a livello del sistema nervoso sia centrale sia periferico. Studi recenti hanno evidenziato un ruolo delle neurotrofine anche nella neurobiologia dell'attaccamento.

I dati della letteratura suggeriscono un coinvolgimento del BDNF quale mediatore degli effetti di degenerazione ippocampale prodotti dallo stress. La separazione dalla madre è un modello animale di stress precoce, utilizzato per studiare lo sviluppo di comportamenti simil-depressivi nell'adulto. Lo stress sembra ridurre l'espressione dell'RNAm che codifica per il BDNF nell'ippocampo, nella neocortex e nell'amigdala, mentre può aumentarne l'espressione nell'ipotalamo. Esaminando i livelli di RNAm nel cervello di ratti separati dalla madre al momento della nascita, sono emersi risultati differenti nel breve e nel lungo termine. Nel breve termine, si osserva un aumento dell'espressione genica del BDNF a livello della corteccia prefrontale

e dell'ippocampo, mentre nel lungo termine è presente una diminuzione selettivamente nella corteccia prefrontale. Nei ratti privati più a lungo della madre è stata riscontrata un'elevata concentrazione ippocampale di BDNF, che potrebbe rappresentare una reazione compensatoria alla separazione durante il periodo neonatale, mantenendo così la neurogenesi nell'adulto a livelli identici a quella dei ratti allevati dalla madre. La separazione cronica dalla madre determinerebbe la produzione di livelli anomali di BDNF in forma sia matura sia immatura (pro-BDNF), in diverse aree cerebrali, nonché significativi deficit nei circuiti ippocampali deputati alla memoria e all'apprendimento. La riduzione cronica del BDNF nell'ippocampo potrebbe determinare modificazioni della plasticità neuronale contribuendo alla manifestazione di comportamenti "simil-depressivi", quali le alterazioni nell'attività locomotoria e le stereotipie comportamentali osservabili nei ratti separati dalla madre.

Uno studio recente ha evidenziato come i ratti esposti a separazione dalla madre, da adulti manifestino deficit comportamentali, alterazione del funzionamento dell'asse ipotalamico-pituitario-surrenale (HPA) in risposta a stress acuti e alterazioni a lungo termine dei livelli di BDNF. È stato poi suggerito che il pro-BDNF abbia effetti diversi e in parte opposti rispetto al BDNF maturo sulla

sopravvivenza cellulare e sulla plasticità sinaptica. Sembra che l'aumento dei livelli di pro-BDNF induca apoptosi e deprima a lungo termine la funzione ippocampale, mentre l'aumento dei livelli di BDNF maturo determini un aumento della sopravvivenza cellulare e della "*long-term potentiation*".

Alcuni autori hanno studiato gli effetti dell'arricchimento ambientale precoce sulla neuroplasticità e sul comportamento. Essere allevati in un nido comune (CN), ovvero un singolo nido dove tre madri tengono insieme i loro piccoli e condividono i comportamenti di accudimento dalla nascita allo svezzamento, offre ai piccoli in fase di sviluppo un ambiente altamente stimolante dal punto di vista sociale. Da adulti, i topi allevati in un nido comune, confrontati con topi allevati in un nido standard, mostrano un incremento del livello di BDNF e una più lunga sopravvivenza delle cellule bromodeossipuridina-positivo nell'ippocampo. I topi allevati nel nido comune inoltre, pur mostrando livelli di esplorazione e di attività locomotoria simili a quelli dei topi allevati in nido standard, presentano un aumento dei comportamenti di tipo ansioso. Da tali osservazioni si evince che una stimolazione ambientale altamente socializzante in fase precoce produce un incremento della neuroplasticità, condizione che però sembra correlare

con un aumento dei comportamenti di tipo ansioso-depressivo nell'età adulta.

Dati recenti suggeriscono che le neurotrofine potrebbero essere i mediatori in grado di tradurre gli effetti delle manipolazioni ambientali, ad esempio l'interruzione della relazione madre-figli, sullo sviluppo del cervello. Le neurotrofine NGF (Nerve Growth Factor) e il BDNF rivestono un ruolo importante nella fase dello sviluppo cerebrale, mentre nell'animale adulto sono principalmente responsabili del mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale dei neuroni. Modificazioni del livello delle neurotrofine durante gli stadi critici dello sviluppo potrebbero risultare in cambiamenti a lungo termine della plasticità neuronale e determinare una maggiore vulnerabilità all'invecchiamento e alla psicopatologia.

Per chiarire l'ontogenesi del BDNF, sono stati analizzati i livelli di espressione del gene del BDNF nelle varie fasi di sviluppo delle arvicole di prateria e di montagna, dove l'RNA m del BDNF compare precocemente e transitoriamente con una specificità regionale. Nel giro dentato e nella regione CA 3 dell'ippocampo, l'RNAm per il BDNF è presente in epoca neonatale, aumenta gradualmente durante lo sviluppo e raggiunge un picco durante lo svezzamento, per poi ritornare rapidamente a livelli inferiori tipici dell'età adulta. Nel

nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, i livelli di RNAm si mantengono invariati fino allo svezzamento per poi presentare un significativo incremento e raggiungere i livelli dell'adulto all'età di tre mesi. L'RNAm presenta inoltre un pattern di sviluppo specie-specifico: nella corteccia del cingolo, il processo di differenziazione mostra un incremento transitorio nella seconda e nella terza settimana dopo la nascita, seguito da un decremento in epoca adulta nelle arvicole di prateria, ma persiste invariato durante tutto lo sviluppo nelle arvicole di montagna.

In generale, le arvicole di montagna raggiungono un pattern adulto nell'espressione dell'RNAm più precocemente rispetto alle arvicole di prateria. Nel loro insieme questi dati indicano che la funzione del BDNF è probabilmente diversa nel cervello infantile rispetto a quello adulto e che le due specie di arvicola differiscono nel pattern ontogenetico dell'espressione dell'RNAm per il BDNF in maniera regione-specifica, aspetto che probabilmente è correlato alle diversità in termini di strategie di vita e di sviluppo cerebrale e comportamentale (Marazziti et al., 2008).

Capitolo 3. L'attaccamento romantico come prototipo dell'attaccamento umano

3.1

Attaccamento romantico

Un tipo di legame, cruciale per la sopravvivenza della specie umana, è rappresentato dalla cosiddetta relazione romantica (RR). La RR può essere definita come il realizzarsi di una relazione con il partner (Hazan & Shaver, 1987) caratterizzata da una specifica selezione di un lui o una lei, generalmente tra individui al di fuori della famiglia (Marazziti, 2002). Questo è il vero paradosso: gli esseri umani sono attratti, corteggiano e si riproducono con individui non geneticamente correlati, che sarebbero altrimenti istintivamente evitati. Pertanto, la RR può essere considerata la strategia psicologica che ci consente di superare la neofobia, di accoppiarci e di creare un legame forte, spesso per tutta la vita, con un completo estraneo, permettendoci di generare una prole più in salute. L'insieme delle emozioni, dei comportamenti e della consapevolezza soggettiva degli interi processi costituisce, forse, l'essenza dell'amore.

Se alcune componenti di questi processi complessi possono essere identificate tra i mammiferi, ciò che rende la RR tipica degli esseri

umani è l'evidenza che la formazione del rapporto di coppia nella nostra specie non è correlato solo alla riproduzione, ma anche alla creazione di strutture di gruppo e organizzazioni sociali col fine ultimo di creare un ambiente sicuro, in cui i nuovi nati possano essere protetti fino a quando non saranno autonomi. Questo è fondamentale per gli esseri umani, i cui neonati sono i più deboli e richiedono una cura più lunga rispetto agli altri mammiferi. La natura ha equipaggiato la specie umana con meccanismi di complessità crescente affinché l'attenzione sia focalizzata a un solo partner e si crei e si mantenga una sensazione di sicurezza, ricompensando i partner con quel sentimento di piacere e completezza che chiamiamo amore.

Tuttavia, non sorprende che specifici meccanismi cerebrali si siano evoluti per realizzare tale obiettivo, come per dire che la RR e l'amore non siano regolati dal caso, bensì da processi biologici ben stabiliti, con importanti ed evidenti conseguenze dal punto di vista evoluzionistico.

Senza dubbio, le teorie evoluzionistiche hanno giocato un ruolo determinante nel promuovere, nelle decadi passate, un crescente interesse degli scienziati verso le possibili basi biologiche dell'amore. Per lungo tempo, infatti, l'amore ed i sentimenti in genere non stati considerati sufficientemente meritevoli di essere studiati in modo

scientifico; sono stati infatti trascurati e circondati dallo scetticismo, essendo diffusa la convinzione di sprecare tempo e risorse indagando essi invece che le vere patologie (Carter, 1998). Questo è stato il maggior ostacolo, cui si sono aggiunti problemi concreti legati alla ricerca in questo campo e legati alla soggettività (Porges, 1997); i metodi scientifici sono apparsi, in un primo momento, inappropriati per esplorare le caratteristiche personali delle emozioni, che sempre mostrano peculiarità collegate all'individuo stesso.

In aggiunta, gli essere umani hanno conquistato la consapevolezza dell'amore e la esprimono con il sottile linguaggio, spesso poetico, degli scrittori, artisti e poeti che hanno fornito splendide descrizioni delle differenti componenti di questo complesso sentimento, o dei soggettivi stati fisici correlati ad esso, considerate esaustive persino da eminenti scienziati come Harlow (1952).

Fortunatamente, negli ultimi venti anni, la crescita delle neuroscienze ha rivoluzionato l'approccio alla mente e ha profondamente mitigato l'originale scetticismo nei confronti dell'approccio scientifico alle emozioni. Come ha scritto LeDoux (2000) "... le Neuroscienze possono far rinascere la ricerca sulle emozioni, fornendo un metodo che permetta il suo studio indipendente dall'esperienza soggettiva..." Pertanto, le neuroscienze, invece che promuovere la morte degli studi

delle emozioni, come temuto inizialmente, hanno fornito in definitiva strumenti affidabili per indagarle.

3.1.1

Aspetti neurobiologici dell'attrazione

L'attrazione rappresenta la fase iniziale della RR; è presente in tutte le culture e società, dove è stata indagata, e si ritiene che abbia forti basi biologiche e sia geneticamente determinata (Jankoviak & Fisher, 1992). Nella maggior parte dei casi, è una esperienza improvvisa e imprevedibile che ha lo specifico obiettivo di favorire un legame tra due individui non imparentati, dato che più i partner sono geneticamente differenti tanto più sane saranno le successive generazioni. Ciò è confermato da recenti studi che mostrano come le ragazze trovino più attraenti coetanei che sono maggiormente differenti da loro dal punto di vista genetico (McCoy & Pitino, 2002). In accordo con le teorie evoluzionistiche, si ritiene che l'attrazione duri tra i sei mesi ed i tre anni, considerato tempo sufficiente per consentire ad un uomo di stare vicino ad una donna, quest'ultima di rimanere incinta e fornire le cure primarie al nascituro (Fisher, 1992).

Non è disponibile un correlato biologico dell'inizio dell'attrazione umana, mentre negli animali numerosi dati hanno sottolineato un possibile ruolo nella selezione, nell'accoppiamento e nel successivo comportamento sessuale, dei ferormoni, la cui influenza nell'uomo è dibattuta (Weller, 1998; Keverne, 2002). Esiste un ampio consenso che i ferormoni prodotti dalle ghiandole sudoripare ascellari, possono determinare un sincronismo mestruale tra le donne che condividono lo stesso ambiente. Queste sostanze non sono percepite come aventi un odore particolare, ma tuttavia possono influenzare la durata del ciclo mestruale, probabilmente interferendo con differenti ormoni. In aggiunta, dati concordi suggeriscono l'esistenza nelle donne di ferormoni segnale capaci di influenzare la scelta del partner. Al contrario, sembra prematuro trarre qualsiasi conclusione riguardo agli effetti dei ferormoni sull'attrazione, poiché è stata valutata solo in condizioni di laboratorio (Chen & Haviland-Jones, 1999; Jacob et al., 2002).

E' stato proposto di recente un modello di attrazione che è per lo più speculativo, sebbene basato su quanto già proposto per le emozioni di base, come la paura e l'ansia: " Se vogliamo comprendere i sentimenti sarà necessario capire come funziona il sistema di base..."(LeDoux, 2000). In accordo con questa linea di pensiero, si può ritenere che

l'attrazione sia una emozione primordiale, poiché è fondamentale per la sopravvivenza della specie e, pertanto, potrebbe condividere alcune basi neurobiologiche con la paura e l'ansia. E' stato così ipotizzato che diversi fattori scatenanti, come i cambiamenti ormonali, gli eventi di vita etc., possano cambiare la nostra chimica o il funzionamento cerebrale, predisponendo il nostro cervello a divenire suscettibile agli stimoli provenienti da altri individui e, in ultimo, ad innamorarsi (Marazziti & Cassano, 2003). Gli stimoli principali sarebbero visivi, determinando così l'importanza della visione per gli esseri umani, ma anche uditivi, tattili, gustativi, olfattivi. Tali stimoli, dopo il primo processamento nel talamo, sono generalmente divisi in due fasci principali: uno è diretto immediatamente all'amigdala, tramite una via breve, mentre l'altro fascio percorre una via più lunga che dal talamo va alla corteccia e poi all'amigdala. L'amigdala, una volta attivata, modula una serie di risposte in differenti aree cerebrali e in organi periferici; i mutamenti nelle funzioni neurovegetative rappresentano le basi per i sentimenti soggettivi dell'emozione (Damasio, 2003). La corteccia, a sua volta, sarebbe informata dall'amigdala stessa del suo funzionamento e discriminerebbe la qualità (paura? gioia? innamoramento?) di questa attivazione, rendendo l'individuo cosciente del sentimento. A questo punto, lei o lui può facilmente

comprendere se, ad esempio, non è spaventato o ansioso, ma innamorato: questo permette una programmazione più sofisticata delle successive ed appropriate strategie, come quelle che permettono a lui o a lei di incontrare di nuovo il partner (Marazziti & Cassano, 2003). Tuttavia, il primo processo non è volontario. Per questa ragione è difficile, sebbene non impossibile, contrastarlo e, per lo stesso motivo, potrebbe non essere facile descriverlo.

La scelta di un individuo invece di un altro non sarebbe casuale, perché in genere viene scelto qualcuno in grado di evocare stati positivi correlati a ricordi registrati nell'ippocampo. Ciò è in accordo con i costrutti psicologici che hanno rivelato un ruolo cruciale delle esperienze iniziali con i *caregiver* primari nella formazione delle cosiddette “mappe dell'amore”.

L'attrazione mostra alcuni aspetti distintivi. È generalmente caratterizzata da un alterato stato mentale con un'elevazione dell'umore, contraddistinto da una sensazione di energia e di forza, da una perdita dell'appetito, da insonnia, elementi simili alla fase ipomaniacale del disturbo bipolare (Liebowitz, 1983; Marazziti & Cassano, 2003). In alternativa, l'attrazione potrebbe essere caratterizzata da cambiamenti d'umore che spaziano dalla depressione alla gioia e che sono correlati alla risposta del partner, in analogia alle

fasi opposte del disturbo bipolare. Dunque, è stato suggerito che alla base dell'attrazione potrebbero esserci le stesse anomalie neurochimiche riscontrate nel disturbo bipolare, come un incremento del funzionamento dei sistemi della noradrenalina e della dopamina, mentre un ruolo diretto della feniletilammina, neurotrasmettitore simile alle anfetamine, proposto da Liebowitz, sebbene intrigante, non è mai stato supportato da dati sperimentali.

Un altro elemento dell'attrazione è rappresentato da una intensa brama del partner e da specifici schemi comportamentali volti a suscitare una risposta reciproca: tali schemi sono simili alle compulsioni, e forse sono causati da un aumento dei livelli di dopamina e da una riduzione delle concentrazioni di serotonina (Marazziti & Cassano, 2003).

Inoltre, si verifica un cambiamento significativo della consapevolezza nei riguardi del partner, considerato “il più straordinario individuo al mondo” . A ciò si unisce un'attenzione focalizzata su di lui/lei, che conduce ad un interesse ridotto per le attività di routine. Questo è probabilmente dovuto ad aumentati livelli di peptidi oppioidi e dopamina. L'ultima caratteristica, considerata l'aspetto centrale dell'attrazione (Fisher, 1992), è data dai pensieri intrusivi riguardo al partner, che somigliano alle ossessioni tipiche del disturbo ossessivo-compulsivo (DOC) (Marazziti et al., 1999). Questa attività

immaginaria sull'oggetto dell'amore è una componente esclusivamente umana: questa caratteristica cognitiva dell'amore può esistere e persistere anche senza relazione affettiva e, in quanto tale, può essere sublimata attraverso l'arte o le esperienze religiose/mistiche. Questa componente dell'amore, tipica della prima fase della relazione, può essere compresa lungo una prospettiva dimensionale. Le dimensioni possono essere definite come i prodotti di base del funzionamento della mente, e sono ad esempio l'aggressività, l'umore, l'intuizione che, in alcuni casi, sono state correlate con un'estrema semplificazione, considerata da alcuni autori eccessiva (Changeaux, 1985), al funzionamento dei singoli neurotrasmettitori.

Tuttavia, tale modello ha fornito uno strumento di ricerca per esplorare le relazioni tra stati normali e patologici, includendo condizioni borderline o non espresse a pieno (Jenike, 1990; Hollander, 1993; Cassano et al., 1997). L'ossessività, dunque, sarebbe una dimensione normale della mente umana che si vede bene nel corso di una relazione romantica e nell'amore parentale (Leckman et al., 1999). Entrambe queste due condizioni sono state, infatti, collegate ad uno stato ossessivo "fisiologico", sebbene, a seconda dello tipo specifico di personalità, possono emergere anche aspetti maniacali,

depressivi o paranoidi (Netter, 1989; Forward & Craig, 1991; Griffin-Shelley, 1991). L'ossessività deriverebbe dall'incrocio tra due dimensioni ancora più di base che sarebbero quella della "certezza/incertezza" e della "consapevolezza/non consapevolezza". La dimensione "certezza/incertezza" potrebbe essere principalmente correlata al sistema serotoninergico. In effetti, la serotonina in un gruppo di soggetti innamorati era a livelli più bassi che in individui senza relazione affettiva e analoga a quella osservata in un gruppo di pazienti con disturbo ossessivo-compulsivo (DOC) (Marazziti et al., 1999). Pertanto, è possibile ipotizzare un continuum dal disturbo ossessivo-compulsivo (incertezza/consapevolezza), attraverso l'ideazione prevalente tipica degli innamorati (certezza/consapevolezza), fino agli stati deliranti (certezza/assente consapevolezza): sono presenti in letteratura osservazioni sul passaggio dalla normalità alla paranoia anche nell'esperienza amorosa (Forward & Craig, 1991; Griffin-Shelley, 1991). Inoltre, come sottolineano vari autori (Leckman et al., 1999; Kane, 1987; O'Dwyer & Marks, 2000; Marazziti et al., 2008), l'amore, il rapporto di coppia, la relazione madre-figlio e alcune condizioni patologiche, come il DOC e la paranoia, possono essere correlati agli stessi sistemi neurobiologici. Il rischio di diventare completamente "ossessivi" e

“paranoici” nei confronti del partner potrebbe essere il prezzo da pagare, in termini evolutivisti, per garantire la relazione. Probabilmente la natura ha creato questa sorta di follia transitoria per rendere gli esseri umani più aperti ed inclini verso individui non imparentati. Tutto ciò permette di superare la neofobia, l’ansia di separazione dalla famiglia di origine e l’abbandono del “nido sicuro”. La natura è interessata nel perpetuare e rafforzare la nostra specie. È fondamentale che persone non imparentate si incontrino, si innamorino e, possibilmente, procreino. Gli uomini devono essere “folli” per dimenticare tutte le loro paure quando incontrano “quella persona speciale”, e per abbandonare la riluttanza di mostrare i propri aspetti più intimi a lui/lei.

È interessante notare come lo studio effettuato a Pisa abbia mostrato che le anomalie della serotonina non durano nel tempo, poiché, dopo dodici-diciotto mesi dall’inizio della relazione, esse ritornano a valori normali (Marazziti et al., 1999). Questo è coerente con gli studi antropologici che riportano come l’attrazione si mantenga non più di tre anni (Jankoviak & Fisher, 1992).

In accordo con questo modello, riguardo all’analogia tra l’innamoramento e stress, vi sono osservazioni di specifiche alterazioni ormonali (Marazziti & Cassano, 2004).

3.1.2

Aspetti neurobiologici dell'attaccamento

Se l'innamoramento ha successo, vale a dire se il partner contraccambia e i due individui iniziano una relazione, dopo qualche tempo i sentimenti soggettivi sono completamente diversi. L'umore è più stabile, l'ansia è ridotta, la mente è libera dei pensieri ossessivi sul partner. Probabilmente, la tempesta chimica, che ha inondato il cervello come un diluvio, è sfumata. Essa è antieconomica, in quanto determinerebbe un estremo rilascio di neurotrasmettitori e un'iperstimolazione recettoriale, non può essere tollerata a lungo. Tuttavia, è più corretto affermare che l'attrazione, piuttosto che concludersi, se la relazione prosegue, è sostituita da un altro processo, rappresentato dall'attaccamento (Jankoviak & Fisher, 1992; Marazziti & Cassano, 2003). L'attaccamento è fondamentale nel tenere uniti due individui, una volta che la fiamma dell'amore passionale sta svanendo. L'attaccamento romantico potrebbe essere, perciò, definito come la "colla" necessaria per sopportare il partner nel tempo e per il proseguimento di una relazione di successo.

Tuttavia, al giorno d'oggi, l'attaccamento non è considerato solo una conseguenza dell'ansia di separazione, in quanto è chiaro che presenta

anche una valenza positiva, collegata ai sentimenti positivi ed alla ricompensa legata alla formazione dei legami sociali e, come sottolineato (Insel, 1997), “..non esiste una ragione ovvia per cui l’attaccamento e la separazione dovrebbero essere determinati dallo stesso sistema neurale”.

Non è chiara, ad oggi, l’importanza delle scoperte relative agli animali per l’uomo e, soprattutto, per l’attaccamento romantico e l’amore (Insel & Young, 2001; Young & Wang, 2004). Come già detto, recettori per l’ossitocina nell’encefalo umano sono largamente distribuiti nella substantia nigra e nel globus pallidus, aree che, come dimostrato, si attivano negli adulti alla vista di foto dei propri partner e nelle madri che osservano i figli (Bartels & Zeki, 2004). Anche il cingolato anteriore e l’insula mediale sono coinvolti in tale risposta. Questo schema di attivazione, in accordo con quanto avviene durante l’euforia indotta dalla cocaina (Young et al., 2001; Young, 2002), conferma l’esistenza di un legame con il circuito della gratificazione (Insel, 2003).

È stato dimostrato che la somministrazione di ossitocina nell’uomo aumenta la fiducia. Ancora una volta è stato confermato il coinvolgimento dell’amigdala, elemento centrale del circuito

neurologico della paura e del riconoscimento sociale (Kosfeld et al., 2005).

Un recente studio a doppio cieco, basato sull'impiego della risonanza magnetica per visualizzare l'attivazione dell'amigdala in risposta a stimoli visivi paurosi, ha mostrato come la funzionalità dell'amigdala umana sia fortemente modulata dall'ossitocina: in confronto al placebo, l'ossitocina riduce in modo considerevole l'attivazione dell'amigdala ed il collegamento di quest'ultima con le regioni cerebrali coinvolte nelle manifestazioni autonome e comportamentali della paura (Kirsch et al., 2005).

Questo effetto è localizzato a livello del mesencefalo e comprende entrambe le regioni del grigio periacqueduttale e della formazione reticolare, aree rilevanti a cui il nucleo centrale dell'amigdala proietta (LeDoux, 2000) e che mediano la paura e l'arousal (LeDoux et al., 1988). In accordo con questi risultati, si è visto come la risposta autonoma alle immagini negative venga ridotta grazie all'ossitocina (Pittman et al., 1993).

È interessante notare come la somministrazione di ossitocina non influisce sui risultati delle scale che misurano alcuni stati psicologici. Questo è in accordo con le osservazioni di Kosfeld et al. (2005) che non ha individuato nessun effetto dell'ossitocina sull'umore, ma

hanno dimostrato come, a livello comportamentale, sia necessaria l'interazione sociale reale per far emergere il ruolo dell'ossitocina. Quindi, l'effetto del peptide sul comportamento è evidente nel contesto sociale, ma non quando i soggetti rimangono in isolamento.

Inoltre, la riduzione dell'attivazione dell'amigdala è stata più significativa per stimoli rilevanti dal punto di vista sociale (volti) che per scene meno significative (Prather et al., 2001; Meyer-Lindenberg et al., 2005).

Inoltre, l'ossitocina esercita un ruolo fondamentale nel comportamento sessuale. È ben documentato che i livelli di ossitocina circolante aumentano durante la stimolazione sessuale, l'eccitazione e l'apice dell'orgasmo, sia negli uomini che nelle donne (Carmichael et al., 1987; Carter, 1992). Le concentrazioni plasmatiche di ossitocina e vasopressina sono state misurate negli uomini durante l'eccitazione sessuale e durante l'eiaculazione: la vasopressina plasmatica era aumentata in modo significativo durante l'eccitazione (Murphy & Dwarte, 1987). Tuttavia, durante l'eiaculazione, i livelli di ossitocina plasmatica erano quintuplicati, dopo trenta minuti erano tornati ad una concentrazione basale. La vasopressina, invece, era già tornata a livelli basali al momento della eiaculazione ed era rimasta stabile nel tempo. Gli uomini, che avevano assunto l'antagonista oppioide

naloxone prima della masturbazione, avevano riduzioni sia nella secrezione dell'ossitocina che nel grado di eccitazione e di orgasmo. Anche nelle donne sono stati misurati i picchi della ossitocina plasmatica al momento e subito dopo l'orgasmo (Blaicher et al., 1995). Durante l'orgasmo l'intensità delle contrazioni muscolari, sia negli uomini che nelle donne, era correlata alla concentrazione plasmatica di ossitocina (Carmichael et al., 1994). Tutto ciò suggerisce che, gli effetti dell'ossitocina siano legati alla capacità di stimolare la contrazione delle cellule muscolari lisce nell'area genitale e pelvica. In donne, durante la somministrazione intranasale di ossitocina, sono stati riscontrati una marcata eccitazione sessuale e orgasmi di particolare intensità. Anderson-Hunt and Dennerstein (1994, 1995), infatti, hanno descritto il caso di una donna che, dopo circa due ore dall'uso di spray a base di ossitocina sintetica, aveva notato una abbondante secrezione vaginale e, in seguito, un desiderio sessuale intenso. Questo effetto poteva essere provocato solo durante l'assunzione giornaliera di contraccettivo orale estroprogestinico, tale effetto poteva essere causato da azioni dirette dell'ossitocina sugli organi sessuali o sulla sensibilità nervosa.

Pochi studi hanno dimostrato come i livelli di ossitocina variano durante il ciclo mestruale (Altemus et al., 2001). Precedentemente, in

modelli animali è stata descritta una correlazione biologica tra l'ossitocina ed il processo fisiologico della regolazione di LH (Robinson & Evans, 1990). Tuttavia, è stato mostrato come la riduzione dell'attività dell'ossitocina endogena influenza il ciclo ovarico (Evans et al., 2003). Recentemente, è stato confermato che, in donne fertili ed in salute, con ciclo mestruale regolare, con attività sessuale normale e senza terapia anticoncezionale, i livelli plasmatici di ossitocina variano durante il ciclo mestruale. Durante la fase luteale i livelli plasmatici di ossitocina sono marcatamente più bassi rispetto a quelli della fase follicolare e dell'ovulazione (Salonia et al., 2005). Tuttavia, sia nelle donne con terapia anticoncezionale che in quelle senza, i livelli plasmatici di ossitocina si correlano, in modo significativo, con le specifiche componenti della risposta sessuale, vale a dire la lubrificazione genitale, confermando il ruolo di questo neurormone nell'eccitazione e nell'attivazione delle funzioni sessuali periferiche. Complessivamente, grazie ai suoi effetti periferici sugli organi sessuali, l'ossitocina potrebbe influenzare e sensibilizzare i neuroni centrali deputati alle percezioni cognitive dell'orgasmo e potrebbe, perciò, fungere da base fisiologica per il comportamento e le attività sessuali nell'uomo, così come nell'animale.

È interessante sottolineare come, nell'uomo, la concentrazione di ossitocina sembra aumentare durante lo svolgimento di differenti tecniche di rilassamento e, pertanto, è ritenuta un mediatore capace di ridurre le risposte allo stress (Carter, 1992). Quindi, è stato suggerito che possa mediare i benefici di una relazione positiva, promuovendo la salute, nello specifico una minor incidenza di malattie cardiovascolari e di depressione, soprattutto in soggetti con un compagno stabile (Uvnas-Moberg, 1998).

Dunque, l'ossitocina potrebbe essere considerata un elemento essenziale nell'assicurare gli effetti di ricompensa "reward" e di piacere, legati a una relazione romantica, incentivando il partner sessuale ad accettare il rischio insito nei legami sociali, attraverso la modulazione dei meccanismi dell'ansia. Vale adire, da un lato l'ossitocina, stimolata dall'attivazione dell'amigdala, ne promuove la riduzione, e dall'altra attiva il circuito dopaminergico del piacere. Certamente, in individui particolarmente vulnerabili, questi delicati meccanismi potrebbero essere maladattativi, ovvero questi soggetti potrebbero diventare troppo ansiosi e, perciò, superare il confine tra la normalità e gli stati patologici, fino al punto di sviluppare un disturbo psichiatrico.

3.1.3

Stili di attaccamento

Secondo Bowlby l'attaccamento garantisce al bambino la vicinanza e la protezione del *caregiver*, consentendo così la sopravvivenza dell'individuo. La qualità delle cure ricevute, la sensibilità e la disponibilità della madre determinano lo stile di attaccamento del bambino. Nell'ambito dello studio dell'attaccamento infantile, un ruolo centrale è stato rivestito dalla procedura della *Strange Situation* ideata da Mary Ainsworth. Sono state così identificate tre tipologie fondamentali di attaccamento nel bambino, ossia "sicuro", "insicuro-evitante", "insicuro-resistente" (Ainsworth, 1978). Successivamente è stato classificato un quarto tipo, ovvero "disorganizzato-disorientato" (Main & Weston, 1981; Main & Solomon, 1990).

I bambini con stile di attaccamento "sicuro"(B), posti in un ambiente sconosciuto, tendono ad esplorarlo ed a dedicarsi al gioco. Pur mostrando disagio all'allontanamento della madre, sono facilmente consolabili al suo ritorno. Sono fiduciosi nella capacità del *caregiver* di rispondere e riconoscere le loro richieste.

Appartengono alla categoria "insicuro-evitante"(A) bambini che mostrano uno scarso disagio, né piangono, alla separazione dalla

madre. Evitano il genitore al momento della riunione, che fronteggiano in modo non emozionale. Focalizzano l'attenzione sull'ambiente e sul gioco per tutta la durata della procedura. Data la mancata fiducia nelle capacità *caregiver* di rispondere ai loro bisogni, tendono a difendersi nascondendo il loro disagio e le loro emozioni.

I bambini caratterizzati da stile di attaccamento "insicuro-resistente"(C) presentano un profondo disagio ed ansia, sia prima che nel momento della separazione dalla madre. Non ottengono conforto neppure al momento della riunione. L'attenzione rimane per tutta la procedura sul genitore. Le basi di questo comportamento sembrano risiedere nell'esperienza d'interazione con un genitore che risponde in modo imprevedibile alle richieste del bambino e che risulta inaffidabile nelle difficoltà. Il bambino, perciò, tende ad estremizzare le proprie emozioni per assicurarsi l'attenzione del *caregiver*.

Infine, l'attaccamento di tipo "disorganizzato-disorientato"(D) è caratterizzato da comportamenti contraddittori: bambini che piangono a causa della separazione dalla madre, seguitamente ignorata ed evitata al momento della riunione. Altri bambini si avvicinano alla madre e quindi, dopo aver stabilito il contatto con lei, si scostano bruscamente e rimangono immobili al centro della stanza, come "congelati" (*freezing*). Tali *patterns* comportamentali, che

costituiscono un misto peculiare e inclassificabile di comportamenti evitanti e resistenti, presentano notevoli analogie con quei comportamenti che gli etologi definiscono “conflittuali”, vale a dire comportamenti che derivano dall’attivazione simultanea di sistemi incompatibili (Hinde, 1970). Le ricerche più recenti hanno ampiamente documentato come questa categoria sia particolarmente numerosa nei campioni ad alto rischio, caratterizzati da basso livello socio-culturale, psicopatologia genitoriale, trascuratezza, maltrattamento e abuso, di tipo fisico e sessuale (Main e Hesse, 1990). Gli schemi relazionali di attaccamento e le ripetute esperienze interattive vengono progressivamente interiorizzati nel corso dello sviluppo del bambino e vanno così a formare Modelli operativi interni (MOI) di Sé, della figura di attaccamento e degli altri. Secondo le stesse parole di Bowlby, “Ogni individuo costruisce modelli operativi del mondo e di se stesso in esso, con l’aiuto dei quali percepisce gli avvenimenti, prevede il futuro e costruisce i suoi programmi. Nel modello operativo del mondo che ognuno si costruisce, una caratteristica chiave è la nozione che abbiamo di chi siano le figure di attaccamento, di dove possano essere trovate e di come ci si può aspettare che rispondano. Similmente, nel modello operativo di se stessi che ognuno di noi si costruisce, una caratteristica chiave è la

nostra nozione di quanto accettabili o inaccettabili noi siamo agli occhi delle nostre figure di attaccamento" (Bowlby, 1973). I modelli operativi interni sono, quindi, basati sulle esperienze passate, sulle aspettative relative alla disponibilità ed alle probabili risposte della figura di attaccamento ai propri bisogni. Costituiscono schemi cognitivi con cui l'individuo si pone in relazione con la realtà, interpreta gli eventi, sviluppa previsioni ed aspettative. Le esperienze relative al rapporto con il *caregiver* e quindi i MOI sono fondamentali nel determinare lo stile di attaccamento dell'individuo nel rapporto romantico (Hazan & Shaver, 1987).

Per quanto riguarda lo studio dei processi di attaccamento in età adulta, gli strumenti di valutazione e di misura sono stati messi a punto nell'ambito di due principali filoni di ricerca (Simpson & Rholes, 1998). Il primo filone si è evoluto nel campo della psicologia dello sviluppo e si è concentrato sull'attaccamento nella famiglia nucleare, utilizzando principalmente interviste condotte su soggetti adulti per esaminare e valutare i ricordi delle loro esperienze con i genitori durante l'infanzia. Tra queste interviste, la più nota è certamente la *Adult Attachment Interview* (AAI), sviluppata da Mary Main e dai suoi collaboratori (Main et al., 1985; Main & Goldwyn, 1989). Il secondo filone di ricerca ha preso origine nel campo della

psicologia sociale e si concentrato sull'attaccamento nelle relazioni di coppia, utilizzando soprattutto questionari inerenti le esperienze nelle relazioni intime. Le classiche descrizioni degli stili di attaccamento al partner elaborate da Hazan e Shaver (1987) sono servite da base per la costruzione di varie scale di autovalutazione in grado di fornire delle misure continue. Nell'ambito del secondo filone di ricerca, un significativo passo in avanti è stato compiuto da Brennan, Clark e Shaver. Questi hanno somministrato, ad un campione di milleottantasei studenti, un questionario comprendente trecentoventitre item derivati dalla maggior parte degli strumenti di autovalutazione già esistenti, sottoponendo poi ad analisi fattoriale le relative sessanta sottoscale. È stata così evidenziata la presenza di due fattori principali: il primo, denominato "ansietà", comprende intensa preoccupazione per le relazioni sentimentali, timore di essere abbandonati e frequenti richieste al partner di maggiore coinvolgimento; il secondo, denominato "evitamento", include difficoltà e disagio ad avvicinarsi emotivamente e ad affidarsi al partner. Selezionando gli item risultati maggiormente correlati a questi due fattori, è stato possibile costruire un questionario denominato "Experiences in Close Relationships" (ECR), che comprende due scale di 18 item ciascuna che misurano rispettivamente la dimensione

“evitamento” e la dimensione “ansietà” (Brennan et al., 1998; Picardi et al., 2002).

Per quanto riguarda i legami di coppia tra adulti, è possibile distinguere quattro stili di attaccamento romantico: “preoccupato”, “distanziante”, “timoroso-evitante” e “sicuro”. Ciascuno di questi determina un differente approccio al “rapporto a due”.

I soggetti con stile “preoccupato” (E) hanno un MOI di Sé negativo e MOI dell’Altro positivo, bassa autostima e dipendenza dal giudizio degli altri. Il sistema di attaccamento è attivato in modo elevato. Si tratta di soggetti che tendono ad andare fin troppo facilmente alla ricerca di relazioni, ma che, una volta stabilita la relazione, tendono a comportarsi in modo ambivalente, con una tendenza ad “aggrapparsi” al partner dal quale richiedono la continua attenzione. Gli individui che rientrano in questa categoria si mostrano come intrappolati nei ricordi delle esperienze precoci con figure di attaccamento, verso le quali mostrano un eccessivo grado di coinvolgimento, accompagnato da confusione, passività o rabbia. Spesso appaiono confusi con la loro famiglia di origine, ancora impegnati nel tentativo di compiacere i genitori o intrappolati in un conflitto di ribellione e dipendenza da loro. Parlano a lungo delle esperienze precoci ma in modo caotico e non obiettivo. In molti casi riferiscono di avere avuto un genitore

debole, di solito la madre, che non è riuscita ad assolvere il proprio ruolo di sostegno e ha favorito invece una inversione dei ruoli madre-figlio. Una madre che, pur non essendo stata apertamente rifiutante, si è mostrata comunque incapace di contenere le angosce del bambino, lasciandosi prendere dal panico nelle situazioni di emergenza, e che, nei momenti di evidenti difficoltà nella relazione con il figlio, ha fatto ricorso a continui rimproveri e a critiche persistenti, inducendo nel bambino sentimenti di colpa.

Presentano uno stile di attaccamento “distanziate” (DS) coloro che hanno un MOI di Sé positivo e un MOI dell’Altro negativo. Sono caratterizzati da una marcata fiducia in se stessi, senza interessarsi al giudizio degli altri. Svalutano l’importanza delle relazioni di attaccamento e mostrano una “disposizione ad affermare indipendenza dai legami affettivi” (Bowlby, 1973). Si tratta di individui i cui sistemi di attaccamento sono attivati ad un basso scopo difensivo. Ciò significa che essi sono meno inclini delle persone sicure a cercare intimità e conforto dagli altri. La difesa sottostante è la protezione di se stessi contro i sentimenti penosi, che nascono in molti casi dall’essere stati ripetutamente trascurati, esposti al distacco emotivo oppure al rifiuto. Tali soggetti tendono a minimizzare l’importanza delle relazioni di attaccamento e a fornire risposte superficialmente

collaborative, ma caratterizzate da profonde contraddizioni interne. Tendono ad offrire descrizioni generalizzate delle figure di attaccamento, per lo più (ma non obbligatoriamente) caratterizzate da una forte idealizzazione, senza tuttavia essere in grado di supportarle con ricordi di episodi specifici o producendo ricordi in evidente contrasto con quanto affermato precedentemente. Spesso si esprimono attraverso risposte brevi e/o attraverso l'insistente riferimento a mancanza di ricordi. Nel parlare, infine, dell'importanza e dell'influenza delle loro esperienze precoci, mostrano di avere in relazione a queste, una forma di comprensione che si esprime ad un livello principalmente, se non esclusivamente, intellettuale.

Gli individui con stile "timoroso-evitante" (U) presentano un MOI di Sé e un MOI dell'Altro entrambi negativi. L'autostima in se stessi e negli altri è ridotta, perciò questi soggetti evitano le richieste di aiuto e i conflitti. Non si fidano degli altri e raramente intraprendono relazioni sentimentali, eventualmente vissute con insicurezza. Tendono ad autocolpevolizzarsi per i problemi di coppia, hanno difficoltà a comunicare apertamente e a mostrare i sentimenti al partner.

Lo stile di attaccamento "sicuro"(F) si distingue per un MOI di Sé e degli Altri entrambi positivi. Tali individui non esitano ad intraprendere relazioni affettive, caratterizzate da alta intimità, rispetto

e apertura emotiva. La fiducia in se stessi e negli altri è elevata. Gli adulti classificati come sicuri ricordano ed esplorano, attraverso il dialogo ed il pensiero riflessivo, la loro storia di attaccamento. In particolare si mostrano a loro agio nel descrivere episodi specifici del loro passato lontano, appaiono capaci di integrare i ricordi autobiografici in una visione generale che ha qualità di relativa indipendenza e lucidità. Questi soggetti valutano come influenti e importanti le esperienze correlate all'attaccamento, al tempo stesso mostrano una notevole obiettività nella descrizione di ciascuna relazione di attaccamento. Non temono l'abbandono del compagno. Sono in grado di accettare il partner, anche quando commette errori. Le relazioni tendono, quindi, a durare nel tempo (Main & Goldwyn, 1984, 1985; George et al., 1985; Hazan & Shaver, 1987).

3.2

Scopo della tesi

L'ossitocina, dunque, sembra ampiamente implicata nella neurobiologia dell'attaccamento e, senza dubbio, anche dell'attaccamento romantico, fondamentale nel rapporto di coppia. I dati relativi a questo tipo di attaccamento sono, però, molto scarsi.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare la possibile esistenza di correlazioni tra livelli plasmatici di ossitocina e attaccamento romantico, valutato con un apposito questionario, in un gruppo di 45 individui di entrambi i sessi.

Dato che l'attaccamento romantico rappresenta uno dei legami tipici degli esseri umani, si ritiene che il presente studio non sia solo di riferimento per il "rapporto a due", ma che possa contribuire a chiarire l'importanza del sistema ossitocinergico sul comportamento sociale in generale nell'uomo.

3.3

Materiali e metodi

3.3.1

Soggetti

Per il presente studio sono stati reclutati quarantacinque volontari, dodici di sesso maschile e trentatré di sesso femminile, di età (media \pm D.S.) di 31.5 ± 6.2 anni. Tali soggetti erano individui sani con anamnesi personale e/o familiare negativa per disturbi psichiatrici, che non facevano uso di farmaci psicotropi o sostanze d'abuso. Inoltre non assumevano farmaci di altro genere regolarmente.

A tutti i soggetti di sesso femminile sono stati effettuati i prelievi nella fase follicolare del ciclo ovarico (Salonia et al., 2005).

I soggetti del presente studio sono stati reclutati tra studenti, specializzandi e medici dello staff della Clinica Psichiatrica dell'ospedale Santa Chiara di Pisa e del "Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale" dell'Università di Pisa. I soggetti sono stati selezionati dopo un'intervista psichiatrica dettagliata, condotta da medici psichiatri della Clinica Psichiatrica dell'Ospedale S. Chiara di Pisa. Trentatré soggetti avevano una relazione amorosa in corso della

durata media di ottanta mesi e due settimane, mentre i restanti dodici non avevano nessuna relazione affettiva.

A tutti soggetti è stato effettuato un unico prelievo di sangue, dato che è noto che i livelli di ossitocina nel plasma, a differenza di quelli del liquido cefalorachidiano, non sono soggetti a ritmi circadiani (Amico et al., 1983).

Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso scritto allo studio, che è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Pisa.

3.3.2

Strumenti

Per valutare la relazione romantica è stato utilizzato il questionario “Experiences in Close Relationships” (ECR) (Brennan et al., 2002) nella versione italiana (Picardi et al., 2002) (vedi Appendice).

Come già accennato sopra, l’ECR è costituito da due sottoscale, ciascuna ottenuta dal punteggio di 18 item, che misurano la dimensione “ansietà” e quella “evitamento”.

Per il confronto delle categorie di attaccamento, i punteggi ottenuti al questionario ECR sono stati utilizzati per assegnare i soggetti ad una

delle quattro categorie di attaccamento, utilizzando un criterio di “insicurezza” dell’attaccamento conservativo rispetto alla designazione di un soggetto come insicuro. È stato infatti impiegato come criterio di insicurezza il conseguimento di un punteggio di almeno una deviazione standard superiore al valore normativo riferito al genere e alla fascia di età di appartenenza. In altri termini, i soggetti con punteggi di almeno una deviazione standard superiore al valore normativo per la scala “ansietà”, per la scala “evitamento”, o per entrambe le scale, sono stati classificati rispettivamente come “preoccupati”, “distanzianti”, o “timorosi-evitanti”. I soggetti con punteggi compresi entro una deviazione standard dal valore normativo o inferiori ad esso per entrambe le scale sono stati classificati come “sicuri” (Picardi et al., 2002).

3.3.3

Preparazione del plasma

Ai soggetti partecipanti sono stati prelevati, a digiuno e alle ore 8:00/9:00 del mattino, 20 cc di sangue venoso. Il sangue è stato raccolto in provette contenenti EDTA come anticoagulante, subito trasferito in una provetta contenente aprotinina (Sigma, Milano, Italia)

(0.6 TIU/ml di sangue) ed agitato. I campioni così trattati sono stati successivamente centrifugati delicatamente a $1600 \times g$ per 15 minuti a 22°C , ottenendo un plasma successivamente raccolto, posto in una provetta e conservato a -70°C per un tempo non superiore a quattro settimane.

3.3.4

Cromatografia

La cromatografia è un metodo analitico largamente utilizzato per la separazione, l'identificazione e la determinazione di biomolecole presenti in miscele complesse. Nessun altro metodo di preparazione è così potente e di così generale applicabilità come la cromatografia.

Essa può essere di tipo analitico o preparativo. Tutti i sistemi cromatografici sono costituiti fondamentalmente da due fasi immiscibili tra loro:

- FASE STAZIONARIA IMMOBILE, che può essere un solido, un liquido, o una miscela solido/liquida ed è immobilizzata.
- FASE MOBILE, che può essere liquida, gassosa e deve scorrere attraverso la prima fase.

I componenti di una miscela sono trasportati attraverso la fase stazionaria dal flusso della fase mobile con differenti velocità di migrazione, determinate dalla distribuzione del soluto tra le due fasi, la quale dipende, a sua volta, dalla affinità dei singoli soluti verso queste due. Questa differenza di velocità di migrazione determina la separazione dei soluti.

Nella pratica si distinguono tre tipi di cromatografia:

- Su colonna: in cui la fase stazionaria viene impaccata in colonne di vetro, di teflon, o acciaio e la fase mobile è forzata a passare attraverso la prima sotto pressione o per gravità.
- Su carta: la fase stazionaria aderisce alle fibre di cellulosa di un foglio di carta.
- Su strato sottile: in cui la fase stazionaria ricopre sottoforma di strato sottile piastre di vetro, plastica o metallo.

Queste tecniche avvengono secondo alcuni meccanismi molecolari, già ben definiti e rappresentati da: adsorbimento, partizione, scambio ionico ed esclusione molecolare.

In ciascuna tecnica cromatografica predomina uno di questi meccanismi, che talvolta possono essere presenti simultaneamente.

Nella tecnica di partizione, usata nel presente studio, si ha un supporto solido inerte adeso a una fase stazionaria liquida non polare, mentre la

velocità di migrazione del soluto è determinata dalla sua solubilità relativa nelle due fasi.

La tecnica su colonna è la modalità più impiegata e viene definita “cromatografia di eluizione”. Al tempo t_0 una singola porzione del campione, disciolta nella fase mobile, è introdotta nella colonna; successivamente i componenti del campione si distribuiscono tra le due fasi. L’aggiunta del solvente determina l’eluizione di un soluto attraverso la colonna. L’introduzione di ulteriori quantità di fase mobile forza la frazione disciolta del campione a scendere lungo la colonna, dove avviene un’ulteriore ripartizione. Poiché il movimento di ogni soluto può avvenire solo nella fase mobile, la velocità media con cui quest’ultimo migra dipende dalla frazione di tempo che esso trascorre in questa fase. Idealmente, le differenze di velocità risultanti, fanno sì che i componenti di una miscela si distribuiscano in bande o zone diverse lungo la colonna. Questo permette di ottenere la separazione delle diverse specie presenti in una miscela.

Dopo l’inserimento del campione, il tempo necessario per ottenere il soluto all’uscita della colonna è detto “tempo di ritenzione”, t_r . Per ogni analita si registra il “volume di ritenzione”, V_r , definito come il volume della fase mobile che attraversa la colonna dal momento

dell'introduzione del campione fino all'uscita di esso all'altro estremo della colonna.

Parametri molto importanti per ogni tipo di cromatografia sono l'efficienza e la risoluzione. Il processo cromatografico ideale è quello in cui i componenti di una miscela sviluppano una separazione risultante in bande strette, completamente risolte le une dalle altre. La strettezza di una banda o di un picco è una misura dell'efficienza del processo separativo, che, in particolare, è data dal numero dei piatti teorici, ovvero zone ideali con cui è suddivisa una colonna. Più è alto questo numero, maggiore è l'efficienza di una colonna.

La risoluzione dà una misura della capacità di un sistema cromatografico di separare un analita rispetto ad un altro.

Tra le molte tecniche cromatografiche disponibili, il presente studio ha utilizzato una *Cromatografia di partizione in fase inversa, a scopo preparativo, su colonna*, con l'utilizzo di apposite colonne cromatografiche sepcolumn C18, (Waters).

Le colonne sepcolumn C18, impiegate nello studio, contengono un impaccamento dato da una fase stazionaria costituita da 200mg di octadecilsilano, che forma una fase liquida non polare distribuita su una matrice solida inerte a cui è legata covalentemente. L'octadecilsilano è un composto idrocarburico, i cui componenti

fondamentali sono una catena lineare di 18 atomi di carbonio, un atomo di Si e un atomo di Cl, importanti nella formazione del legame covalente con i silani (Si-OH) della matrice inerte (derivattizzazione), che comporta una situazione molto stabile (Fig. 6). La matrice inerte è polare ed è data da particelle di silice di tipo poroso del diametro di 10 μ m.

Con tali colonne è stato utilizzato il principio classico della fase inversa, ovvero fase stazionaria apolare e fase mobile polare.

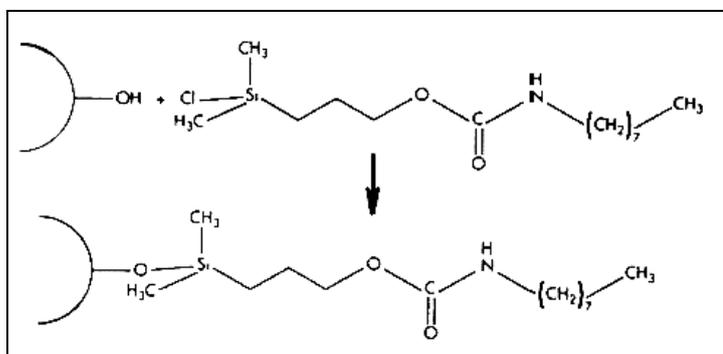


Figura 6. Processo di derivattizzazione.

3.3.5

Estrazione del peptide dal plasma

6 ml di ogni campione di plasma sono stati acidificati con eguale volume di soluzione A (1% acido trifluoroacetico); i 12 ml di ogni

campione, così ottenuti, sono stati successivamente trasferiti in tubi da centrifuga, vortexati e centrifugati a 17000 ×g per 20 minuti a 4° C. Da tale centrifugazione, si è ottenuto un sovrinatante, delicatamente raccolto e trasferito in provette di plastica. Al fine di accertare l'eliminazione della maggior parte delle proteine presenti nel plasma, ottenuta mediante l'acidificazione e successiva centrifugazione, il sovrinatante è stato sottoposto a determinazione della concentrazione proteica attraverso metodo Lowry. La successiva fase si basa sull'impiego di colonne cromatografiche Sepcolumn contenenti 200 mg di C18, che permettono di ottenere il peptide purificato. Tali colonne sono state collocate in un apposito strumento, che collegato ad una pompa di aspirazione, permette il passaggio di liquidi attraverso di esse, grazie alla presenza di un apposito rubinetto in fondo ad ogni colonna, di cui lo strumento è dotato. Una volta posizionata nello strumento, ciascuna colonna è stata equilibrata effettuando un lavaggio con 1 ml di soluzione B (60% acetonitrile in 1% trifluoracetico), seguito da un secondo lavaggio applicando 3 ml di soluzione A per 3 volte. Nelle colonne pretrattate è stato caricato il plasma acidificato; per ogni colonna è stato poi effettuato un lavaggio usando 3 ml di soluzione A per 2 volte. Infine, facendo passare attraverso ogni colonna 3 ml di soluzione B, è stato eluito il peptide.

L'eluato contenuto in ogni provetta è stato successivamente disidratato usando una apposita centrifuga-essiccatore Speedvac a -80°C .

3.3.6

Determinazione della concentrazione proteica

Per la determinazione della concentrazione proteica del sovranatante, è stato eseguito il saggio colorimetrico di Lowry del 1951. Tale saggio si basa sull'utilizzo del reattivo Folin Ciocalteau's che reagisce con i gruppi fenolici delle tirosine contenute nelle proteine, producendo, in presenza di ioni rameici, una colorazione blu/porpora, la cui intensità è misurabile mediante uno spettrofotometro.

La determinazione della quantità proteica prevede l'uso delle seguenti soluzioni:

- Folin A: carbonato di sodio 2% + idrossido di sodio 1% in acqua bidistillata;
- Folin B: solfato rameico 0.5% + sodio citrato 1% in acqua bidistillata;
- Folin C: soluzione preparata al momento dell'uso unendo in rapporto 1:50 le due soluzioni sopra dette;

- Folin Ciocalteau's: diluizione 1:1 con acqua bidistillata della preparazione commerciale;
- Soluzione α : costituita da un'aliquota del sovrinatante, diluito con NaOH 0.75;
- Soluzione β : preparata con tampone Tris HCL 50 mM ed NaOH (questa soluzione rappresenta il bianco).

E' stato aggiunto 1 ml della soluzione Folin C alla soluzione α e alla soluzione β e lasciato riposare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Dopodiché, sono stati aggiunti 100 μ l del reattivo di Folin Ciocalteau's e lasciati incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Terminata l'incubazione si sviluppa una colorazione blu di intensità proporzionale alla concentrazione proteica del campione, tale da permettere la lettura dell'assorbimento della soluzione tramite spettrofotometro a 750 nm. Con il valore di assorbanza è stata ricavata la concentrazione di proteine presenti in 100 μ l di campione, utilizzando come riferimento una retta di taratura, costruita precedentemente con una soluzione di albumina bovina a concentrazioni crescenti (da 5 a 50 μ g).

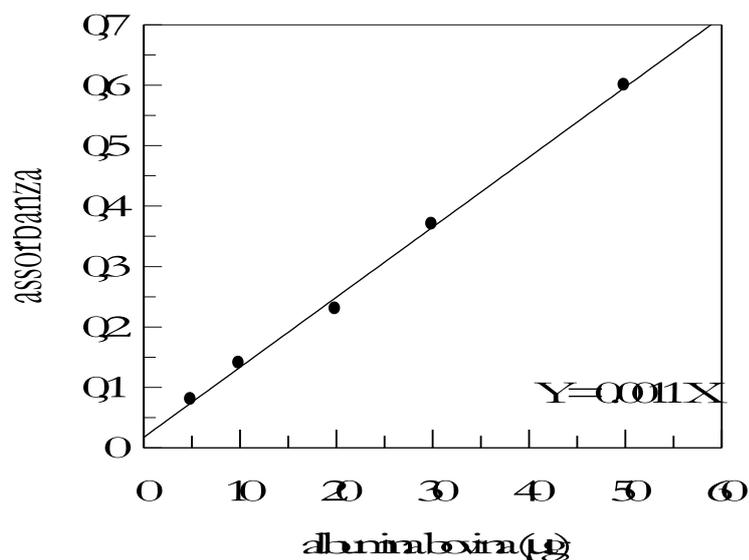


Figura 7. Retta di taratura dell'albumina bovina.

3.3.7

Dosaggio Radioimmunologico (RIA)

Il dosaggio radioimmunologico è un metodo che associa la specificità della reazione immunologica Ag-Ac alla sensibilità di rivelazione delle tecniche radioisotopiche.

Questa tecnica è stata introdotta per la prima volta dai medici Yalow e Berson nel 1960 per misurare i livelli plasmatici di insulina. Da allora, il RIA si è sviluppato notevolmente, venendo applicato estesamente nella misurazione di altri peptidi ormonali e di centinaia di altre sostanze (farmaci, vitamine, enzimi, virus, tossine, etc...), divenendo una tecnica di routine sia in campo clinico che nella ricerca.

Le tecniche RIA sono tra le più sensibili procedure di laboratorio attualmente disponibili; tale sensibilità varia notevolmente in relazione a diversi fattori, quali, ad esempio, il tipo di marcatura adottata (come nel caso dei dosaggi che utilizzano ^{125}I , i quali possono raggiungere una sensibilità dell'ordine di pg/ml).

Per questa sua sensibilità, il RIA è stato sempre il metodo principalmente usato per la determinazione di sostanze presenti in concentrazioni bassissime nei liquidi biologici.

Il dosaggio radioimmunologico fa parte delle tecniche immunochimiche, ovvero, quelle metodiche che si basano sull'interazione specifica Ag-Ac, con la formazione di complessi precipitabili in opportune condizioni.

In base a ciò, componenti fondamentali di una metodica di questo tipo devono essere:

- 1) **ANTICORPO (ANTISIERO):** l'anticorpo è una proteina globulare sierica, prodotta dalle cellule linfoidi ed appartenente alla famiglia delle immunoglobuline. Questo ha la capacità di reagire con l'antigene o con una configurazione antigenica responsabile della sua produzione. Gli anticorpi utilizzati devono essere specifici, sensibili ed avere una costante di affinità accettabile.

- 2) **ANTIGENE:** in immunologia, l'antigene viene definito una sostanza capace di indurre la produzione di anticorpi, riconosciuto e legato dall'anticorpo stesso. Nel dosaggio RIA, l'antigene corrisponde al composto che deve essere misurato nel campione da analizzare.
- 3) **ANTIGENE MARCATO:** l'antigene marcato può essere identico all'antigene che deve essere misurato nel campione. Esso, tuttavia, contiene anche uno o più atomi di un particolare isotopo radioattivo.

Non è necessaria una identica attività biologica dell'antigene marcato e non marcato, mentre è fondamentale un identico comportamento immunologico.

PRODUZIONE DEGLI ANTICORPI. Tutti i vertebrati possono produrre anticorpi contro antigeni estranei ma, nei mammiferi in particolare, avvengono risposte umorali più utili ai fini dell'isolamento di anticorpi per le tecniche immunochimiche. La maggior parte di tali tecniche sfrutta le immunoglobuline IgG. Nella produzione di queste molecole si usano solitamente animali come i conigli. Nell'animale viene inoculato sottocute l'antigene, che è in grado di indurre una risposta immunitaria nello stesso. L'antigene

deve avere fundamentalmente due caratteristiche, ovvero, deve essere eterologo per il coniglio e deve avere un peso molecolare superiore a 5000 dalton.

L'antigene provoca una risposta immunitaria legandosi ai recettori dei linfociti T e B, innescando in questi ultimi una espansione clonale che dà luogo ad una popolazione di plasmacellule, secernenti immunoglobuline. In seguito all'iniezione si ha un periodo di ritardo di circa 10 giorni, a cui segue un aumento esponenziale della concentrazione sierica di Ac, cosa che rappresenta la risposta immunitaria primaria. Se l'animale viene inoculato per la seconda volta, si ha la risposta immunitaria secondaria, con un aumento esponenziale delle immunoglobuline IgG; con una terza inoculazione, si può avere l'immunizzazione dell'animale. A questo punto, tramite prelievi di sangue, è possibile ottenere l'antisiero, da cui tramite centrifugazione o tecniche di purificazione è possibile isolare l'anticorpo di interesse.

Un'immunoglobulina IgG presenta una caratteristica forma a Y composta da due catene pesanti e due catene leggere, legate da un ponte disolfuro. La porzione N-terminale di entrambe le catene presenta la cosiddetta *regione variabile*, che contiene la sequenza responsabile del riconoscimento e del legame verso l'antigene.

MARCATURA DELL'ANTIGENE. E' possibile marcare una sostanza di interesse e far sì che la radioattività sia sufficiente ad essere rilevata. La marcatura implica la scelta di un isotopo radioattivo, l'adesione fisica di quest'ultimo all'analita da marcare e l'isolamento dell'analita marcato in forma purificata. Con tale processo l'antigene non deve perdere la sua immunoreattività e la sua radioattività specifica deve essere alta per una maggiore sensibilità della tecnica.

I principali isotopi utilizzati in questa tecnica sono lo Iodio 125, il Trizio (^3H) e il Cobalto 57: il primo è il più utilizzato, soprattutto nel caso di proteine peptidi ed ormoni.

Sono disponibili diverse tecniche di iodinazione della materia con ^{125}I ed i siti più comuni di iodinazione sono gli aa Tirosina o Istidina. Una delle tecniche più impiegate prevede l'utilizzo di un sistema di sferette, cui sono legati gli enzimi glucosio-ossidasi e latte-perossidasi, in presenza di ioduro di Na, Glucosio e della proteina da iodinare. In questo sistema, il glucosio in presenza di ossigeno viene convertito in lattone dalla glucosio-ossidasi, con produzione di H_2O_2 . La latte-perossidasi, in presenza di H_2O_2 , ossida lo ioduro a Iodio molecolare, che può interagire in queste condizioni con i gruppi fenolici dell'aminoacido tirosina. Lo ioduro in eccesso può essere eliminato mediante gel-filtrazione.

L'isotopo I125 ha un emivita di 60 giorni ed emette radiazioni γ , capaci di penetrare in profondità la materia.

L'attività specifica viene comunemente espressa in microcurie per microgrammo ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) o in disintegrazioni al minuto per micromole ($\text{dpm}/\mu\text{M}$).

INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO. Il dosaggio radioimmunologico fa parte del più ampio gruppo dei dosaggi che avvengono per competizione di legame (saggio di competizione). Alla base di esso vi è appunto il fatto che un antigene non marcato e una quantità costante di antigene marcato, competono simultaneamente per un limitato e costante numero di siti di legame su un anticorpo specifico. In questa situazione, il solo parametro che varia è la concentrazione dell'antigene non marcato, ovvero, l'analita presente in concentrazione ignota nel campione in esame. Inoltre, la concentrazione dell'anticorpo deve essere in difetto rispetto all'antigene marcato.

I tre elementi reagiscono in soluzione, secondo tale reazione:



L'Anticorpo non distingue l'antigene marcato da quello non marcato, perciò si lega ad entrambi con la stessa affinità e secondo la legge di massa, mediante la quale, il tipo di antigene presente in concentrazione maggiore occuperà più siti anticorpali leganti. Si crea in pratica una proporzionalità, secondo la quale più antigene naturale è presente meno antigene marcato si andrà a legare all'anticorpo. In questo modo, maggiore sarà la quantità di Ag marcato spiazzato dall'anticorpo. In base a ciò, si può dire che il rapporto tra Ag legato e Ag totale dipende dalla concentrazione dell'Ag non marcato presente nella soluzione campione.

La costante di affinità per la formazione dei complessi Ag-Ac è estremamente grande e benché la reazione sia di tipo reversibile, l'equilibrio è di gran lunga spostato a destra. In altre parole, i complessi Ag- Ac sono estremamente stabili.

Una volta posti in soluzione questi tre elementi fondamentali, rispettato un eventuale tempo di incubazione e raggiunto l'equilibrio nel sistema, il complesso Ag-Ac formato viene separato dall'Ag rimasto libero. Si procede così alla misurazione della radioattività del complesso precipitato.

CURVA DI TARATURA. Per risalire alla concentrazione ignota di un Ag presente nel campione in esame, è necessaria la costruzione di una curva di taratura. Questa viene determinata mediante l'uso di diluizioni note a concentrazione crescente di Ag non marcato, concentrazioni definite tipicamente con il nome di "standard". Tali soluzioni vengono fatte reagire con una quantità fissa di antigene marcato e di anticorpo, in concentrazioni identiche a quelle usate per il campione incognito. Vengono usate concentrazioni di standard basse, medie e alte, che reagiscono verso l'Ac e l'Ag marcato secondo la legge di massa. Oltre a questi, deve essere effettuata una prova contenente unicamente l'Antigene marcato, posto a reagire con l'anticorpo in assenza di antigene, in modo da ottenere il valore di "conta totale", *TC*.

Raggiunto l'equilibrio in ogni soluzione, la frazione legata all'anticorpo viene separata dalla frazione libera. Dopodiché viene misurata la radioattività del complesso formatosi.

Al fine di costruire la retta, al conteggio ottenuto (in *CPM*) per ogni campione standard, viene innanzitutto sottratto il bianco del dosaggio (*NSB*), ottenendo un valore solitamente indicato come "B".

Dopodiché viene calcolata la capacità legante massima, *BO*, che è l'espressione della quantità totale di antigene marcato legato

all'anticorpo in assenza di antigene non marcato, sottraendo al valore TB ottenuto, il valore NSB. B_0 , viene anche definito come B/T , cioè la frazione di antigene marcato legato all'anticorpo. In generale, un RIA viene allestito in modo tale che la quantità di anticorpo aggiunto leghi circa il 50% dell'antigene marcato inserito, con un range ottimale che va dal 25 al 75% del legame. Una capacità legante massima, maggiore o minore rispetto al 50%, può generare una curva standard insensibile, piatta o con un range basso, poiché, nei due casi, l'anticorpo può legare tutto o solo il 5-15% dell'antigene marcato.

Una volta calcolati i valori B e B_0 , è possibile calcolare la percentuale di antigene marcato, legato in funzione delle concentrazioni note di antigene non marcato presente in ogni standard. Tale parametro rappresenta il "valore plot" B/B_0 (%), da considerato in percentuale.

Per ogni standard, dunque, bisogna considerare tale relazione:

$$B/B_0(\%) = \frac{(\text{CPM standard}) - (\text{NSB}) \times 100}{B_0}$$

Questo valore viene riportato graficamente sull'asse delle ordinate (Y), mentre sull'asse delle ascisse (X) viene riportato il valore delle concentrazioni di antigene non marcato, presente in ogni standard, espresso in $\text{pg}/\mu\text{l}$.

Ottenuta la retta, calcolando il valore del plot $B/B_0\%$ anche per ogni campione in esame a concentrazione ignota e riportando graficamente questo valore con l'asse delle X, è possibile risalire alla concentrazione di Ag non marcato presente nel campione d'interesse.

Nel conteggio di ogni campione, sia standard che d'interesse, deve essere dunque considerato il valore NSB o bianco, che rappresenta il legame non dovuto ad una specifica reazione Ag-Ac.

Esso può essere causato da diverse ragioni:

1. La frazione libera può rimanere intrappolata nel precipitato. Questo si può ovviare o migliorare lavando il precipitato.
2. Si può avere la precipitazione di contaminanti marcati del tracciante. Questo può essere ridotto con un'attenta purificazione del tracciante.
3. Si può verificare l'adsorbimento del tracciante alla superficie della provetta di dosaggio.
4. La tecnica di separazione fisica della frazione libera e legata può essere insoddisfacente.
5. Non è possibile raggiungere una separazione completa della frazione libera e legata, poiché le caratteristiche della frazione libera possono essere simili, ma non identiche, a quelle del complesso legato.

METODI DI SEPARAZIONE IDEALI. Al termine della reazione Ag-Ac, prima del conteggio, è necessaria la separazione tra la frazione di Ag che si è legato all'Ac e quella rimasta libera in soluzione, ossia, che non ha reagito. Tale frazione libera, deve essere rimossa dalla soluzione in esame; a tal fine esistono diverse tecniche, tra cui le più importanti sono:

1.La precipitazione non specifica dei complessi Ag-Ac con sali e solventi (solfato d'ammonio, etanolo, polietilenglicol-PEG).

2.L'immunoprecipitazione dei complessi solubili Ag-Ac (tecnica del doppio Ac).

3.L'adsorbimento dell'antigene su fase solida (tra questi il più importante è l'impiego di provette sensibilizzate con l'anticorpo).

4.L'adsorbimento non specifico dell' antigene con composti quali carbone e carbone-destrano.

Nel presente studio è stata utilizzata la tecnica del doppio anticorpo.

La tecnica del doppio anticorpo ha ottenuto un notevole successo nel RIA e si basa sul fatto che, le IgG di un animale hanno effetto di antigene nel corpo di un altro animale, dove sono in grado di scatenare la risposta immunitaria con la relativa produzione di anticorpi specifici.

Il metodo si propone di precipitare il prodotto solubile della prima reazione (Antigene-Anticorpo 1) con l'aggiunta di un secondo anticorpo diretto contro l'Anticorpo 1. Questo causa, al raggiungimento dell'equilibrio, la formazione di un immunocomplesso insolubile precipitabile, dato da una sorta di reticolo Antigene-Anticorpo 1-Anticorpo 2.

I ricercatori hanno generalmente utilizzato le pecore o le capre per la produzione del secondo anticorpo diretto contro le immunoglobuline purificate dei conigli e dei porcellini d'India. Gli antisieri di pecora o capra devono essere concentrati prima dell'uso su cromatografia o con sali precipitanti. Le diluizioni o le concentrazioni del primo anticorpo, usato nel RIA, sono in genere basse. Il precipitato formato col secondo anticorpo può essere così troppo piccolo per un lavoro accurato e per la separazione. Per questa ragione, vengono aggiunte alla miscela di reazione, siero normale di coniglio, siero normale di porcellino d'India o gamma globuline, alla diluizione finale da 1:50 a 1:3600, per aumentare la massa del precipitato. Il precipitato formato (in genere dopo un tempo di incubazione di 24-48 h) può essere quindi separato dall'Ag marcato libero mediante centrifugazione, ottenendo quest'ultimo nel soprannatante facilmente rimovibile e raccolto per centrifugazione. Un'unica provetta è necessaria per l'incubazione

della reazione, la separazione del precipitato e il conteggio finale della radioattività.

3.3.8

Dosaggio Radioimmunologico dell'ossitocina

Il dosaggio radioimmunologico è stato effettuato con un kit RIA per l'ossitocina (Phoenix Pharmaceuticals), che presenta una sensibilità IC_{50} di circa 5-20pg/tubo e una percentuale di crossreattività del 100%.

Il campione liofilizzato, ottenuto come precedentemente descritto, è stato reidratato utilizzando 250 μ l di Buffer RIA e vortexato successivamente fino a completa dissoluzione del peptide. Da tale soluzione sono stati prelevati 200 μ l, trasferiti in 2 appositi tubi di polistirene in 2 aliquote da 100 μ l, in modo da poter effettuare il dosaggio in duplicato.

I campioni standard del peptide sono stati preparati usando quantità da 1 a 128 pg (1,2,4,8,16,32,64,128 pg). Questi sono stati poi diluiti con 100 μ l di Buffer RIA e vortexati accuratamente. Da queste soluzioni, sono stati prelevati 500 μ l e diluiti con eguale volume di Buffer in tubi

di polistirene, ottenendo così una serie di soluzioni con concentrazioni da 1 a 128 pg/tubo, permettendo la costruzione della curva di taratura. Successivamente, si è proceduto alla preparazione dell'anticorpo primario anti-peptide di coniglio, diluendo tale composto liofilizzato con 13 ml di buffer RIA.

Nei nostri campioni e nei campioni standard dell'ossitocina, sono stati posti 100µl della soluzione contenente l'anticorpo; 100µl di questa soluzione e 100 µl di peptide standard, sono stati posti in due tubi per la preparazione del legame totale (TB1&2).

Dopo l'aggiunta dell'anticorpo, ogni soluzione è stata accuratamente vortexata e successivamente posta a incubare per 24h.

Trascorso il periodo di incubazione, è stata preparata la soluzione contenente il composto radiomarcato ^{125}I -ossitocina, diluendo questo con 13ml di Buffer RIA e vortexandolo; 100µl della soluzione ottenuta (avente una radioattività di 22000cpm) sono stati aggiunti ai nostri campioni a concentrazione ignota e nei campioni standard, il tutto è stato vortexato.

Oltre a queste soluzioni, 100µl del composto radiomarcato sono stati aggiunti anche ai tubi del legame totale (TB1&TB2); 100µl di ^{125}I -peptide sono stati posti anche in due tubi per la preparazione dei campioni di conta totale (TC-1&2); sempre 100µl del peptide

marcato, sono stati posti in due tubi e diluiti con 200 μ l di buffer RIA, al fine di ottenere la misura del legame aspecifico, detto bianco, (NSB1&2). Tutte le soluzioni, preparate come descritto, sono state poste a incubare per 24h.

Al termine del tempo di incubazione, sono state preparate le due soluzioni “Goat Anti-Rabbit IgG Serum” (Gar) e “Normal Rabbit Serum”, entrambe ricostituite con 13 ml di Buffer RIA ed opportunamente vortexate.

In tutti i tubi finora preparati (campioni in esame, campioni standard, NSB1&2, TB1&2), ad eccezione di quelli per la conta totale (TC1&2), sono stati aggiunti 100 μ l di queste due soluzioni; il tutto è stato vortexato e posto a incubare per 90 minuti a temperatura ambiente.

Passato questo tempo, in tutte le soluzioni, ad eccezione di quelle per la conta totale (TC1&2), sono stati aggiunti 500 μ l di Buffer RIA ed seguitamente vortexate.

Tutti i tubi, ad eccezione di quelli per la conta totale, sono stati centrifugati a 17000 \times g per 20 minuti a 4°C. Da tale operazione, per ogni campione, si è ottenuto un pellet, da cui è stato immediatamente e delicatamente aspirato il sopranatante.

La radioattività in cpm, presente in ogni pellet, è stata rilevata mediante l'impiego di un γ -contatore (Wizard, Perkin Elmer, Milan, Italy). Come già accennato, tutti i campioni sono stati saggiati in doppio.

La curva di taratura e la concentrazione dei campioni ignoti (Fig. 8) sono stati determinati mediante l'uso di programma informatico Graphpad Prism3.

3.3.9

Analisi Statistiche

La correlazione tra i parametri del questionario ECR, quali "ansia", "evitamento", stili di attaccamento, durata, presenza o assenza di una relazione romantica, caratteristiche demografiche dei soggetti e i livelli plasmatici di ossitocina, è stata misurata tramite l'uso del *coefficiente di correlazione di Pearson*.

Il confronto dei livelli plasmatici di ossitocina tra soggetti di sesso diverso e senza relazione affettiva è stato effettuato usando il *t-test di Student*.

Tutte queste analisi sono state effettuate per dati non appaiati con l'uso del programma SPSS, versione 12.01 (2003).

3.4

Risultati

I livelli plasmatici di ossitocina erano compresi in un intervallo tra 0.13 e 4.59 pg/ml (media \pm D.S.: 1.53 \pm 1.18).

Non sono state individuate differenze significative tra i due sessi (Fig. 11) e nemmeno tra i soggetti con una relazione in corso e i single.

I livelli di ossitocina non erano correlati all'età, al sesso o alla durata della relazione affettiva.

E' stata osservata una correlazione significativa e positiva tra la scala "ansietà" dell'ECR ed i livelli di ossitocina ($r = 0.30$, $p = 0.045$) (Fig.9), ma non con la scala "evitamento" ($r = 0.12$, $p = 0.42$).

La correlazione tra "ansia" e "evitamento" delle scale ECR era 0.47 ($p = 0.001$).

Per quanto riguarda gli stili di attaccamento, 26 (57.8 %) soggetti mostravano un attaccamento "sicuro", 12 (26.7 %) "preoccupato", 5 (11.1 %) "timoroso/evitante" e 2 (4.4 %) "distanziante", una distribuzione del tutto nella norma.

E' stata osservata anche una tendenza a più alte concentrazioni di ossitocina nei soggetti che mostravano uno stile di attaccamento

“preoccupato”, che però non ha raggiunto la significatività statistica (Fig. 10).

3.4.1

Curva di Taratura Standard

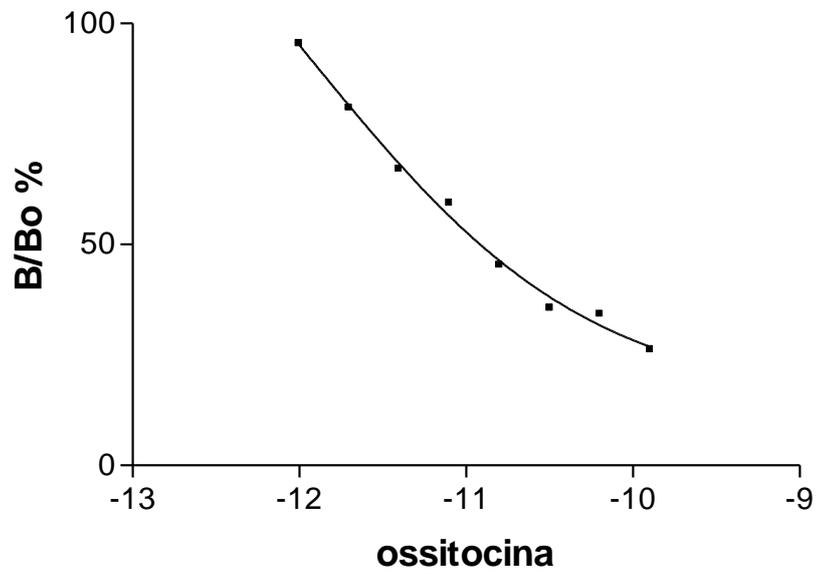
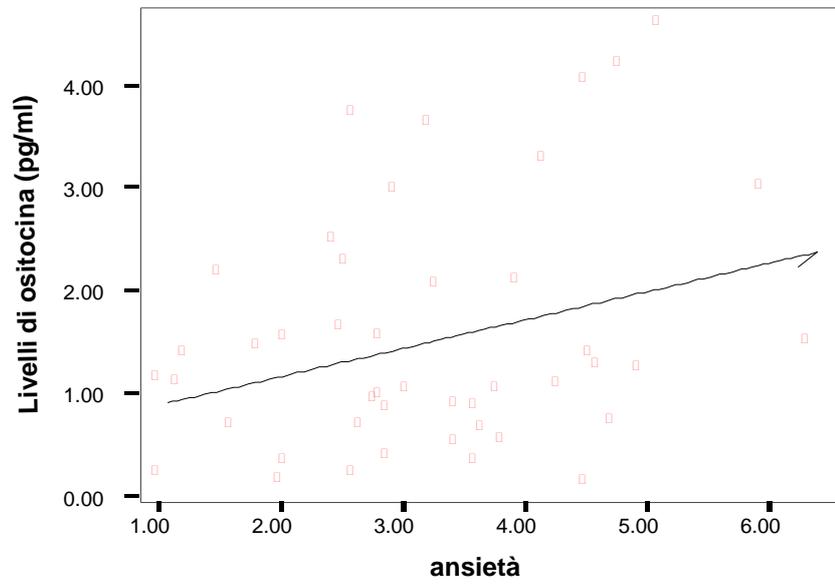


Figura 8. Retta di taratura dell'ossitocina.

3.4.2



$$r = 0.30 \quad p = 0.045$$

Figura 9. Correlazione tra livelli plasmatici di ossitocina e scala “ansietà” dell’ECR.

3.4.3

Distribuzione degli stili di attaccamento

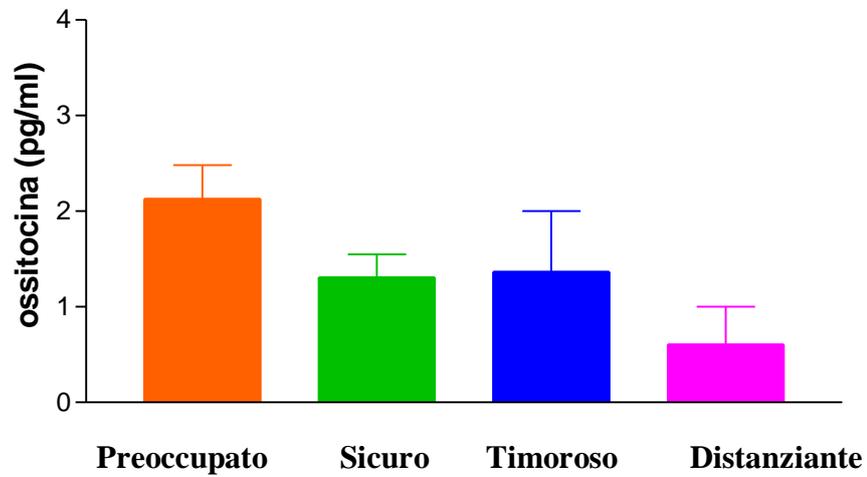


Figura 10. Distribuzione dei quattro stili di attaccamento romantico dell'ECR e livelli plasmatici di ossitocina.

3.4.4

Grafico confronto maschi-femmine

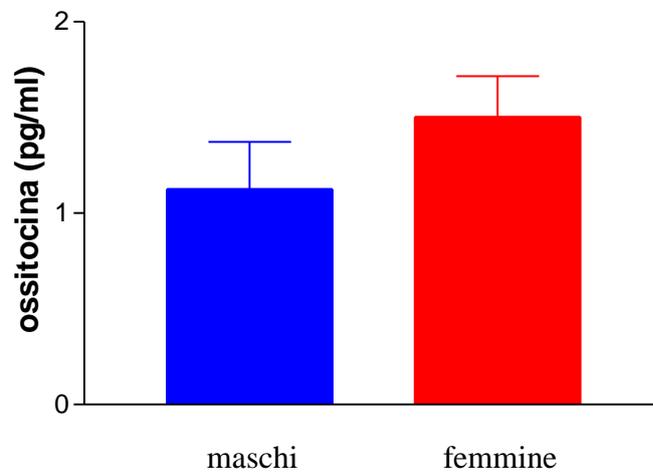


Figura 11. Livelli plasmatici di ossitocina nei soggetti di sesso maschile e femminile.

3.5

Discussione

I risultati di questo studio hanno evidenziato la presenza di una correlazione statisticamente significativa e positiva, tra i livelli plasmatici di ossitocina e la scala “ansietà” del questionario ECR, strumento specifico per valutare alcune caratteristiche dell’attaccamento romantico. Al contrario, non è stata trovata alcuna correlazione tra il grado di “evitante” e i livelli plasmatici dell’ormone.

Un’ulteriore conferma dell’esistenza di una relazione tra l’ossitocina e la scala “ansietà” è derivata dall’osservazione dei soggetti caratterizzati da uno stile di attaccamento “preoccupato”: questi presentavano infatti una tendenza verso più alti livelli di ossitocina plasmatici, rispetto ai soggetti con altri stili di attaccamento. Probabilmente, questa tendenza non raggiunge livelli statisticamente significativi a causa della piccola dimensione del campione.

Bisogna sottolineare che ci sono ancora controversie riguardo alla corrispondenza tra le concentrazioni plasmatiche e quelle centrali di ossitocina, pertanto i nostri dati vanno interpretati con una certa cautela. Tuttavia è stato appurato che in particolari

condizioni fisiologiche, quali parto, allattamento, attività sessuale, avviene un rilascio parallelo del peptide sia centrale che periferico, così come è stato osservato che tali stati emozionali sono in grado di modificare l'ossitocina plasmatica (Kendrich et al., 1986-1992; Uvnas-Moberg et al., 1990, 1993; Turner et al., 1999).

I nostri risultati sono considerati in linea con quelli di ricerche precedenti, effettuate per la maggior parte su animali, che hanno suggerito un possibile coinvolgimento dell'ossitocina nei legami sociali (Bielsky & Young, 2004; Storm et al., 2005). Indubbiamente, però, il nostro studio mostra per la prima volta l'esistenza di un legame tra attaccamento romantico e ossitocina. Sembra esistere dunque una correlazione tra i livelli di ossitocina e l'ansia che può caratterizzare questa tipologia di attaccamento. Attualmente non è possibile affermare se le concentrazioni di ossitocina siano una causa o una conseguenza del grado di ansia rilevato. In ogni caso, in accordo con la maggior parte dei dati degli studi precedenti, è possibile avanzare l'ipotesi che la relazione positiva tra i livelli di ossitocina e l'ansia possa essere interpretata come un meccanismo compensatorio per favorire l'attaccamento verso un individuo estraneo, in questo caso il

partner. Pertanto l'ossitocina, ritenuta in grado di ridurre le risposte allo stress (Carter, 1992), agirebbe mantenendo l'ansia a livelli accettabili, anzi trasformerebbe l'ansia in un'emozione piacevole. L'ossitocina e l'ansia, perciò, possono essere implicate in vario modo nella modulazione dei legami sociali. Livelli di stress moderati sembrano infatti promuovere la formazione di relazioni di coppia nelle varie specie, compreso l'uomo (Simpson & Rholes, 1994). In accordo con la stessa linea di pensiero, le relazioni romantiche, e forse i legami sociali in generale, possono essere interpretati come situazioni stressanti (Gillath et al., 2005). L'ossitocina, modulando l'ansia e promuovendo l'accettazione da parte del partner del rischio implicito nei legami sociali, può essere considerata un elemento essenziale nell'assicurare la ricompensa ed i benefici della relazione romantica (Kosfeld et al., 2005; Bale et al., 2001; Uvans-Moberg, 1998).

Questa ipotesi di una relazione tra ossitocina, ansia ed attaccamento romantico è ulteriormente rafforzata dall'esistenza di alterazioni di questo ormone in numerose patologie psichiatriche, caratterizzate da disturbi d'ansia, da alterazioni nell'attaccamento, o da entrambi. Tra queste si possono

enumerare disturbi di panico, ansia da separazione, disturbo ossessivo-compulsivo, depressione, schizofrenia, autismo e sindrome di Prader-Willi. Grazie alla individuazione di una correlazione statisticamente significativa e positiva tra i livelli di ossitocina e l'ansia i dati del nostro studio e quelli di altri (Cochran et al., 2013) suggeriscono il possibile utilizzo di ossitocina e di suoi analoghi e antagonisti in numerose patologie neuropsichiatriche.

APPENDICE

“Experiences in Close Relationships” (ECR), versione italiana
(Picardi et al., 2002).

	Completamente falso	Abbastanza falso	Un po' falso	Né falso Né vero	Un po' vero	Abbastanza vero	Completamente Vero
1. Preferisco non mostrare al partner come mi sento dentro.	1	2	3	4	5	6	7
2. Ho paura di essere lasciato/a.	1	2	3	4	5	6	7
3. Mi sento molto a mio agio quando mi trovo in intimità con il partner.	1	2	3	4	5	6	7
4. Mi preoccupo molto per le mie relazioni sentimentali.	1	2	3	4	5	6	7
5. Non appena il mio partner inizia a diventare più intimo, mi rendo conto di allontanarmi.	1	2	3	4	5	6	7
6. Temo che il partner non tenga a me quanto io tengo a lui/lei.	1	2	3	4	5	6	7
7. Mi sento a disagio quando il partner vuole stabilire con me una profonda intimità.	1	2	3	4	5	6	7
8. Mi preoccupo molto di perdere il mio partner.	1	2	3	4	5	6	7
9. Ho difficoltà ad aprirmi con il partner.	1	2	3	4	5	6	7
10. Spesso desidero che i sentimenti del mio partner verso di me siano forti quanto i miei verso di lui/lei.	1	2	3	4	5	6	7
11. Vorrei raggiungere una maggiore intimità con il mio partner, ma mi tiro sempre indietro.	1	2	3	4	5	6	7

12. Spesso vorrei fondermi completamente con il partner, e ciò talvolta lo spaventa e lo fa allontanare.	1	2	3	4	5	6	7
13. Mi innervosisco quando il partner diventa troppo intimo.	1	2	3	4	5	6	7
14. Ho paura di restare solo/a.	1	2	3	4	5	6	7
15. Mi sento a mio agio nel condividere con il partner i miei più intimi pensieri e sentimenti.	1	2	3	4	5	6	7
16. A volte il mio desiderio di stabilire un rapporto molto stretto spaventa e fa allontanare le persone.	1	2	3	4	5	6	7
17. Cerco di evitare di raggiungere una eccessiva intimità con il partner.	1	2	3	4	5	6	7
18. Ho bisogno di molte rassicurazioni sul fatto di essere amato/a dal mio partner.	1	2	3	4	5	6	7
19. Trovo abbastanza facile entrare in intimità con il mio partner.	1	2	3	4	5	6	7
20. A volte ho l'impressione di forzare il partner a mostrare più sentimento e maggiore dedizione.	1	2	3	4	5	6	7
21. Trovo difficile affidarmi completamente al partner.	1	2	3	4	5	6	7
22. Non mi preoccupa spesso di essere lasciato/a.	1	2	3	4	5	6	7
23. Preferisco non entrare in eccessiva intimità con il partner.	1	2	3	4	5	6	7
24. Se non riesco ad ottenere che il partner mi dimostri interesse, ne sono turbato/a o mi arrabbio.	1	2	3	4	5	6	7

25. Al mio partner dico quasi tutto.	1	2	3	4	5	6	7
26. Trovo che il mio partner non voglia stabilire con me quell'intimità che desidererei raggiungere.	1	2	3	4	5	6	7
27. Di solito parlo con il mio partner dei miei problemi e delle mie preoccupazioni.	1	2	3	4	5	6	7
28. Quando non ho una relazione sentimentale, mi sento piuttosto ansioso/a e insicuro/a.	1	2	3	4	5	6	7
29. Mi sento a mio agio ad affidarmi al partner.	1	2	3	4	5	6	7
30. Mi sento frustrato/a quando il mio partner non è presente quanto io vorrei.	1	2	3	4	5	6	7
31. Non mi crea problemi chiedere conforto, consiglio o aiuto al partner.	1	2	3	4	5	6	7
32. Mi sento frustrato/a se il partner non è disponibile quando ho bisogno di lui/lei.	1	2	3	4	5	6	7
33. Mi è di aiuto rivolgermi al mio partner nei momenti di bisogno.	1	2	3	4	5	6	7
34. Quando il partner mi critica, mi sento molto a disagio.	1	2	3	4	5	6	7
35. Mi rivolgo al mio partner per molte cose, inclusi conforto e rassicurazione.	1	2	3	4	5	6	7
36. Me la prendo quando il mio partner passa del tempo lontano da me.	1	2	3	4	5	6	7

BIBLIOGRAFIA

Adolphs R. The neurobiology of social cognition. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; **11**(2): 231-9.

Ainsworth MDS (1978). *Patterns of attachment: a psychological study of the Strange Situation.* ed. Erlbaum Assoc., Hillsdale.

Altemus M, Roca C, Galliven E, Romanos C, Deuster P. Increased vasopressin and adrenocorticotropin responses to stress in the midluteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; **86**(6): 2525-30.

Amico JA, Tenicela R, Johnston J, Robinson AG. A time-dependent peak of oxytocin exists in cerebrospinal fluid but not in plasma of humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983; **57**(5): 947-51.

Anderson-Hunt M, Dennerstein L. Increased female sexual response after oxytocin. *Bmj.* 1994; **309**(6959): 929.

Anderson-Hunt M, Dennerstein L. Oxytocin and female sexuality. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; **40**(4): 217-21.

Bale TL, Davis AM, Auger AP, Dorsa DM, McCarthy MM: CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *J Neuosci* 2001, **21**:2546-2552.

Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol.* 1998; **156**(2): 223-9.

Barberis C, Tribollet E. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 1996; **10**(1): 119-54.

Bartels A, Zeki S. The neural basis of romantic love. *Neuroreport.* 2000; **11**(17): 3829-34.

Bartels A, Zeki S. The neural correlates of maternal and romantic love. *Neuroimage.* 2004; **21**(3): 1155-66.

Bielsky IF, Young LJ. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides.* 2004; **25**(9): 1565-74.

Blaicher W, Gruber D, Bieglmayer C, Blaicher AM, Knogler W, Huber JC. The role of oxytocin in relation to female sexual arousal. *Gynecol Obstet Invest.* 1999; **47**(2): 125-6.

Blaicher W, Gruber D, Bieglmayer C, Blaicher AM, Knogler W, Huber JC. The role of oxytocin in relation to female sexual arousal. *Gynecol Obstet Invest.* 1999; **47**(2): 125-6.

Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J.* 1999; **18**(7): 1723-9.

Bodnar RJ, Nilaver G, Wallace MM, Badillo-Martinez D, Zimmerman EA. Pain threshold changes in rats following central injection of beta-endorphin, met-enkephalin, vasopressin or oxytocin antisera. *Int J Neurosci.* 1984; **24**(2): 149-60.

Bowlby J (1973). *Attachment and loss. II: Anxiety and Anger.* ed. Hogarth Press, London.

Brennan KA, Clark CL, Shaver PR. (1998). Self-report measurement of adult attachment: An integrative overview. In *Attachment theory and close relationships* (pp. 46–76). ed. Guilford, New York.

Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science.* 1980; **207**(4429): 373-8.

Brussaard AB, Kits KS, de Vlieger TA. Postsynaptic mechanism of depression of GABAergic synapses by oxytocin in the supraoptic nucleus of immature rat. *J Physiol.* 1996; **497** (Pt 2): 495-507.

Buijs RM, De Vries GJ, Van Leeuwen FW, Swaab DF. Vasopressin and oxytocin: distribution and putative functions in the brain. *Prog Brain Res.* 1983; **60**: 115-22.

Buijs RM, Swaab DF. Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat. *Cell Tissue Res.* 1979; **204**(3): 355-65.

Burbach JP, Adan RA. The rat oxytocin gene. Physiological changes in expression in the hypothalamo-neurohypophysial system and responsiveness of promoter activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; **689**: 34-49.

Caffe AR, van Leeuwen FW, Buijs RM, de Vries GJ, Geffard M. Coexistence of vasopressin, neurophysin and noradrenaline immunoreactivity in medium-sized cells of the locus coeruleus and subcoeruleus in the rat. *Brain Res.* 1985; **338**(1): 160-4.

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

Carmichael MS, Warburton VL, Dixen J, Davidson JM. Relationships among cardiovascular, muscular, and oxytocin responses during human sexual activity. *Arch Sex Behav.* 1994; **23**(1): 59-79.

Carter CS. Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology*. 1998; **23**(8): 779-818.

Carter CS. Oxytocin and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992; **16**(2): 131-44.

Cassano GB, Michelini S, Shear MK, Coli E, Maser JD, Frank E. The panic-agoraphobic spectrum: a descriptive approach to the assessment and treatment of subtle symptoms. *Am J Psychiatry*. 1997; **154**(6 Suppl): 27-38.

Changeux JP (1985). *L'homme neuronal*. ed. Fayard, Paris.

Chen D, Haviland-Jones J. Rapid mood change and human odors. *Physiol Behav*. 1999; **68**(1-2): 241-50.

Clamagirand C, Camier M, Boussetta H, Fahy C, Morel A, Nicolas P, et al. An endopeptidase associated with bovine neurohypophysis secretory granules cleaves pro-oxytocin/neurophysin peptide at paired basic residues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; **134**(3): 1190-6.

Cochran D, Hill M, Frazier JA. The role of oxytocin in psychiatric disorders: A review of biological and therapeutic research findings. *Harv Rev Psychiatry*. 2013; **21**(5): 219-47.

Copland JA, Zlatnik MG, Ives KL, Soloff MS. Oxytocin receptor regulation and action in a human granulosa-lutein cell line. *Biol Reprod*. 2002; **66**(5): 1230-6.

Da Costa AP, Broad KD, Kendrick KM. Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in c-fos and zif/268 mRNA expression in the sheep brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997; **46**(1-2): 63-76.

Damasio A. Feelings of emotion and the self. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; **1001**: 253-61.

Douglas AJ, Russell JA. Endogenous opioid regulation of oxytocin and ACTH secretion during pregnancy and parturition. *Prog Brain Res*. 2001; **133**: 67-82.

Du Vigneaud V, Ressler C, Swan CJM, Roberts CW, Katsoyannis PG, Gordon S. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75** (19): 4879-4880.

Eipper BA, Milgram SL, Husten EJ, Yun HY, Mains RE. Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. *Protein Sci*. 1993; **2**(4): 489-97.

Engelmann M, Bull PM, Brown CH, Landgraf R, Horn TF, Singewald N, et al. GABA selectively controls the secretory activity of oxytocin neurons in the rat supraoptic nucleus. *Eur J Neurosci.* 2004; **19**(3): 601-8.

Esch T, Stefano GB. The Neurobiology of Love. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005; **26**(3): 175-92.

Eubanks S, Lu M, Peyton D, Breslow E. Expression, folding, and thermodynamic properties of the bovine oxytocin-neurophysin precursor: relationships to the intermolecular oxytocin-neurophysin complex. *Biochemistry.* 1999; **38**(41): 13530-41.

Evans JJ, Reid RA, Wakeman SA, Croft LB, Benny PS. Evidence that oxytocin is a physiological component of LH regulation in non-pregnant women. *Hum Reprod.* 2003; **18**(7): 1428-31.

Favaretto AL, Ballejo GO, Albuquerque-Araujo WI, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides.* 1997; **18**(9): 1377-81.

Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci.* 2001; **21**(20): 8278-85

Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet.* 2000; **25**(3): 284-8.

Fisher HE (1992). *Anatomy of Love: The Natural History of Monogamy, Adultery, and Divorce.* ed. Norton, New York.

Flanagan LM, Olson BR, Sved AF, Verbalis JG, Stricker EM. Gastric motility in conscious rats given oxytocin and an oxytocin antagonist centrally. *Brain Res.* 1992; **578**(1-2): 256-60.

Fliers E, Guldenaar SE, van de Wal N, Swaab DF. Extrahypothalamic vasopressin and oxytocin in the human brain; presence of vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* 1986; **375**(2): 363-7.

Forward S, Craig B (1991). *Obsessive love: When passion holds you prisoner.* ed. Bantam Books, New York.

Franchini LF, Vivas L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. *Am J Physiol.* 1999; **276**(4 Pt 2): 1180-7.

Frayne J, Townsend D, Nicholson HD. Effects of oxytocin on sperm transport in the pubertal rat. *J Reprod Fertil.* 1996; **107**(2): 299-306.

- Fricker LD, Evans CJ, Esch FS, Herbert E. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine carboxypeptidase E. *Nature*. 1986; **323**(6087): 461-4.
- Furuya K, Mizumoto Y, Makimura N, Mitsui C, Murakami M, Tokuoka S, et al. Gene expressions of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus cells of human ovary. *Horm Res*. 1995; **44 Suppl 2**: 47-9.
- George C, Kaplan N, Main M (1985). *An Adult Attachment Interview: Interview Protocol*. Unpublished manual. Department of Psychology, University of California, Berkeley.
- Gillath O, Bunge SA, Shaver PR, Wendelken C, Mikulincer M. Attachment-style differences in the ability to suppress negative thoughts exploring the neural correlates. *Neuroimage*. 2005, **28**(4):835-47.
- Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001; **81**(2): 629-83.
- Green L, Fein D, Modahl C, Feinstein C, Waterhouse L, Morris M. Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms. *Biol Psychiatry*. 2001; **50**(8): 609-13.
- Griffin-Shelley E (1991). *Sex and love: Addiction, treatment and recovery*. ed. Praeger, Westport.
- Guldenaar SE, Nicholson HD, McCabe JT. A novel, [tyrosyl-3,5-3H]oxytocin binding, uterine cell population in the rat. *Anat Rec*. 1992; **233**(4): 538-42.
- Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; **94**(21): 11704-9.
- Guzzi F, Zanchetta D, Cassoni P, Guzzi V, Francolini M, Parenti M, et al. Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene*. 2002; **21**(11): 1658-67.
- Hara Y, Battey J, Gainer H. Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Brain Res Mol Brain Res*. 1990; **8**(4): 319-24.
- Harlow HF. Learning. *Annu Rev Psychol*. 1952; **3**: 29-54.
- Hazan C, Shaver P. Romantic love conceptualized as an attachment process. *J Pers Soc Psychol*. 1987; **52**(3): 511-24.
- Hinde RA (1970). *Animal behavior: A synthesis of ethology and comparative psychology*. ed. McGraw Hill, New York.

- Hollander E (1993). *Obsessive–compulsive-related disorders*. ed. American Psychiatric Press, Washington DC.
- Hollander E, Novotny S, Hanratty M, Yaffe R, DeCaria CM, Aronowitz BR, et al. Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2003; **28**(1): 193-8.
- Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikuchi T, et al. Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem*. 1994; **269**(51): 32451-6.
- Insel TR. A neurobiological basis of social attachment. *Am J Psychiatry*. 1997; **154**(6): 726-35.
- Insel TR. Is social attachment an addictive disorder? *Physiol Behav*. 2003; **79**(3): 351-7.
- Insel TR, Young LJ. The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci*. 2001; **2**(2): 129-36.
- Ivell R, Richter D. Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; **81**(7): 2006-10.
- Ivell R, Richter D. The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. *Embo J*. 1984; **3**(10): 2351-4.
- Jacob S, Garcia S, Hayreh D, McClintock MK. Psychological effects of musky compounds: comparison of androstadienone with androstenol and muscone. *Horm Behav*. 2002; **42**(3): 274-83.
- Jankowiak WR, Fischer EF. A cross-cultural perspective on romantic love. *Ethnology*. 1992: 149-55.
- Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, et al. Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; **101**(35): 13074-9.
- Jenike MA (1990). Illnesses related to obsessive–compulsive disorder. In *Obsessive–compulsive disorders: Theory and management* (pp. 39–60). ed. Year Book Medical, Chicago.
- Jenkin L, Nicholson HD. Evidence for the regulation of prostatic oxytocin by gonadal steroids in the rat. *J Androl*. 1999; **20**(1): 80-7.
- Kane JM. Treatment of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1987; **13**(1): 133-56.

- Kendrick KM, Keverne EB, Baldwin BA. Intracerebroventricular oxytocin stimulates maternal behaviour in the sheep. *Neuroendocrinology*. 1987; **46**(1): 56-61.
- Keverne EB. Pheromones, vomeronasal function, and gender-specific behavior. *Cell*. 2002; **108**(6): 735-8.
- Keverne EB, Curley JP. Vasopressin, oxytocin and social behaviour. *Curr Opin Neurobiol*. 2004; **14**(6): 777-83.
- Kimura T, Ivell R. The oxytocin receptor. *Results Probl Cell Differ*. 1999; **26**: 135-68.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature*. 1992; **356**(6369): 526-9.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature*. 1992; **356**(6369): 526-9.
- Kirsch P, Esslinger C, Chen Q, Mier D, Lis S, Siddhanti S, et al. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J Neurosci*. 2005; **25**(49): 11489-93.
- Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005; **435**(7042): 673-6.
- Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005; **435**(7042): 673-6.
- Kozlowski GP. Hormone pathways in cerebrospinal fluid. *Neurol Clin*. 1986; **4**(4): 907-17.
- Land H, Grez M, Ruppert S, Schmale H, Rehbein M, Richter D, et al. Deduced amino acid sequence from the bovine oxytocin-neurophysin I precursor cDNA. *Nature*. 1983; **302**(5906): 342-4.
- Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol*. 2004; **25**(3-4): 150-76.
- Leckman JF, Mayes LC, Feldman R, Evans DW, King RA, Cohen DJ. Early parental preoccupations and behaviors and their possible relationship to the symptoms of obsessive-compulsive disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1999; **396**: 1-26.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci*. 1988; **8**(7): 2517-29.

- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000; **23**: 155-84.
- Legros JJ, Chiodera P, Geenen V. Inhibitory action of exogenous oxytocin on plasma cortisol in normal human subjects: evidence of action at the adrenal level. *Neuroendocrinology.* 1988; **48**(2): 204-6.
- Lesch KP, Mossner R. Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry.* 1998; **44**(3): 179-92.
- Liebowitz MR. (1983). *The chemistry of love.* ed. Little Brown, Boston. Trad. it: *La Chimica dell'amore.* (2001). ed. Rizzoli, Milano. 1984
- Lim MM, Murphy AZ, Young LJ. Ventral striatopallidal oxytocin and vasopressin V1a receptors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *J Comp Neurol.* 2004; **468**(4): 555-70.
- Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ. Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res.* 1991; **555**(2): 220-32.
- Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ. Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res.* 1991; **555**(2): 220-32.
- Ludwig M, Leng G. Intrahypothalamic vasopressin release. An inhibitor of systemic vasopressin secretion? *Adv Exp Med Biol.* 1998; **449**: 163-73.
- Mack SO, Kc P, Wu M, Coleman BR, Tolentino-Silva FP, Haxhiu MA. Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *J Appl Physiol (1985).* 2002; **92**(2): 826-34.
- Main M, Goldwyn R (1985). *Adult Attachment Scoring and Classification System.* Unpublished scoring manual. Department of Psychology, University of California, Berkley.
- Main M, Goldwyn R (1989). *Adult attachment rating and classification system.* Unpublished manual. Department of Psychology, University of California, Berkley.
- Main M, Hesse E (1990). Parents' unresolved traumatic experiences are related to infant disorganized attachment status: Is frightened and/or frightening parental behavior the linking mechanism?. In *Attachment in the preschool years. Theory, research and intervention* (pp.161-184). ed. University of Chicago Press, Chicago.

Main M, Solomon J (1990). Procedures for identifying infants as disorganized/disoriented during the Ainsworth Strange Situation. In *Attachment in the preschool years. Theory, research and intervention* (pp.121-160). ed. University of Chicago Press, Chicago.

Main M, Weston DR. The quality of the toddler's relationship's to mother and father: related to conflict behaviour and readiness to establish new relationships. *Child Development* 1981; **52**: 932-40.

Mains RE, Eipper BA. Phosphorylation of rat and human adrenocorticotropin-related peptides: physiological regulation and studies of secretion. *Endocrinology*. 1983; **112**(6): 1986-95.

Marazziti D (2002). *La natura dell'amore*. ed. Rizzoli, Milano.

Marazziti D, Abelli M, Baroni S, Carpita B, Ramacciotti CE, Dell'osso L. Neurobiological correlates of social anxiety disorder: an update. *CNS Spectr*. 2014: 1-12.

Marazziti D, Akiskal HS, Rossi A, Cassano GB. Alteration of the platelet serotonin transporter in romantic love. *Psychol Med*. 1999; **29**(3): 741-5.

Marazziti D, Canale D. Hormonal changes when falling in love. *Psychoneuroendocrinology*. 2004; **29**(7): 931-6.

Marazziti D, Cassano GB. The neurobiology of attraction. *J Endocrinol Invest*. 2003; **26**(3 Suppl): 58-60.

Marazziti D, Dell'Osso B, Baroni S, Mungai F, Catena M, Rucci P, et al. A relationship between oxytocin and anxiety of romantic attachment. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2006; **2**: 28.

Marazziti M, Roncaglia I, Piccinni A, Dell'Osso L. Neurobiological aspects of attachment. *Gior Ital Psicopat*. 2008; **14**: 58-71.

Martens H, Malgrange B, Robert F, Charlet C, De Groote D, Heymann D, et al. Cytokine production by human thymic epithelial cells: control by the immune recognition of the neurohypophysial self-antigen. *Regul Pept*. 1996; **67**(1): 39-45.

McCoy NL, Pitino L. Pheromonal influences on sociosexual behavior in young women. *Physiol Behav*. 2002; **75**(3): 367-75.

McNeilly AS, Robinson IC, Houston MJ, Howie PW. Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983; **286**(6361): 257-9.

- Michelini S, Urbanek M, Dean M, Goldman D. Polymorphism and genetic mapping of the human oxytocin receptor gene on chromosome 3. *Am J Med Genet.* 1995; **60**(3): 183-7.
- Modahl C, Green L, Fein D, Morris M, Waterhouse L, Feinstein C, et al. Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry.* 1998; **43**(4): 270-7.
- Moos F, Ingram CD, Wakerley JB, Guerne Y, Freund-Mercier MJ, Richard P. Oxytocin in the bed nucleus of the stria terminalis and lateral septum facilitates bursting of hypothalamic oxytocin neurons in suckled rats. *J Neuroendocrinol.* 1991; **3**(2): 163-71.
- Murphy CR, Dwarte DM. Increase in cholesterol in the apical plasma membrane of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. *Acta Anat (Basel).* 1987; **128**(1): 76-9.
- Murphy MR, Seckl JR, Burton S, Checkley SA, Lightman SL. Changes in oxytocin and vasopressin secretion during sexual activity in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987; **65**(4): 738-41.
- Nakagawa K, Shoji A, Hamada T, Asai Y. [Trichorrhexis nodosa--scanning electron microscopic study and X-ray microanalysis by Wet-SEM]. *Nihon Hifuka Gakkai Zasshi.* 1988; **98**(9): 891-7.
- Naylor AM, Ruwe WD, Veale WL. Thermoregulatory actions of centrally-administered vasopressin in the rat. *Neuropharmacology.* 1986; **25**(7): 787-94.
- Netter A. The agony of passion. *Revue Française de Psychanalyse.* 1989; **2**: 33-39.
- Nicholson HD, Jenkin L. Oxytocin and prostatic function. *Adv Exp Med Biol.* 1995; **395**: 529-38.
- Nishioka T, Anselmo-Franci JA, Li P, Callahan MF, Morris M. Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 1998; **781**(1-2): 57-61.
- O'Dwyer AM, Marks I. Obsessive-compulsive disorder and delusions revisited. *Br J Psychiatry.* 2000; **176**: 281-4.
- Okuda K, Uenoyama Y, Fujita Y, Iga K, Sakamoto K, Kimura T. Functional oxytocin receptors in bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 1997; **56**(3): 625-31.
- Page SR, Ang VT, Jackson R, White A, Nussey SS, Jenkins JS. The effect of oxytocin infusion on adenohipophyseal function in man. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1990; **32**(3): 307-13.

Paolisso G, Sgambato S, Passariello N, Torella R, Giugliano D, Mignano S, et al. Pharmacological doses of oxytocin affect plasma hormone levels modulating glucose homeostasis in normal man. *Horm Res.* 1988; **30**(1): 10-6.

Petersson M, Lundeberg T, Uvnas-Moberg K. Oxytocin decreases blood pressure in male but not in female spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst.* 1997; **66**(1-2): 15-8.

Picardi A, Vermigli P, Toni A, D'Amico R, Bitetti D, Pasquini P. Il questionario "Experiences in Close Relationships" (ECR) per la valutazione dell'attaccamento negli adulti: ampliamento delle evidenze di validità per la versione italiana. *Italian journal of psychopathology.* 2002; **8**(3): 282-294.

Pitman RK, Orr SP, Lasko NB. Effects of intranasal vasopressin and oxytocin on physiologic responding during personal combat imagery in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res.* 1993; **48**(2): 107-17.

Porges SW. Emotion: an evolutionary by-product of the neural regulation of the autonomic nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; **807**: 62-77.

Postina R, Kojro E, Fahrenholz F. Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *J Biol Chem.* 1996; **271**(49): 31593-601.

Prather MD, Lavenex P, Mauldin-Jourdain ML, Mason WA, Capitanio JP, Mendoza SP, et al. Increased social fear and decreased fear of objects in monkeys with neonatal amygdala lesions. *Neuroscience.* 2001; **106**(4): 653-8.

Quentin T, Debruyne D, Lelong-Boulouard V, Poisnel G, Barre L, Coquerel A. Clorazepate affects cell surface regulation of delta and kappa opioid receptors, thereby altering buprenorphine-induced adaptation in the rat brain. *Brain Res.* 2005; **1063**(1): 84-95.

Rao VV, Loffler C, Battey J, Hansmann I. The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1992; **61**(4): 271-3.

Rao VV, Loffler C, Battey J, Hansmann I. The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1992; **61**(4): 271-3.

Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ. Central effects of oxytocin. *Physiol Rev.* 1991; **71**(2): 331-70.

Richard S, Zingg HH. Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter. *J Biol Chem.* 1991; **266**(32): 21428-33.

- Richard S, Zingg HH. The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem*. 1990; **265**(11): 6098-103.
- Robinson G, Evans JJ. Oxytocin has a role in gonadotrophin regulation in rats. *J Endocrinol*. 1990; **125**(3): 425-32.
- Robinson G, Evans JJ. Oxytocin has a role in gonadotrophin regulation in rats. *J Endocrinol*. 1990; **125**(3): 425-32.
- Russell JA, Leng G. Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J Endocrinol*. 1998; **157**(3): 343-59.
- Russell JT, Brownstein MJ, Gainer H. Biosynthesis of vasopressin, oxytocin, and neurophysins: isolation and characterization of two common precursors (propressophysin and prooxyphysin). *Endocrinology*. 1980; **107**(6): 1880-91.
- Salonia A, Nappi RE, Pontillo M, Daverio R, Smeraldi A, Briganti A, et al. Menstrual cycle-related changes in plasma oxytocin are relevant to normal sexual function in healthy women. *Horm Behav*. 2005; **47**(2): 164-9.
- Sausville E, Carney D, Battey J. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J Biol Chem*. 1985; **260**(18): 10236-41.
- Sawchenko PE, Swanson LW. Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. *Fed Proc*. 1985; **44**(1 Pt 2): 221-7.
- Schmid B, Wong S, Mitchell BF. Transcriptional regulation of oxytocin receptor by interleukin-1beta and interleukin-6. *Endocrinology*. 2001; **142**(4): 1380-5.
- Simpson JA RW. Stress and secure base relationships in adulthood. *Advances in Personality Relationships*. 1994; **5**: 181-204.
- Simpson JA, Rholes WS (1998). *Attachment in adulthood*. In *Attachment theory and close relationships*. ed. Guilford Press, New York.
- Smeltzer MD, Curtis JT, Aragona BJ, Wang Z. Dopamine, oxytocin, and vasopressin receptor binding in the medial prefrontal cortex of monogamous and promiscuous voles. *Neurosci Lett*. 2006; **394**(2): 146-51.
- Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, Wetzstein R. Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. *Acta Histochem Suppl*. 1981; **24**: 79-95.

Sofroniew MV. Vasopressin- and neurophysin-immunoreactive neurons in the septal region, medial amygdala and locus coeruleus in colchicine-treated rats. *Neuroscience*. 1985; **15**(2): 347-58.

Stein DJ, Hollander E, Liebowitz MR. Neurobiology of impulsivity and the impulse control disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1993; **5**(1): 9-17.

Storm EE, Tecott LH. Social circuits: peptidergic regulation of mammalian social behavior. *Neuron*. 2005; **47**(4): 483-6.

Sukhov RR, Walker LC, Rance NE, Price DL, Young WS, 3rd. Vasopressin and oxytocin gene expression in the human hypothalamus. *J Comp Neurol*. 1993; **337**(2): 295-306.

Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol*. 1980; **194**(3): 555-70.

Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, Ross HE, Kawamata M, Onaka T, et al. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; **102**(44): 16096-101.

Turner RA, Altemus M, Enos T, Cooper B, McGuinness T. Preliminary research on plasma oxytocin in normal cycling women: investigating emotion and interpersonal distress. *Psychiatry*. 1999; **62**(2): 97-113.

Uvnas-Moberg K, Widstrom AM, Werner S, Matthiesen AS, Winberg J. Oxytocin and prolactin levels in breast-feeding women. Correlation with milk yield and duration of breast-feeding. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1990; **69**(4): 301-6.

Uvnas-Moberg K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology*. 1998; **23**(8): 819-35.

Van Kesteren RE, Smit AB, Dirks RW, de With ND, Geraerts WP, Joosse J. Evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: characterization of a cDNA encoding a vasopressin-related precursor, preproconopressin, from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; **89**(10): 4593-7.

Viero C, Shibuya I, Kitamura N, Verkhatsky A, Fujihara H, Katoh A, et al. REVIEW: Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther*. 2010; **16**(5): e138-56.

von Eggelkraut-Gottanka R, Beck-Sickinger AG. Biosynthesis of peptide hormones derived from precursor sequences. *Curr Med Chem*. 2004; **11**(20): 2651-65.

Weller A. Human pheromones. Communication through body odour. *Nature*. 1998; **392**(6672): 126-7.

Yang J. Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994; **19**(8): 867-71.

Young LJ, Lim MM, Gingrich B, Insel TR. Cellular mechanisms of social attachment. *Horm Behav*. 2001; **40**(2): 133-8.

Young LJ, Wang Z. The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci*. 2004; **7**(10): 1048-54.

Young LJ. The neurobiology of social recognition, approach, and avoidance. *Biol Psychiatry*. 2002; **51**(1): 18-26.

Zaninetti M, Raggenbass M. Oxytocin receptor agonists enhance inhibitory synaptic transmission in the rat hippocampus by activating interneurons in stratum pyramidale. *Eur J Neurosci*. 2000; **12**(11): 3975-84.

Zingg HH, Laporte SA. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2003; **14**(5): 222-7.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la Professoressa Dell’Osso, per avermi dato la possibilità di partecipare a questo progetto.

Un sincero e sentito grazie va alla Dottoressa Marazziti, per avermi guidato e consigliato nella stesura dell’elaborato.

Desidero ringraziare i miei compagni di università per l’amicizia mostrata, l’aiuto materiale ed il supporto psicologico durante questo lungo e tortuoso cammino insieme.

Passo a ringraziare tutti i miei amici, per avermi compresa ed incoraggiata in ogni circostanza.

Un ringraziamento molto caloroso va a Giacomo, colui che con amore mi ha spronato a non mollare mai durante questo percorso, ed ha sempre creduto nel mio successo di fronte ad ogni sfida.

Ringrazio, infine, per avermi fatto vivere questo viaggio nel modo più sereno possibile, la mia famiglia tutta, in particolare i miei genitori.

Un ultimo ringraziamento, ma non per importanza, va a nonno Iliano, per aver saputo vedere ciò che di unico è in me.

