



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN “SCIENZE MOTORIE” XXII Ciclo

Coordinatore: Prof. V. Perciavalle

Dott.ssa DANIELA BRONZI

***MODULAZIONE NORADRENERGICA
DELLA RESPONSIVITÀ DI NEURONI RUBRALI
AL GLUTAMMATO: RUOLO DEI RECETTORI α_2 E β***

TESI DI DOTTORATO

Tutor: Chiar.mo
Prof. Guido Li Volsi

Anno Accademico 2009-10

SOMMARIO

INTRODUZIONE	2
Strutture motorie del sistema nervoso centrale	2
Aspetti neurochimici del controllo motorio.....	4
Il Nucleo Rosso.....	6
Neurochimica del Nucleo Rosso.....	11
Il Sistema Noradrenergico	13
Noradrenalina e Nucleo Rosso	18
Il sistema Glutamatergico	19
Glutammato e Nucleo Rosso.....	22
 SCOPO DELLA RICERCA	 24
 MATERIALI E METODI	 25
Preparazione dell'animale	25
Registrazione extracellulare e microiontoforesi.....	26
Analisi dei dati	28
Perfusione ed Istologia	29
Immunistoichimica.....	30
 RISULTATI	 31
Effetti della NA sulle risposte al GLU in neuroni rubrali.....	31
Ruolo dei recettori α_2	35
Ruolo dei Recettori β	38
 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	 42
 BIBLIOGRAFIA	 46

INTRODUZIONE

Strutture motorie del sistema nervoso centrale

La corretta esecuzione di un atto motorio è resa possibile per il tramite di una rete neuronale di controllo costituita da strutture appartenenti a tre livelli del Sistema Nervoso Centrale (SNC): il midollo spinale, il tronco dell'encefalo e la corteccia cerebrale. Queste strutture sono organizzate in maniera gerarchica ma possono agire anche in parallelo cosicché ogni livello può, in una certa misura, controllare il movimento indipendente dagli altri due.

Il livello più basso di questa organizzazione è rappresentato dal midollo spinale, dove, i circuiti devoluti ai comportamenti riflessi automatici sono sottoposti al controllo esercitato da parte del tronco dell'encefalo e della corteccia motrice. I corpi cellulari dei motoneuroni che innervano i singoli muscoli, disposti in nuclei motori, che formano colonne longitudinali di cellule, presentano un'organizzazione spaziale caratterizzata da due importanti regole anatomo-funzionali: la disposizione prossimale-distale e quella flessore - estensore. In base alla disposizione prossimale-distale i motoneuroni che innervano i muscoli più prossimali sono relegati in posizione mediale rispetto a quelli che innervano i muscoli più distali, mentre, in base alla disposizione flessore - estensore, i motoneuroni che innervano i muscoli estensori occupano posizioni ventrali rispetto ai motoneuroni che innervano i muscoli flessori.

Il secondo livello dell'organizzazione motoria è rappresentato da strutture tronco encefaliche che danno origine a due gruppi di vie discendenti, le mediali e le laterali, dirette verso la sostanza grigia del midollo spinale.

Le vie mediali terminano nella parte ventromediale della sostanza grigia spinale e, poiché si connettono, direttamente o mediante interneuroni, con i motoneuroni che innervano i muscoli assiali e prossimali, controllano soprattutto il mantenimento e la correzione della postura. Queste vie sono costituite da tre componenti principali: i tratti vestibolo-spinali mediale e laterale, i tratti reticolo-spinali mediale e laterale e il

tratto tetto-spinale. I primi, che prendono origine dai nuclei vestibolari, ritrasmettono le informazioni rielaborate provenienti dal labirinto vestibolare relative alla posizione e alle condizioni di moto della testa rispetto all'accelerazione di gravità. I tratti reticolo-spinali mediali e laterali derivano da diversi nuclei situati nella formazione laterale del ponte e del bulbo, stabiliscono connessioni sia eccitatorie sia inibitorie con interneuroni e motoneuroni spinali e sono a loro volta controllati da fibre nervose provenienti dalla corteccia motoria e premotoria. Infine, il tratto tetto-spinale, che prende origine dal collicolo superiore del mesencefalo, è l'unica tra le vie mediali che proietta al lato controlaterale del midollo spinale, ma le sue fibre si fermano a livello dei segmenti cervicali.

Le vie discendenti laterali dal tronco dell'encefalo decorrono nel quadrante laterale del midollo spinale e terminano in corrispondenza della zona intermedia e dei gruppi motoneuronali dorsolaterali. Le vie laterali controllano i muscoli prossimali e distali in relazione all'esecuzione di movimenti fini, consistenti nell'afferrare e manipolare oggetti. La principale via discendente laterale è il tratto rubro-spinale, che si origina dalla porzione magno cellulare del nucleo rosso del mesencefalo e, dopo aver attraversato il bulbo, decorre nella parte dorsale delle colonne laterali del midollo spinale. Dal tronco dell'encefalo si dipartono infine anche vie aminergiche che presentano terminazioni diffuse a tutti i livelli del midollo spinale e, in particolare, anche nelle corna ventrali.

Il livello più elevato di controllo motorio è rappresentato dalla corteccia motoria da cui prendono origine fibre cortico-bulbari che controllano i nuclei dei nervi cranici (quindi i muscoli della faccia) e fibre cortico-spinali che controllano i motoneuroni spinali agendo direttamente sui motoneuroni o sugli interneuroni. Il tratto cortico-spinale è un cospicuo fascio di fibre costituito da circa un milione di unità, due terzi delle quali provenienti dalla corteccia motrice primaria (area 4 di Brodman situata nel giro precentrale del lobo frontale) e dalle aree premotorie (area 6 situata nel lobo frontale rostralmente all'area 4); il rimanente terzo proveniente dalla corteccia somatosensitiva del lobo parietale (aree 1, 2, 3) svolge funzioni inerenti l'analisi e la modulazione delle informazioni sensoriali afferenti alle strutture sensoriali

sottocorticali. Questa via controlla il movimento volontario con particolare riguardo ai movimenti fini che coinvolgono i muscoli distali.

Oltre alle tre componenti già citate anche altre due formazioni cerebrali contribuiscono all'elaborazione e al perfezionamento dei programmi motori: I nuclei della base e il cervelletto.

I nuclei della base rielaborano informazioni di origine esclusivamente corticale e proiettano principalmente su aree della corteccia frontale implicate nella pianificazione del movimento.

Il cervelletto definisce invece il grado di precisione del movimento eseguendo un continuo confronto tra comandi motori discendenti e informazioni sensoriali, provenienti dalla periferia muscolare, articolare e cutanea, relative all'azione motoria realmente eseguita. Le fibre in uscita dal cervelletto svolgono la loro funzione agendo sul tronco dell'encefalo e sulle corticali motorie che influenzano direttamente o indirettamente il midollo spinale (Kandel et al. 2003).

Aspetti neurochimici del controllo motorio

La trasmissione di impulsi nervosi, effettuata attraverso sinapsi e giunzioni neuro effettrici avviene nella maggioranza dei casi mediante specifici agenti chimici, detti neuro umorali o più semplicemente neurotrasmettitori. Tuttavia nel SNC operano anche meccanismi di trasmissione non classici. Alcune sostanze, quali le monoamine e vari peptidi, possono esercitare un'azione di condizionamento, cioè potenziare o ridurre la risposta del neurone bersaglio a trasmettitori classici, eccitatori o inibitori, provocando invece una variazione più modesta del potenziale di membrana o della conduttanza ionica quando applicate da sole. Tali risposte vengono dette "risposte modulatorie" e "neuromodulatori" le sostanze che presentano tali caratteristiche.

I neurotrasmettitori e neuromodulatori impiegati dalle vie motorie sono molto numerosi e presumibilmente non tutti sono stati ancora perfettamente identificati. Tra i neurotrasmettitori classici è accertato un forte coinvolgimento di acetilcolina, glutammato, aspartato, acido gamma-aminobutirrico (GABA) e glicina, mentre tra i neuromodulatori sono da citare soprattutto alcune monoamine quali la serotonina e le

catecolamine oltre che alcuni peptidi (Kandel et al. 2003). A questo riguardo, in strutture nervose sottocorticali che partecipano al controllo motorio, è stata osservata un'azione neuromodulatoria di amine biologiche, quali la serotonina e la noradrenalina sull'azione di neurotrasmettitori come il glutammato e il GABA (Ciranna et al.2000, Licata et al. 1998, Licata et al. 2001, Barresi et al. 2009, Di Mauro et al. 2008, Li Volsi et al. 2001).

Nel presente lavoro è stato studiato un particolare aspetto del controllo motorio inerente l'azione della noradrenalina sulla responsività al neurotrasmettitore eccitatorio per eccellenza, il glutammato, dei neuroni appartenenti al nucleo rosso. Questa struttura è inserita, tramite vie afferenti ed efferenti, in un circuito motorio e quindi coinvolta nel corretto svolgimento del movimento.

Il Nucleo Rosso

Il nucleo rosso (NR) è un centro di integrazione motoria, implicato nel controllo dei movimenti degli arti, collocato nel mesencefalo rostrale al di sotto dell'acquedotto del Silvio e confina lateralmente con la formazione reticolare e ventralmente con la sostanza nera.

Il suo nome si riferisce al colore rosato che assume dopo colorazione per la presenza di un pigmento ricco in ferro, e che lo fa assomigliare molto alla zona rossa della sostanza nera (Brodal 1981, Ten Donkelaar 1988).

Nel NR si può distinguere caudalmente una regione magnocellulare (RMC), dove si identificano neuroni di grosse dimensioni, ed una regione parvicellulare (RPC) posta più rostralmente, dove si distinguono neuroni più piccoli e di vario tipo (Kennedy et al. 1986).

La porzione magnocellulare si è sviluppata di più nei primi tetrapodi, parallelamente allo sviluppo del cervelletto e del nucleo interposito, dai quali riceve fibre afferenti. Nei primati si è sviluppata abbondantemente la porzione parvicellulare, contemporaneamente allo sviluppo degli emisferi cerebrali, dell'area corticale, frontale e parietale della corteccia celebrale (Padel 1993). Pertanto, queste regioni non possono essere distinte facilmente in tutti i mammiferi, infatti, salendo lungo la scala evolutiva, diventa alquanto difficile definire i loro limiti, poiché la parte caudale della regione parvicellulare viene a sovrapporsi a quella magnocellulare (Ruigrok et al. 1995, Keifer et al. 2000, Baldacchini et al. 2000).

Studi condotti nel topo e nel gatto con il metodo del Golgi e Golgi-Kopsch hanno permesso di suddividere il NR nella porzione parvicellulare e magnocellulare. Inoltre, in base al diametro del soma i neuroni del NR sono stati classificati in quattro tipi: giganti e grandi (50-90 μm) distribuiti nella porzione magnocellulare, di media grandezza (20-50 μm) e piccoli (8-20 μm) localizzati nella porzione parvicellulare (Iwahori et al. 1991; Pagosian 1975). Altri studi hanno dimostrato che il NR presenta un'organizzazione cellulare altamente dettagliata ed eterogenea soprattutto nel gatto (Condè 1966; King et al. 1973; Sadun 1975).

Anche nel ratto e nelle scimmie il NR è stato suddiviso nella porzione parvicellulare, che contiene neuroni di media grandezza (20-25 μm) e piccoli neuroni (meno di 20 μm), e nella porzione magnocellulare, che contiene neuroni giganti (più grandi di 40 μm) e grandi (26-40 μm). Nel ratto è stato possibile studiare, altresì, la morfologia e l'ultrastruttura di questi neuroni (Reid et al. 1975).

Dal punto di vista morfologico è stato osservato che i neuroni giganti e grandi hanno dei dendriti che si propagano in ogni direzione, ma rimangono all'interno dei confini del nucleo; il citoplasma di questi neuroni contiene un reticolo endoplasmatico ruvido esteso, un apparato del Golgi perinucleare prominente e numerosi mitocondri. I neuroni di media grandezza hanno dei dendriti che si dispongono radialmente al soma; presentano un RER meno esteso e un apparato del Golgi distribuito in tutta la cellula. Infine, i piccoli neuroni hanno dei dendriti con molti prolungamenti, che si ramificano poco e rimangono all'interno del nucleo; il RER di questi neuroni si presenta come singoli filamenti mentre il complesso del Golgi è notevolmente ridotto (Reid et al. 1975).

Anche dell'uomo sono state compiute indagini morfologiche e strutturali su neuroni rubrali mediante il metodo del Golgi-Braitenberg. In particolare, non sono state individuate cellule giganti a causa della regressione della regione magnocellulare del nucleo rosso. Per contro, sono stati osservati neuroni grandi (40-50 μm), piccoli (30 μm) e di medie grandezze simili a quelli della porzione parvicellulare degli altri mammiferi ad eccezione della parte finale dendritica a forma di spazzola che è tipica solo della specie umana (Patt et al. 1994).

Il ruolo funzionale differente delle due regioni si evince dalla diversa organizzazione delle fibre afferenti ed efferenti.

La RMC riceve afferenze principalmente dal nucleo interposito del cervelletto mentre la RPC riceve l'input prevalentemente dalla corteccia cerebrale (Humphrey et al. 1984, Humphrey et al. 1976). Il NR fornisce informazioni al midollo spinale e a diverse strutture encefaliche. L'insieme delle fibre afferenti ed efferenti costituiscono una capsula che ricopre l'intero nucleo. Uno schema rappresentativo delle afferenze ed efferenze rubrali è mostrato nella figura 1.

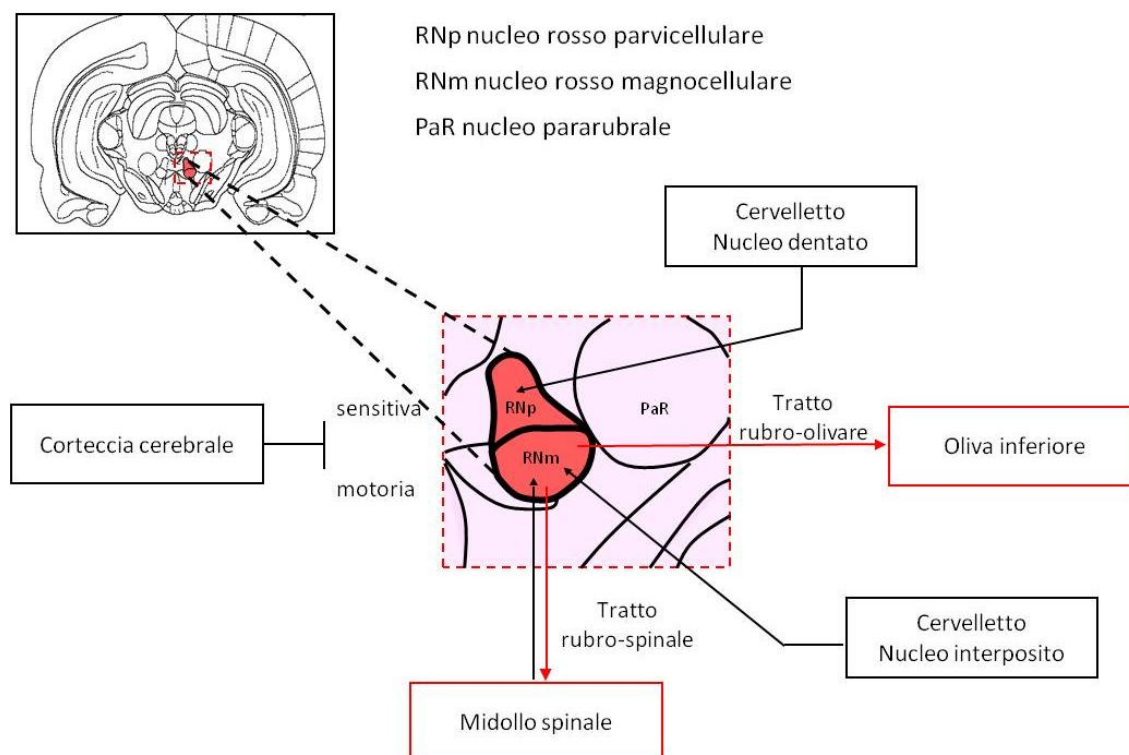


Fig. 1_Schema delle principali afferenze ed efferenze rubrali

La proiezione efferente più significativa del NR è diretta al midollo spinale controlaterale tramite il tratto rubro-spinale (TRS). Benché sia accettato da tutti che le fibre del TRS prendano origine dalla porzione magnocellulare del NR, è stato dimostrato che anche la parte parvicellulare è responsabile dell'origine di una porzione del TRS. (Brodal 1981, Sheich et al. 1983).

Gli assoni dei neuroni del NR attraversano il nucleo nella porzione ventrale e discendono nel mesencefalo, nel ponte e nella regione bulbare per raggiungere il midollo spinale, dove scorrono all'interno del funicolo laterale ventralmente al tratto cortico-spinale laterale (Vernon et al. 2002).

Il TRS scorre accanto a quello cortico-spinale laterale e termina sugli interneuroni della lamina III, V, e VII di Rexed (Nyberg et al. 1964) sede di terminazione delle fibre cortico-spinali provenienti dalla corteccia motoria. Si presume, pertanto, che questi due sistemi agiscano di concerto. Questa stretta sinergia (rubro-spinale/cortico-spinale) è ulteriormente rafforzata dal fatto che la corteccia motoria proietta anche al NR. Ciò significa che il tratto cortico-spinale ha in parallelo un "tratto cortico-spinale

indiretto”, avente un relè nel NR (Brodal 1981, Stern 1938). Il NR, quindi, si configura come un vero e proprio nucleo extrapiramidale che riceve le informazioni dalla corteccia scaricandole al midollo spinale.

I neuroni rubrali che inviano collaterali ai segmenti cervicali e toracici del midollo spinale sono in numero maggiore nel ratto rispetto al gatto e alla scimmia; questo dato indica un forte ruolo del NR nel controllo della muscolatura degli arti anteriori particolarmente utilizzata nel ratto (Gibson et al. 1985, Houk 1989).

La distribuzione ai motoneuroni spinali è organizzata in maniera da controllare reciprocamente i motoneuroni di muscoli antagonisti; la stimolazione elettrica del NR eccita i motoneuroni dei muscoli flessori controlaterali mentre inibisce i motoneuroni dei muscoli estensori controlaterali (Brodal 1981). Il NR, quindi, tramite il TRS controlla sia il movimento sia la postura, poiché è in grado di modulare l'attività sia dei motoneuroni α che dei γ (Brodal 1981, Pompeiano et al. 1957).

Il TRS è controllato anche dalla corteccia cerebellare. Il cervelletto invia al NR due categorie di fibre. Una è diretta alla porzione magnocellulare per il controllo della via rubro-spinale, attraverso la quale il cervelletto regola ciò che accade a livello del midollo spinale (attività motoria stereotipe). L'altra è diretta alla porzione parvicellulare per il controllo della via rubro-talamo-corticale e serve a connettere il cervelletto con la corteccia celebrale (Giuffrida et al. 1988).

Oltre al TRS sono state descritte altre vie efferenti: la via rubro-reticolare, la via rubro-talamica e la via rubro-olivare. Inoltre, alcune cellule del NR sono connesse al nucleo del nervo facciale, al nucleo ambiguo, al nucleo del nervo oculomotore, ai nuclei gracile e cuneato ed al nucleo vestibolare inferiore o spinale (Flumerfelt et al. 1974, Hinrichsen et al. 1983).

Le fibre del tratto rubro-reticolare prendono origine dalle porzioni posteriori del NR e raggiungono la porzione rostro laterale e rostromediale del nucleo reticolare laterale. Anche la corteccia frontoparietale proietta in questo nucleo facendo di esso un centro d'integrazione degli input discendenti dalla corteccia celebrale e ascendenti dal midollo spinale (Shokunbi et al. 1986).

Le fibre del tratto rubro-olivare originano dalla porzione parvicellulare del NR e terminano nell'oliva inferiore ipsilaterale (Swenson et al. 1983). Anche questa via è controllata dalla corteccia cerebellare (cerebello-rubro-olivo) e può trasportare le informazioni o al midollo spinale (cerebello-rubro-olivo-spinale) o di nuovo alla corteccia cerebellare (cerebello-rubro-olivo-cerebello), per controllare e regolare le funzioni del cervelletto stesso (Brodal 1981).

Infine, le fibre del tratto rubro-talamico originano dalla porzione parvicellulare del NR e terminano, nel ratto, sui neuroni del gruppo nucleare posteriore talamico mentre, nel gatto, sul nucleo ventro-laterale talamico (Roger et al. 1987, Condè et al. 1980). La zona incerta del talamo, a sua volta, invia afferenze alla porzione parvicellulare del NR; questo indica che la zona incerta ha un ruolo influente sull'attività motoria e poiché è collegata anche al nucleo interposito cerebellare, essa diviene un punto di comunicazione tra cervelletto e NR (Mitrofanis 2002).

È stata descritta anche una via rubro-cerebellare diretta al nucleo interposto anteriore del cervelletto, dalla quale originano anche le fibre della via cerebello-rubrale (Huisman et al. 1983, Ralston 1994, Corville 1956).

La parte laterale del nucleo interposto anteriore proietta alla regione dorso-mediale del NR magnocellulare mentre la parte mediale proietta alla regione ventro-laterale (Voogd 1964, Flumerfelt 1978). Infine, il nucleo interposto posteriore proietta lungo il bordo mediale della porzione magnocellulare del NR; inoltre, distribuisce terminali al nucleo accessorio oculomotore mediale e alla parte parafascicolare prerubrale (Paxinos 1995).

Il nucleo dentato nel suo insieme proietta alla porzione anteriore del NR.

Diversi autori concordano nell'affermare che le fibre provenienti dal nucleo interposito terminano nella porzione magnocellulare controlaterale trasportando segnali di natura propriocettiva dagli arti, mentre le proiezioni dal nucleo dentato terminano nella porzione parvicellulare controlaterale, che rappresenta una stazione di elaborazione di segnali corticali (Caughell et al. 1977, Flumerfelt et al. 1973, Keifer et al. 1994, Voogd 1964).

Un altro gruppo di fibre afferenti al NR è costituito da quelle provenienti dall'area somatomotrice della corteccia cerebrale ipsilaterale. Diversi studi dimostrano che la parte motoria di questa porzione corticale proietta alla regione magnocellulare, mentre la parte sensitiva proietta alla regione parvicellulare del NR (Rivik et al. 1963, Kusama et al. 1966, Mabuchi et al. 1966, Humphrey et al. 1984).

Questa suddivisione delle connessioni cortico-rubrali permette di assegnare alla parte parvicellulare un ruolo preminente durante la preparazione del movimento, mentre la porzione magnocellulare sarebbe maggiormente coinvolta durante l'esecuzione del movimento (Humphrey et al. 1984).

Neurochimica del Nucleo Rosso

Numerosi studi hanno descritto i diversi neurotrasmettitori operanti a livello rubrale in grado di influenzare la scarica di base dei neuroni di questo nucleo (Nieoullon, 1988). I neurotrasmettitori osservati sono il glutammato (Glu), la glicina (GLI), l'acido gamma amino - butirrico (GABA), la serotonina (5-HT), la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) e l'acetilcolina (Ach).

Il Glu è presente soprattutto nella parte magnocellulare del NR ed è utilizzato come neurotrasmettitore eccitatorio, rispettivamente dalla via cortico-rubrale e dalla via cerebello-rubrale (Kerkerian, 1983).

La GLI, descritta in misura ridotta rispetto al Glu, è un neurotrasmettitore delle afferenze cerebellari con azione inibitoria.

Il GABA è rilasciato da interneuroni inibitori presenti all'interno del NR e attivati dalla via cortico-rubrale (Katsumaru, 1984; Katsumaru, 1986) e dalle vie cerebello-rubrali. Esso è rilasciato anche da fibre efferenti della formazione reticolare e dalla sostanza nera.

L'Ach è rilasciata dalla via cerebello-rubrale. I terminali nervosi colinergici contraggono sinapsi con le fibre del fascio cortico-rubrale glutammatergico a livello presinaptico, esercitando un'influenza inibitoria (Jones, 1986; Nieoullon, 1981).

Per quanto riguarda le monoamine, è stata rilevata un'elevata concentrazione di DA e NA, oltre che di terminali serotoninergici. In pazienti affetti dal morbo di

Parkinson è stata riscontrata una ridotta concentrazione di DA e NA a livello rubrale (Nieoullon, 1988; Zarate-Lagunes, 2001).

La DA è stata trovata in alte dosi nella RMC del NR. L'innervazione dopaminergica in questa struttura potrebbe essere attribuita a fibre provenienti dalla sostanza nera (Jellinger, 1981). In questa regione è stata osservata la presenza di NA e gli effetti modulatori da essa prodotti sulla frequenza di scarica dei neuroni rubrali (Ciranna et al. 1996).

Il Sistema Noradrenergico

La noradrenalina (NA) è uno dei principali neurotrasmettitori monoaminergici nel sistema nervoso sia a livello centrale che periferico (Foote et al. 1983, Moore et al. 1982, Aston Jones et al. 1991). Essa fu osservata per la prima volta nel 1946 da Von Euler nei terminali assonici di fibre appartenenti al sistema nervoso simpatico. Nello stesso periodo Holtz e collaboratori identificarono la sua presenza anche a livello del SNC di mammifero.

Più tardi altri studi dimostrano che la NA non era uniformemente distribuita nel SNC, ma presentava una localizzazione regionale. Ciò suggerì una funzione come mediatore chimico non solo a livello del sistema nervoso periferico ma anche a livello del sistema nervoso centrale (Nieuwenhuys, 1985).

Il processo biosintetico della NA utilizza come precursore l'amminoacido tirosina, assunto tramite la dieta o prodotto tramite l'idrossilazione della fenilalanina. La tirosina, rilasciata nei tessuti nervosi mediante un sistema di trasporto attivo della corrente ematica, viene convertita prima in L-DOPA ad opera della tirosina idrossilasi, poi in dopamina per azione della DOPA-decarbassilasi ed infine, in NA ad opera dell'enzima dopamina- β -idrossilasi (Lodish 2000). Questa via biosintetica viene utilizzata anche dalle cellule cromaffini della midollare del surrene per ottenere adrenalina. Qui, infatti, la NA viene convertita in adrenalina tramite l'enzima feniletanolammina-N-metil-transferasi (PNMT). La midollare del surrene secerne solo piccole quantità di NA rispetto alle cellule nervose.

La biosintesi della NA è un processo labile, regolato da meccanismi che possono modificare l'attività enzimatica a breve o a lungo termine. Le variazioni a breve termine comprendono la modulazione dell'attività della tirosina idrossilasi mediante il meccanismo dell'inibizione da prodotto finale. I fattori a lungo termine come lo stress e fattori ambientali inducono aumenti della sintesi di NA poiché vengono stimolati gli enzimi tirosina idrossilasi e DOPA- β -idrossilasi (Rhoades 2004).

La NA viene conservata ad alte concentrazioni in vescicole secretorie e viene liberata per esocitosi in seguito all'attivazione sinaptica, dove può interagire con

recettori postsinaptici e presinaptici (autorecettori); in quest'ultimo caso modula la liberazione di ulteriori quantità di amina (Bruns 1995).

La principale degradazione metabolica della NA avviene ad opera delle monoaminossidasi (MAO) e delle catecol-ossimetiltransferasi (COMT) a livello extraneuronale. Tuttavia il principale meccanismo di rimozione non è tanto di tipo metabolico ma di riassorbimento da parte della fibra presinaptica secondo un processo ATPasico- NA^{+} - dipendente, comunemente indicato come "uptake" (Cuello et al. 1973).

La maggior parte dei neuroni noradrenergici è contenuta in due strutture troncoencefaliche: il locus coeruleus e la parte caudale del tegmento pontino laterale (Moore 1979, Moore 1980, Moore 1982).

I neuroni che costituiscono il locus coeruleus sono relativamente pochi; nel ratto sono circa 1500 unità, nell'uomo 10000-15000 unità. I neuroni di questo nucleo possiedono assoni notevolmente ramificati che assumono un decorso da una parte discendente fino al midollo spinale e allo stesso tronco dell'encefalo e dall'altra ascendente fino al diencefalo, al cervelletto, all'ippocampo e alla corteccia cerebrale (Swanson et al. 1975, Swanson et al. 1976, Lewis 2001, Foote et al. 1983).

Il locus coeruleus contiene circa la metà dei neuroni noradrenergici troncoencefalici. I rimanenti neuroni noradrenergici hanno una distribuzione diffusa livello del tegmento laterale ventrale. Anche gli assoni di questi neuroni emettono numerose collaterali caratterizzate da una densa arborizzazione terminale e, anche se in minor misura rispetto alle fibre del locus coeruleus, proiettano a vari livelli: midollo spinale, tronco dell'encefalo, talamo, corteccia cerebellare, corteccia cerebrale (Ungerstedt 1971, Olson et al. 1971).

Il sistema noradrenergico costituisce uno dei sistemi di neurotrasmettitori più diffusamente organizzato, infatti, nonostante il ristretto numero di neuroni, le fibre di natura noradrenergica sono dirette quasi ovunque nel SNC, dove è possibile individuare anche una specifica distribuzione dei recettori noradrenergici (Palacios et al. 1984, Nieuwenhuys et al. 1985).

Classicamente i recettori adrenergici sono stati classificati in due distinti gruppi, recettori β adrenergici e recettori α adrenergici, in base alla diversa sensibilità per gli

antagonisti. Sempre a seguito di differente affinità manifestata verso agonisti ed antagonisti, sia il recettore β che il recettore α sono stati ulteriormente suddivisi in sottotipi (Lands et al. 1967, Langer et al. 1974).

La sottoclassificazione generalmente accettata si avvale di una combinazione di metodiche fisiche, chimiche e biologiche. Attualmente, lo schema adottato classifica le varie specie recettoriali in tre gruppi principali ovvero in α_1 , α_2 e β , ciascuno dei quali a sua volta, suddiviso in tre o più sottotipi ed associato ad uno specifico sistema di traduzione del segnale (Nicholas et al. 1996, Bylund et al. 1994).

I recettori adrenergici sono recettori accoppiati a proteine G (GPCR G protein coupled receptor); sono formati da una lunga catena polipeptidica che si ripiega sette volte nel bylaer lipidico e che a livello della III ansa citoplasmatica lega una proteina G. In seguito all'attivazione del recettore, la proteina G è in grado di legare GTP e defosforilarlo a GDP.

Le proteine G sono eterotrimeri costituiti da tre subunità, denominate, in ordine di peso molecolare decrescente, α , β e γ . La subunità α è indispensabile perché è quella che lega e idrolizza il GTP.

In seguito all'attivazione della proteina G possono aumentare, nel citoplasma della cellula, i livelli di secondi messaggeri che sono ioni o sostanze la cui concentrazione varia drasticamente in risposta all'attivazione recettoriale e che sono in grado di legarsi a substrati specifici modificandone la funzione. Questi secondi messaggeri modulano la funzione dei sistemi effettori finali (solitamente chinasi) capaci di modificare la funzione di altri substrati (Fumagalli 2000).

I recettori adrenergici α_1 (α_{1a} , α_{1b} , α_{1c} , α_{1d}) legano la proteina Gq e in seguito al legame con la NA consentono un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare che attiva la fosfolipasi C. Questo enzima scinde il fosfatidil inositolo, un fosfolipide di membrana, in inositolo 3P (IP3) e diacilglicerolo (DAG) il quale, a sua volta, attiva la fosfochinasi C (PKC).

I recettori β (β_1 , β_2 , β_3) legano la proteina Gs e attivano il sistema dell'adenilato ciclasi che converte ATP in AMPc. L'AMPc, a sua volta, attiva la PKA che regola numerose funzioni cellulari.

Anche i recettori α_2 (α_{2a} , α_{2b} , α_{2c}) che legano la proteina G_i sono associati al sistema dell'adenilato ciclasi ma, a differenza dei recettori β , quando sono attivi, inibiscono l'attività dell'adenilato ciclasi (Boyajian et al. 1987, Bylund et al. 1992, Jones et al. 1991).

La tabella riportata di seguito riassume le caratteristiche principali delle tre classi recettoriali adrenergiche.

Classe recettoriale	Sottoclasse recettoriale	Proteina G	Meccanismo d'azione	Agonisti	Antagonisti	Localizzazione
α_1	α_{1a} - α_{1b} - α_{1c} - α_{1d}	Gq	Attivazione fosfolipasi C	Fenilefrina	Prazosina	Postsinaptici
α_2	α_{2a} - α_{2b} - α_{2c}	G_i	Inibizione Adenilato ciclasi	Clonidina	Ioimbina	Postsinaptici Presinaptici
β	β_1 - β_2 - β_3	G_s	Attivazione Adenilato ciclasi	Isoproterenolo	Timololo	Postsinaptici

I recettori adrenergici non sono distribuiti uniformemente nell'organismo ma in alcuni tessuti predomina l'uno o l'altro tipo/sottotipo.

I recettori α_1 e β_2 sono localizzati soprattutto sui muscoli lisci e sono responsabili, rispettivamente, della contrazione e del rilassamento di questi muscoli.

I recettori β_1 si trovano sul cuore, reni, tessuto adiposo e sono responsabili dell'accelerazione del battito cardiaco, della secrezione di renina e della lipolisi.

I recettori β_3 sono stati osservati sul cuore e sull'esofago, stomaco, intestino, vescica e sono coinvolti nella regolazione del flusso del sangue e nella motilità del tratto gastrointestinale (Anthony et al. 1998; Dessy et al. 2004).

I recettori α_2 e β_2 localizzati a livello dei terminali presinaptici e sono coinvolti nella regolazione della quantità di NA rilasciata; per tale ragione sono chiamati autorecettori.

Quando aumenta la quantità di NA rilasciata nella fessura sinaptica vengono attivati i recettori α_2 che bloccano l'ulteriore liberazione di NA dal terminale

presinaptico con un meccanismo di inibizione a feedback; al contrario i recettori β_2 stimolano l'ulteriore rilascio di NA con un meccanismo di eccitazione a feedback (Rhoades 2004).

È stato riscontrato un elevato numero di recettori β adrenergici nel nucleo accumbens, nel tubercolo olfattivo, nel putamen, nel caudato, nel nucleo olfattivo, nella sostanza nera e nelle aree della neocorteccia, mentre un numero minore di recettori β è stato osservato nel talamo, nell'ipotalamo, nell'ippocampo, nella zona mediale dell'encefalo e del cervelletto (De Paermentier et al. 1989).

Diverse sostanze chimiche agiscono in maniera selettiva come agonisti o antagonisti dei recettori adrenergici. La clonidina mima l'effetto prodotto dalla NA quando si lega ai recettori α_2 per cui viene detta agonista dei recettori α_2 ; la ioimbina, al contrario, blocca l'effetto prodotto dal legame della NA con il recettore α_2 e viene, quindi, definita antagonista.

Fra gli agonisti e antagonisti dei recettori α_1 possiamo ricordare la fentolamina che attiva i recettori α_1 e la prazosina che li blocca, mentre fra gli agonisti e antagonisti dei recettori β possiamo citare l'isoproterenolo e il timololo.

L'attività dei neuroni noradrenergici è stata associata con gli stati di veglia ed attenzione, i disordini affettivi, l'apprendimento e la memoria, il sonno, l'ansietà, la nocicezione e con la circolazione sanguigna cerebrale (Redmond et al. 1976, Aston Jones et al. 1984, Charney et al. 1990, Bremner et al. 1996).

Studi anatomici, elettrofisiologici, comportamentali e biochimici hanno portato a supporre l'esistenza di due principali funzioni del sistema noradrenergico, con riferimento, soprattutto, ai neuroni localizzati nel locus coeruleus (Berridge et al. 2003).

Una funzione peculiare del sistema noradrenergico è quella di indurre e mantenere un adeguato stato di attività dei neuroni delle strutture proencefaliche per l'acquisizione d'informazioni sensoriali.

Una ulteriore funzione è quella di modulare, durante lo stato di veglia, le informazioni sensoriali provenienti dall'ambiente esterno attraverso processi sensoriali, attenzionali, di memoria ed attraverso processi motori.

La NA, oltre che da neurotrasmettitore classicamente inteso, si comporta da neuromodulatore dell'attività neuronale di diverse strutture del SNC coinvolte nel controllo delle funzioni motorie (Woodward et al.1991). Infatti, è stato osservato un effetto, modulatorio della NA sull'attività neuronale di strutture nervose fra le quali il talamo (Pape et al.1989), la corteccia cerebrale (Kolta et al. 1989, Sawagushi et al.1990), la corteccia cerebellare (Hoffer et al. 1973, Parfitt et al. 1988), i nuclei cerebellari (Mori-Okamoto et al. 1988), il nucleo accumbens (Unemoto et al. 1985), la formazione ippocampale (Winson et al. 1985, Curet et al. 1988) i nuclei del rafe (Couch et al. 1970), i nuclei vestibolari (Licata et al. 1993) e le cellule di Purkinje (Granholm et al. 1988). Altri studi hanno dimostrato una modulazione noradrenergica sulla frequenza di scarica di base in neuroni rubrali (Ciranna et al.1996).

Noradrenalina e Nucleo Rosso

Diversi studi dimostrano la presenza di innervazioni di natura noradrenergica nel NR di vari modelli animali, tra cui ratto, gatto e babbuino (Versteeg et al. 1976, Jellinger et al. 1981, Bosler et al. 1983, Huffmann et al.1977).

Nel babbuino è stata osservata una modulazione noradrenergica sull'attività dei neuroni rubrali principalmente di natura inibitoria (Huffmann et al. 1977).

Studi di ibridazione in situ e di immunoistochimica dimostrano la presenza di recettori adrenergici al livello sia della RPC che della RMC (Domyancic et al. 1997, Nicholas et al. 1993, Nicholas et al. 1993b) .

Studi elettrofisiologici nel nucleo rosso di ratto, hanno dimostrato che l'applicazione di NA può sia deprimere sia incrementare la frequenza di scarica di base dei neuroni rubrali. Tali effetti dipendono dall'interazione dell'amina con uno specifico recettore adrenergico (Ciranna et al. 1996). In particolare, è stato osservato che gli effetti inibitori della NA sui neuroni rubrali sono mediati dai recettori α_2 adrenergici, mentre l'attivazione dei recettori β induce effetti eccitatori (Ciranna et al. 1996).

Il sistema Glutamatergico

L'Acido Glutammico (Glu) è uno dei neurotrasmettitori eccitatori di maggiore rilievo presenti a livello del sistema nervoso centrale.

La via biosintetica che produce Glu inizia dall'acido α -chetoglutarato, un prodotto del ciclo dell'acido citrico (CAC), il quale viene convertito in Glu dall'enzima aminotrasferasi.

Il Glu viene accumulato in vescicole e successivamente rilasciato nel vallo sinaptico dove va a legarsi a recettori post-sinaptici specifici, mentre il Glu in eccesso dovrà essere rimosso poiché ad elevate concentrazioni causa neurotossicità e morte cellulare.

Il riassorbimento del Glu può avvenire grazie a trasportatori che si trovano nel terminale pre-sinaptico e nelle cellule gliali. La maggior parte del Glu, però, è trasportato nelle cellule gliali dove è convertito in glutammina dall'enzima glutammina sintasi, la glutammina ritorna nel terminale pre-sinaptico e viene riconvertita, mediante un enzima mitocondriale denominato glutaminasi, in glutammato libero che verrà reintrodotta nelle vescicole (Rhoades 2004, Bonde et al. 2003; Bonde et al. 2005).

Il Glu partecipa a diversi meccanismi fisiologici in tutto il SNC; media l'informazione dolorifica nel midollo spinale: ha un ruolo nell'integrazione posturale (Nakanishi 1992).

È utilizzato nella produzione di acido folico e, oltre ad essere indispensabile per la produzione di amminoacidi essenziali, è un precursore dell'acido γ -amminobutirrico.

I neuroni glutamatergici sono localizzati abbastanza diffusamente nella corteccia e nell'ippocampo, formazione cerebrale implicata nei processi di memoria e in quelli emozionali. Il Glu, inoltre, gioca un ruolo primario in tutti i processi cognitivi quali: il pensiero, la memoria e la percezione. Esso è implicato in ciò che si definisce il potenziamento a lungo termine, fenomeno particolarmente legato alla memoria (Brodal, 1981).

Accanto alle sue molteplici funzioni fisiologiche (mediazione della trasmissione sinaptica rapida, modulazione della plasticità sinaptica, ruolo stimolatorio nello sviluppo neuronale), il Glu, se presente a concentrazioni troppo elevate nello spazio extracellulare, può rappresentare uno stimolo neurotossico con conseguente morte neuronale. Poiché l'eccitotossicità, intesa appunto come capacità del Glu di determinare morte neuronale, è un meccanismo patogenetico comune alla maggior parte delle malattie neurodegenerative, la modulazione dei livelli extracellulari di Glu rappresenta un potenziale approccio neuroprotettivo per tali patologie. Ciò potrebbe essere particolarmente vero per le malattie neurodegenerative dello striato, quali il morbo di Parkinson e la corea di Huntington, nelle quali la componente eccitotossica sembra giocare un ruolo molto rilevante (Difazio 1992).

Il Glu esercita la sua azione eccitatoria agendo su specifici recettori localizzati sulla membrana post-sinaptica. I recettori glutamatergici possono essere distinti in due classi: recettori associati ad un canale ionico, detti ionotropici (Monaghan et al. 1988, Monaghan et al. 1991), e recettori associati a proteine G, detti metabotropici (Masu et al. 1991).

I recettori ionotropici regolano in modo rapido l'eccitabilità delle cellule nervose mediante l'apertura diretta di canali ionici facenti parte del recettore stesso. I recettori metabotropici (mGluRs) diversamente evocano risposte più lente attivando la via di un secondo messaggero.

I recettori ionotropici includono i recettori NMDA, che rispondono al N-metil-D-aspartato e sono antagonizzati dal D-2-amino-5-fosfovalerato (APV), e i recettori non-NMDA che sono sensibili al 6-ciano-7-nitroquinoxalino-2-3-dione (CNQX) e al quisqualato. Fanno parte dei non-NMDA i recettori che rispondono all'alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone-propionate (AMPA) e i recettori che hanno un'alta affinità al cainato (Kain) (Molnar et al. 2002). I recettori ionotropici (NMDA e AMPA) possono essere modulati e quindi utili nel trattamento dell'epilessia (Chapman 1988; Loscher 1988).

L'attivazione dei recettori NMDA produce potenziali post-sinaptici eccitatori (EPSP) aprendo canali ionici che aumentano la conduttanza al Na^+ e K^+ . Anche

l'attivazione dei recettori non-NMDA (quisqualato e cainato) genera un ESPS perché consente un aumento della conduttanza al Ca^{2+} . Quando la membrana è a riposo questi recettori sono bloccati dal Mg^{2+} e vengono sbloccati dalla depolarizzazione della membrana, quindi i recettori non-NMDA sono recettori canali regolati sia chimicamente sia dal voltaggio (Rhoades 2004).

Diversamente dalla risposta eccitatoria provocata dai recettori ionotropici, i mGluRs causano un abbassamento della risposta post-sinaptica, che può incrementare o decrementare l'eccitabilità cellulare (Purves 2001).

Questi recettori possono essere regolati da agonisti e antagonisti competitivi, antagonisti non competitivi e modulatori allosterici positivi. Queste molecole hanno delle proprietà specifiche che le rendono ottime candidate per le applicazioni terapeutiche (Pin et al. 2002; Kew et al. 2005).

Attualmente sono conosciuti otto tipi di recettori glutammatergici metabotropici (mGluR1-8) e questi possono essere divisi in tre gruppi in base alla struttura molecolare, al profilo farmacologico e al meccanismo di trasduzione del segnale.

Il I gruppo comprende i recettori mGluR1 e mGluR5 che sono recettori che utilizzano la via che attiva la fosfolipasi C e quindi un aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare. I recettori di gruppo I si trovano a livello del corpo striato, dove contribuiscono alla regolazione del tono motorio e dei livelli extracellulari di Glu.

La maggior parte delle malattie neurodegenerative dello striato, quali il morbo di Parkinson e la corea di Huntington, sono dovute ad un aumento della concentrazione di Glu extracellulare quindi la regolazione di tale concentrazione può essere utile per la cura di queste malattie (Difazio e al. 1992).

Gli antagonisti non competitivi dei recettori mGluR1 e mGluR5 sono risultati efficaci in molti modelli di malattia sia vitro che in vivo come l'Alzheimer, la sclerosi laterale amiotropica, l'ischemia cerebrale (Bruno et al. 2001) e sono utili nel trattamento del dolore (Zhu et al. 2004; Hu HJ et al. 2007).

Il II gruppo include i recettori mGlu2 e mGlu3 che inibiscono la via dell'AMPC. Gli agonisti dei recettori mGlu2 e mGlu3 bloccano il rilascio di Glu e promuovono la sintesi e il rilascio di fattori neurotrofici negli astrociti. E' stato dimostrato che questi agonisti

sono efficaci in molti modelli di malattia animale come l'ansietà e la schizofrenia (Rorick-Kehn LM et al. 2007; Woolley ML et al. 2007).

Infine, il III gruppo comprende i recettori mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8 che inibiscono la via dell'AMPC. Anche gli agonisti dei recettori del III gruppo limitano il rilascio di Glu e potrebbero essere utilizzati nella cura di altre patologie (Bruno et al. 2001).

I neuroni glutamatergici sono localizzati abbondantemente nella corteccia e nell'ippocampo, formazione cerebrale implicata nei processi di memoria e in quelli emozionali. Infatti, il Glu ha un ruolo primario in tutti i processi cognitivi quali: il pensiero, la memoria e la percezione. Esso è implicato in ciò che si definisce potenziamento a lungo termine, fenomeno particolarmente legato alla memoria (LTP: long term potentiation). LTP è un termine utilizzato per descrivere un potenziamento notevole e duraturo della trasmissione sinaptica che si attiva a livello di varie sinapsi del SNC dopo una breve (condizionante) e intensa (burst) stimolazione presinaptica (Watkins et al. 2006).

Il Glu è indispensabile per la sintesi degli aminoacidi non essenziali ovvero dell'acido gamma amminobutirrico e dell'acido folico. Esso svolge molteplici funzioni fisiologiche nel SNC come la mediazione della trasmissione sinaptica rapida, la modulazione della plasticità sinaptica e ha un ruolo stimolatorio nello sviluppo neuronale. Partecipa, inoltre, alla mediazione dell'informazione dolorifica nel midollo spinale e nell'integrazione posturale, in quanto viene rilasciato dalle fibre che nascono dal nucleo subtalamico di Lewis e si portano al globo pallido mediale, alla pars compacta e alla reticolata della sostanza nera (Nakanishi 1992).

Glutammato e Nucleo Rosso

Diversi studi dimostrano la presenza di numerose fibre glutamatergiche a livello del NR. Il Glu è soprattutto presente nella porzione magnocellulare del nucleo ed è utilizzato come neurotrasmettitore eccitatorio dalla via cortico-rubrale e dalla via cerebello-rubrale (Kerkerian 1983). Infatti, dopo lesione della parte controlaterale del

cervelletto, l'attività del Glu nella parte magnocellulare del nucleo risulta ridotta (Nieoullon et al. 1988).

Nel NR sono stati riscontrati sia sottotipi recettoriali glutamatergici sia di tipo ionotropico che metabotropico, soprattutto è stata osservata un'elevata densità di recettori metabotropici del gruppo I, più nello specifico è stato osservato un alta densità di mGluR1.

SCOPO DELLA RICERCA

Secondo quanto esposto fino ad ora e in accordo con i dati riportati in letteratura, sia la regione magnocellulare sia quella parvicellulare del nucleo rosso sono sede di afferenze glutamatergiche e noradrenergiche. Inoltre, diversi studi condotti su reti neuronali del SNC descrivono l'azione modulatoria della NA su sinapsi glutamatergiche.

In tale contesto, le ricerche condotte nel presente studio hanno avuto lo scopo di verificare l'azione modulatoria della NA sulla risposta eccitatoria evocata dal Glu in neuroni rubrali. Inoltre, poiché la membrana dei neuroni rubrali presenta sia recettori di tipo α_2 che β adrenergici, è parso utile valutare il ruolo di queste due classi recettoriali in tale modulazione.

MATERIALI E METODI

Preparazione dell'animale

Le indagini sperimentali sono state condotte in vivo su ratti maschi appartenenti al ceppo Wistar in anestesia profonda mediante iniezioni intraperitoneali di uretano (1,3 g/Kg), utilizzati secondo le direttive della Commissione Europea (86/609/EEC) e della normativa italiana vigente in materia di sperimentazione animale. I ratti adulti di peso compreso fra 250 e 300 grammi venivano fissati sull'apparecchio stereotassico di Horsley-Clarke (David Kopf, Instruments, USA), mentre un sistema termostato manteneva la temperatura corporea costante a valori fisiologici.

Si procedeva praticando un'incisione sulla cute lungo la sutura longitudinale della teca cranica, quindi si eseguiva un foro alle coordinate corrispondenti al nucleo rosso secondo l'atlante stereotassico di Paxinos e Watson (Paxinos et al. 1997) in modo da permettere l'introduzione dell'elettrodo di registrazione. Le indicazioni fornite dall'atlante dell'encefalo di ratto identificano i siti di registrazione per la nostra struttura d'interesse alle coordinate: Anteriore (A): 2,70-3,70 mm; Laterale (L): 0,40-1,40 mm; Verticale (V): 6,40-7,40 mm (figura 2).

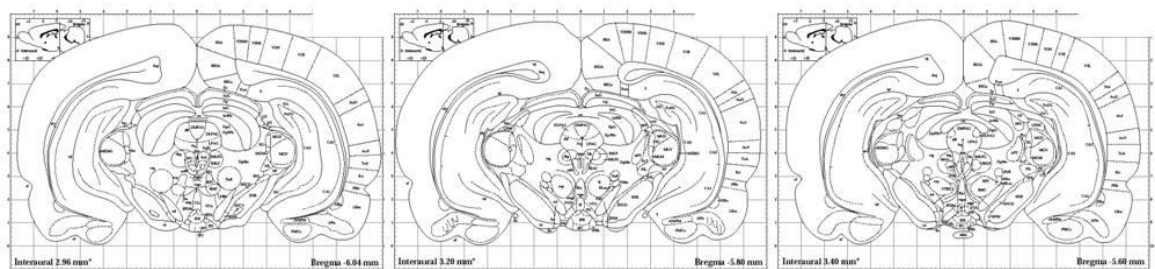


Fig. 2 _Sezioni coronali di encefalo di ratto dell'atlante paxinos: A= 2.96-3.20-3.40

Le superfici tissutali esposte erano ricoperte con una soluzione salina di agar al 2% per prevenirne l'essiccamento. La frequenza cardiaca e respiratoria erano periodicamente monitorate e, qualora necessario, erano somministrate dosi aggiuntive di anestetico.

Al fine di risalire all'esatta localizzazione dei neuroni saggiati, veniva marcato il punto finale di ogni penetrazione dell'elettrodo mediante il rilascio iontoforetico (-20 μ A per 20 minuti) di Pontamina Sky Blu (Sigma).

Quindi, al termine dell'esperimento l'animale veniva sacrificato mediante un overdose di anestetico; si procedeva all'espanto dell'encefalo e alla sua fissazione in formaldeide al 10% per 48 ore e poi in una soluzione di saccarosio al 30% per 24 ore.

Trascorsi i tempi di fissazione e conservazione del tessuto, venivano allestiti dei preparati istologici di sezioni frontali dell'encefalo, dello spessore di 60 μ m, mediante l'utilizzo di un microtomo a congelamento e successivamente montate su vetrini precedentemente gelatinati. I preparati istologici venivano colorati con rosso neutro e, infine, osservati al microscopio ottico. Il punto di blu indicava il punto di fine penetrazione e quindi veniva ricostruita l'esatta localizzazione dei neuroni saggiati (figura 3).

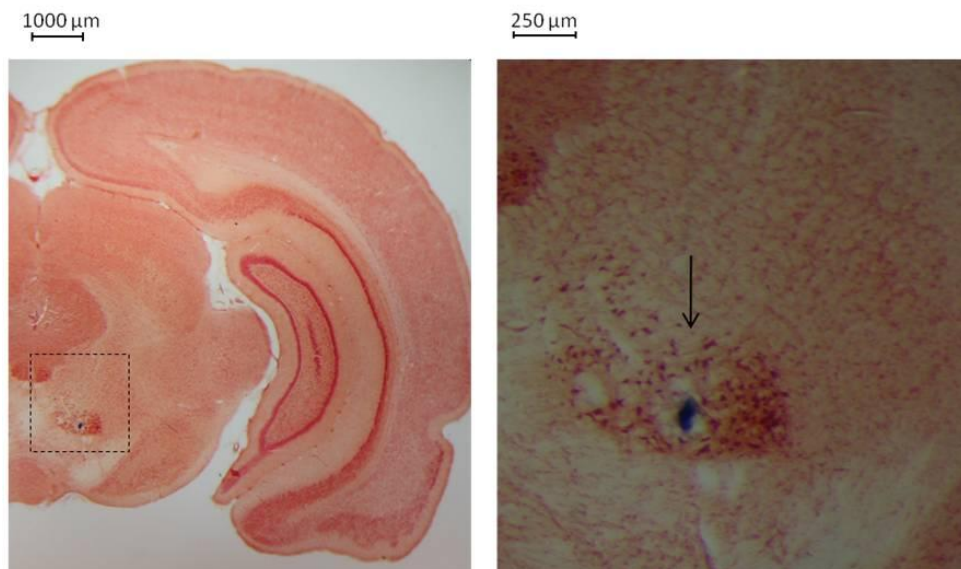


Fig. 3_Ricostruzione istologica della regione del NR esplorata durante l'esperimento dove è visibile la marcatura con la pontamina (punto di blu)

Registrazione extracellulare e microiontoforesi

Per l'analisi dell'attività bioelettrica dei neuroni si può fare ricorso alla tecnica delle registrazioni extracellulari e alla simulazione del rilascio sinaptico di neurotrasmettitori, tramite microiontoforesi. Per la registrazione extracellulare e per la

contemporanea applicazione di diverse sostanze si utilizzava un microelettrodo di vetro multi barellato montato su un micromanipolatore (LPC, France) che consentiva l'avanzamento micrometrico all'interno della struttura d'interesse.

L'elemento del microelettrodo deputato alla registrazione dell'attività neuronale veniva riempito con una soluzione di NaCl 3M addizionata del 4% di Pontamina Sky Blue. I potenziali d'azione registrati da tale elettrodo venivano amplificati mediante un sistema differenziale (Grass Instruments, USA) e filtrati da un equalizzatore (Yamaha EQ70), in grado di migliorare il rapporto segnale/disturbo.

Il segnale era, altresì, visualizzato mediante un oscilloscopio a raggi catodici (KENWOOD mod. CS8010) e inviato, in parallelo, a un circuito d'interfaccia (1401 Plus, CED, UK) che provvedeva a convertirlo da evento analogico ad evento digitale.

L'attività neuronale era ritenuta unitaria solo se l'ampiezza dello spike si manteneva costante durante il periodo di registrazione ed aveva un'ampiezza maggiore di almeno tre volte rispetto all'attività bioelettrica di fondo. Una volta digitalizzati, i potenziali d'azione erano acquisiti da un Personal Computer tramite un software dedicato (Spike2, CED, UK) in grado di visualizzare l'andamento della frequenza di scarica neuronale sotto forma di istogrammi. Tali istogrammi mostrano il numero degli spikes prodotti nel tempo dal singolo neurone studiato e quindi consentono la visualizzazione dell'attività bioelettrica di base e quindi una qualunque variazione di tale attività.

Una volta isolata l'attività a spikes di un singolo neurone, si procedeva all'applicazione delle sostanze mediante la tecnica della microiontoforesi, quindi alla simulazione del rilascio sinaptico di neurotrasmettitori o comunque di molecole attive a livello sinaptico.

La nostra procedura sperimentale richiedeva l'utilizzo delle seguenti sostanze:

- noradrenalina idrogentartrato (NA, 200mM, pH 4.0, Sigma);
- acido glutammico (Glu, 100mM, pH 8.0, Sigma);
- clonidina idrocloride (clo, 50mM, pH 5.0, Tocris);
- isoproterenolo idrocloride (iso, 50mM, pH 5.0, Sigma);
- ioimbina idrocloride (ioi, 20mM, pH 5.0, Sigma);

- timololo (tim 20mM, pH 5.0, Sigma).

Un sistema microiontoforetico (Neurophore BH2, Medical Sistem Corporation, USA) era utilizzato per controllare il rilascio e la ritenzione delle sostanze, mediante applicazioni di correnti di intensità e polarità appropriate applicate all'estremità delle singole barre. Inoltre, il sistema microiontoforetico, attraverso un elemento contenente una soluzione di NaCl 3M, era in grado di bilanciare automaticamente le correnti applicate nei processi d'iniezione e di ritenzione, così da evitare alterazioni dell'attività elettrica del neurone preso in esame.

La routine sperimentale consisteva nell'effettuare microiniezioni di GLU, ad intensità prefissata e della durata di 30 secondi, sia in condizioni di controllo che durante l'applicazione di NA e dei suoi agonisti ed antagonisti. La figura 4 mostra il set-up sperimentale.

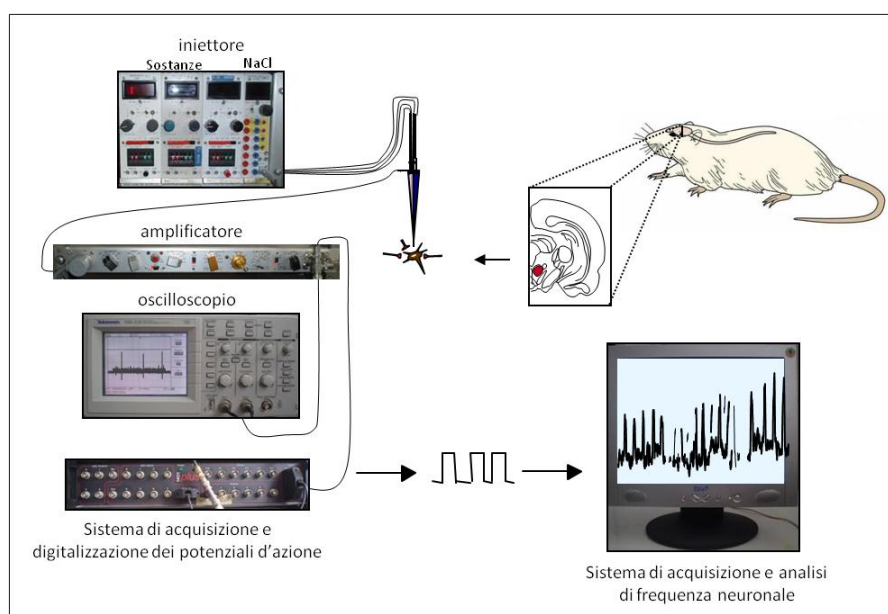


Fig. 4_Set-up sperimentale

Analisi dei dati

L'azione modulatoria esercitata dalla NA sulla risposta indotta a seguito dell'applicazione di GLU in neuroni rubrali, si considerava significativa, solo se la frequenza di scarica media del neurone era modificata, nel suo valore, non meno di due volte la deviazione standard per un periodo di tempo di almeno 20 secondi.

Al fine di comparare i dati ottenuti e quindi definire la risposta neurale alle sostanze somministrate, sono stati utilizzati tre parametri:

N: definito come la differenza tra il numero di spikes registrati durante l'effetto e il numero di spikes registrati in un uguale periodo antecedente l'iniezione della sostanza;

D: definito come la durata dell'effetto espressa in secondi;

P: definito come variazione percentuale della frequenza di scarica rispetto alle condizioni di controllo.

Gli effetti indotti dall'applicazione delle sostanze erano considerati significativi ogni qualvolta almeno due dei tre parametri considerati, variavano in modo significativo rispetto ai controlli.

Infine, i valori dei tre parametri N, D e P, riferiti alle risposte al GLU registrate prima, durante e dopo applicazione di NA o di un suo agonista, venivano sottoposti a comparazione mediante analisi statistiche previste da un appropriato software (Graph-Pad-Prism, T-test, tests non parametrici).

Perfusione ed Istologia

Al fine di effettuare l'analisi immunoistochimica per la determinazione dei recettori α_2 e β_1 e β_2 noradrenergici nel NR, sono state effettuate delle sezioni frontali di encefalo.

Gli animali, ancora sotto l'effetto dell'anestesia, erano sottoposti a perfusione transcadiaca, attraverso l'aorta ascendente, con una soluzione di NaCl 0,9%, seguita da una soluzione di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0,1 M (pH 7,4).

Successivamente, l'encefalo veniva prelevato, posto per le prime 24 ore nella stessa soluzione fissativa (paraformaldeide) e per le successive 48 ore in una soluzione crioprotettrice (contenente saccarosio al 30% in tampone fosfato 0,1 M).

Il tessuto era quindi pronto per essere affettato al microtomo congelatore.

Le fettine erano tagliate in senso coronale (spessore di 40 μ m) e poste in una soluzione contenente glicerolo ed etilenglicol al 30% che ne permetteva la

conservazione a -20°C, così da poterne consentire l'utilizzo anche in tempi successivi al taglio.

Immunoistochimica

Le sezioni erano inizialmente sottoposte ad una serie di lavaggi in TBS (TRIS 0,05 M in 0,9% di NaCl), per eliminare l'eccesso della soluzione anti-freezing usata per la conservazione del tessuto a -20°C. Dopo un passaggio rapido in H₂O₂ 1% per disattivare la perossidasi eritrocitaria, si procedeva alla permeabilizzazione del tessuto con una soluzione di TBS contenente 0,4% di Triton X-100 per 30 minuti. Le fettine erano quindi immerse in un siero di blocco, costituito da 4% di siero normale di capra (NGS, Sigma), per altri 30 minuti per inattivare eventuali siti aspecifici. Erano quindi incubate per tutta la notte con gli anticorpi primari di coniglio anti α_2 , β_1 e β_2 in TBS (1:500, Santa Cruz).

Il giorno seguente si procedeva ad una serie di 3 lavaggi in TBS della durata di 5 minuti ciascuno ed all'incubazione, per un'ora, con un anticorpo secondario biotinilato anti-IgG di coniglio, indotto nella capra (1:200, Vector Laboratories). Dopodiché, eseguiti successivi lavaggi in TBS, si procedeva all'incubazione per un'ora con il complesso avidina-perossidasi biotinilata (ABC Kit, 1:100 Vector Laboratories).

Trascorso il tempo d'incubazione ed effettuati alcuni lavaggi, l'attività della perossidasi veniva visualizzata con una reazione colorimetrica eseguita con una soluzione contenente diaminobezidine tetrahydrochloride (DAB), Tris 0,05M e H₂O₂ al 0,45%. Le fettine, così allestite, erano montate su vetrini gelatinati, chiarificate, ricoperte con vetrini copri oggetto e osservate al microscopio ottico (DPX ; BDH laboratories, Poole, England).

RISULTATI

Effetti della NA sulle risposte al GLU in neuroni rubrali

L'effetto dell'applicazione di NA o suoi agonisti ed antagonisti sulla responsività al Glu è stato studiato su 37 neuroni localizzati istologicamente a livello del nucleo rosso.

Tutti i neuroni testati erano spontaneamente attivi ed esibivano una frequenza di scarica di base compresa fra 6 e 60 spikes/s.

A seguito dell'applicazione di Glu i neuroni saggiati incrementavano in maniera significativa la loro frequenza di scarica di base; la risposta eccitatoria evocata dal Glu compariva 2-4 s dall'inizio dell'iniezione ed inoltre, era essere dose dipendente e reversibile entro 5-10 s dalla fine dell'iniezione.

La microiniezione di NA o dei suoi agonisti e antagonisti, modificava la responsività dei neuroni rubrali al GLU.

In particolare, nel 90% dei neuroni rubrali studiati la NA produceva un decremento della responsività al Glu, nel 5% un incremento, mentre nel restante 5 % di essi non ha esercitato alcun effetto (figura 5).

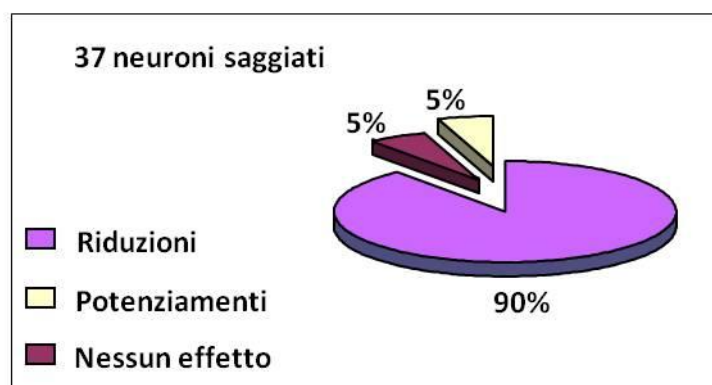


Fig. 5_ Effetti esercitati dalla NA sulla responsività al Glu in neuroni rubrali.

La figura 6 mostra l'analisi dei valori medi dei parametri N, D e P, relativi a tutto il campione analizzato, prima, durante e dopo la coiontoforesi di NA. L'analisi complessiva mostra una variazione significativa di tutti tre i parametri; si noti la particolare significatività della variazione del parametro N.

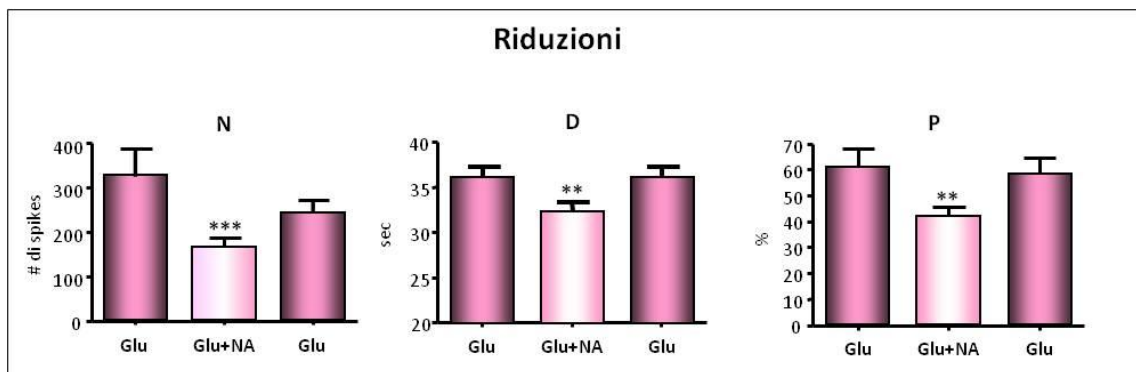


Fig. 6_Variazione dei valori dei parametri N, D e P durante l'azione inibitoria esercitata dalla NA sulla risposta al Glu in neuroni rubrali.

*** $P < 0.0001$ ** $P < 0.001$

La figura 7 mostra gli istogrammi di frequenza di scarica media relativi a due neuroni rubrali localizzati nella porzione magnocellulare (figura 7A) e nella porzione parvicellulare (figura 7B), dove è possibile osservare gli effetti indotti dal rilascio di NA sulla risposta eccitatoria indotta dal Glu prima durante e dopo l'applicazione dell'ammina.

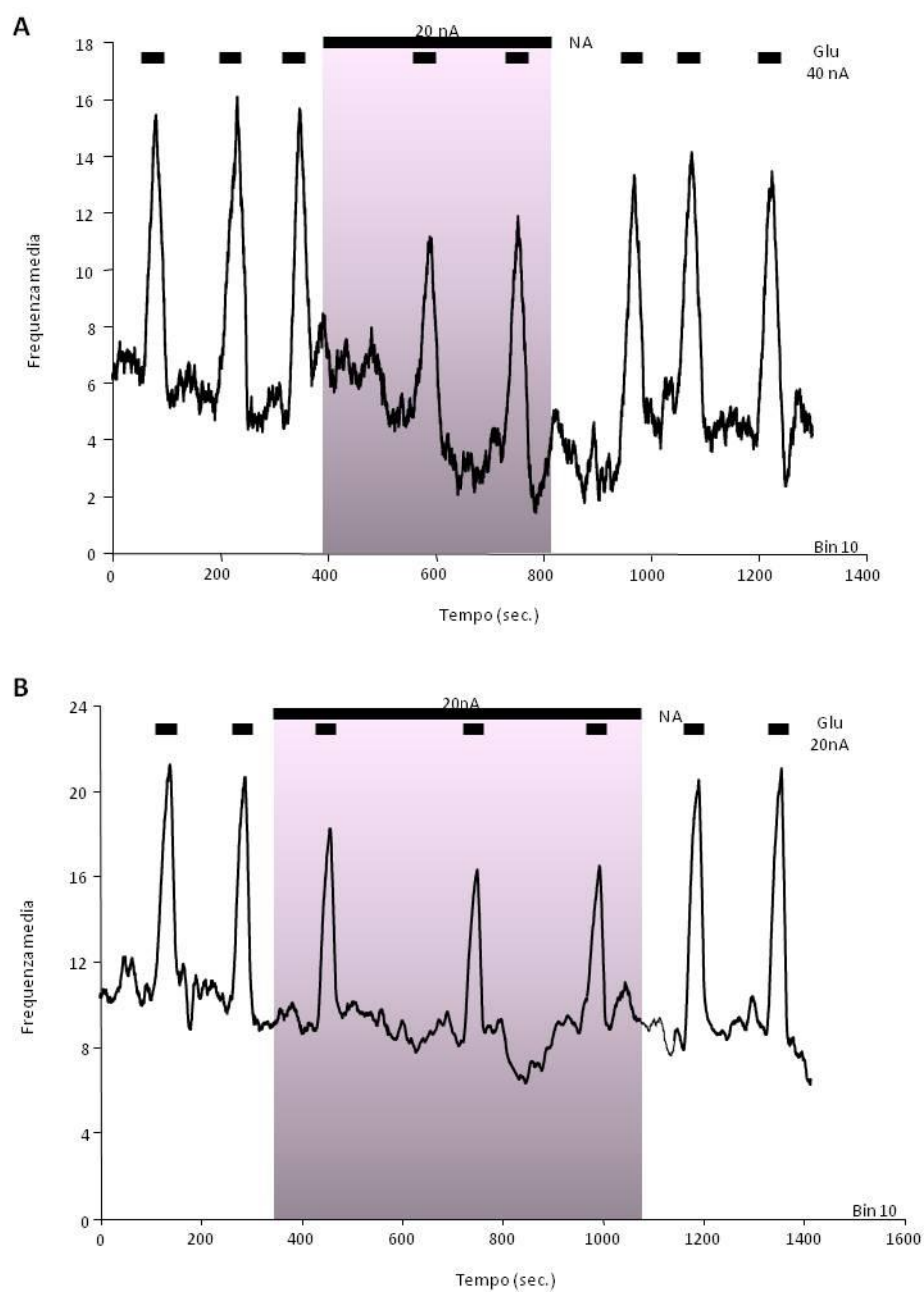


Fig.7 _Istogrammi di frequenza media di due neuroni rubrali localizzati nella porzione magnocellulare (**A**) e parvicellulare (**B**) dove si osserva l'azione depressoria esercitata dalla NA sulla risposta al Glu.

Gli istogrammi mostrano il marcato effetto depressivo della NA sull'eccitazione indotta dal Glu. In entrambi i casi, si può osservare come la risposta indotta dal Glu risenta piuttosto rapidamente della presenza di NA ed inoltre, è possibile notare come

l'effetto esercitato dall'ammina cessa dopo l'interruzione del suo rilascio e quindi si ha un ritorno piuttosto rapido alle condizioni di controllo.

L'effetto netto indotto sulla risposta al Glu è confermato dall'analisi quantitativa dei parametri N, D e P che hanno mostrato una riduzione significativa durante la coiontoforesi di NA.

La figura 8 mostra l'andamento della frequenza media di scarica di un neurone rubrale appartenente al porzione magnocellulare prima, durante e dopo il rilascio dell'ammina. Anche in questo caso è possibile osservare come la risposta eccitatoria determinata dal rilascio di Glu veniva depressa durante l'applicazione di NA. Inoltre, in questo caso è possibile osservare anche una dose-dipendenza dell'effetto.

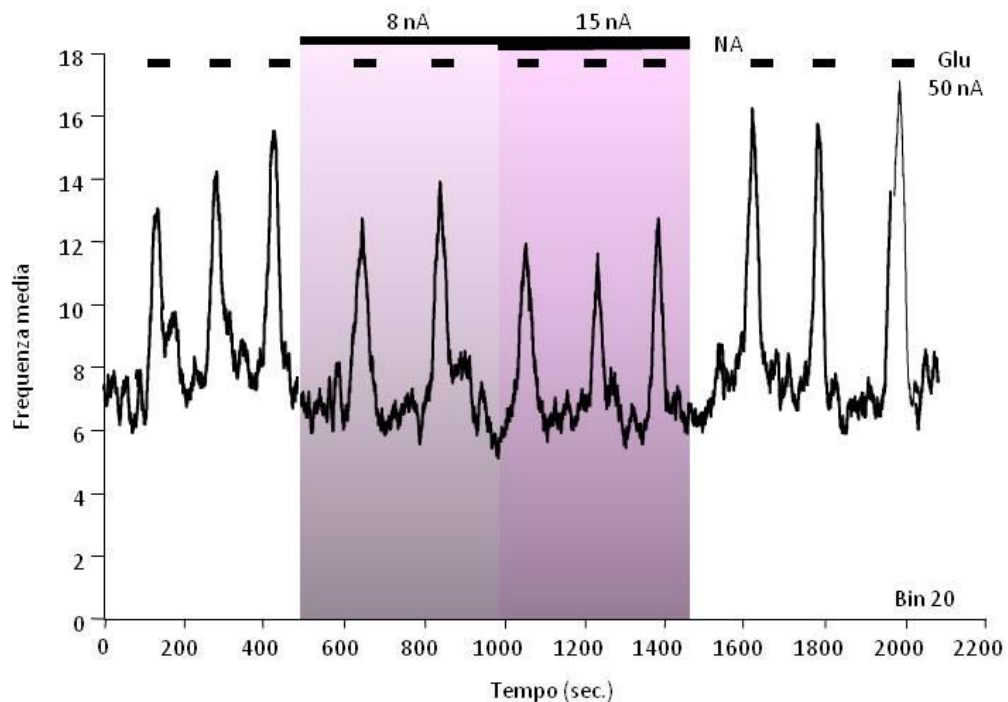


Fig.8 Istogramma di frequenza media di un neurone rubrale localizzato nella porzione magnocellulare dove si osserva l'azione depressoria dose-dipendente esercitata dalla NA sulla risposta al Glu.

Ruolo dei recettori α_2

Al fine di valutare la specificità degli effetti esercitati dalla NA ed effettuare una preliminare identificazione dei recettori coinvolti nella sua azione, sono state condotte delle indagini che richiedevano applicazioni di clonidina e ioimbina, rispettivamente agonista ed antagonista selettivo per i recettori α_2 .

Gli effetti della clonidina sono stati valutati su un totale di quindici neuroni.

La figura 9A illustra la localizzazione dei neuroni saggiati con clonidina, inibiti dall'applicazione dell'agonista α_2 . La figura 9B illustra la localizzazione immunoistochimica dei recettori α_2 noradrenergici nel NR.

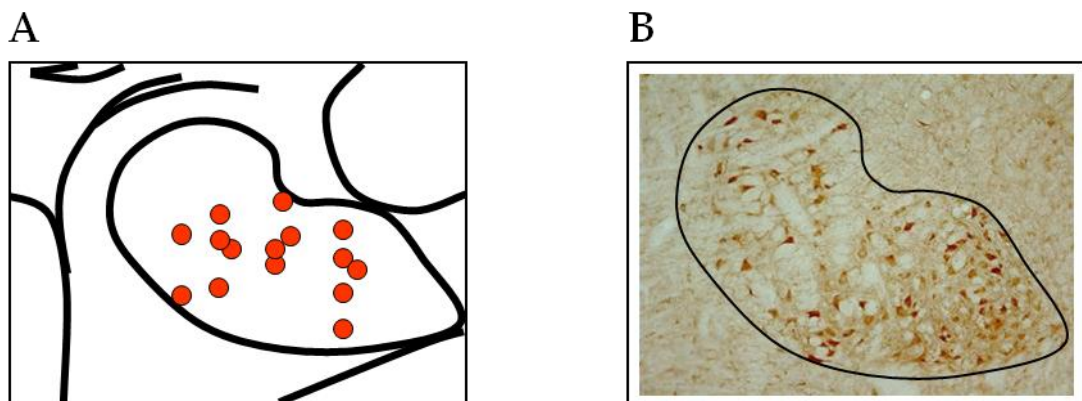


Fig. 9_A. Localizzazione dei neuroni saggiati con clo (n=15) dove è stata osservata l'azione inibitoria dell'agonista α_2 sulla risposta indotta dal Glu.
B. Localizzazione immunoistochimica dei recettori α_2 noradrenergici nel NR (Ingr. 10X).

In questa serie di prove l'agonista riduceva nettamente la responsività al Glu in tutti i casi, mimando quindi l'effetto depressorio della NA.

La figura 10 mostra l'analisi dei valori medi dei parametri N, D e P, prima, durante e dopo la coiontoforesi di clonidina. L'analisi complessiva dei dati mostra una variazione significativa di tutti tre i parametri.

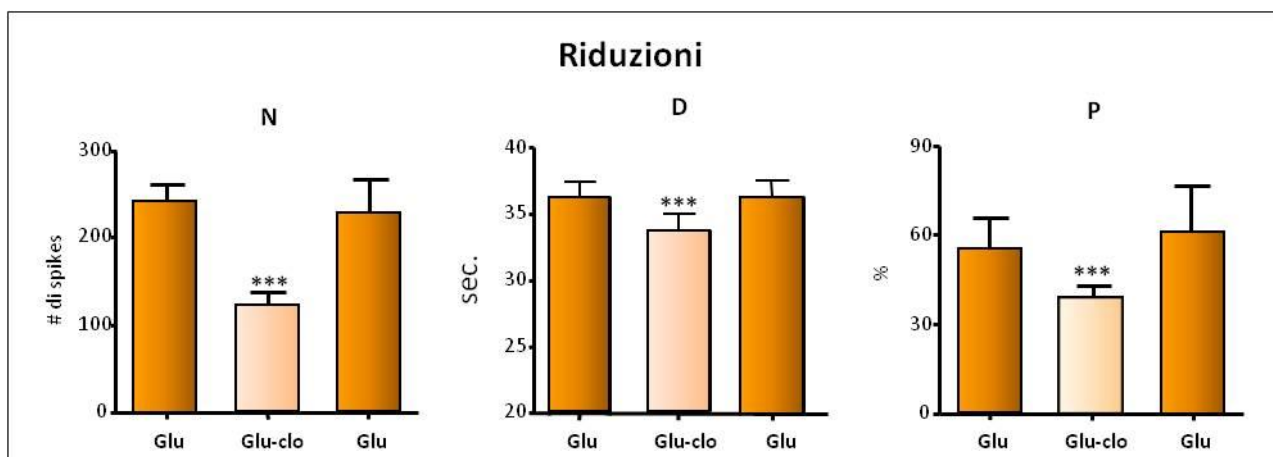


Fig. 10_Variazione dei valori dei parametri N, D e P durante l'azione inibitoria esercitata dalla clo sulla risposta al Glu in neuroni rubrali.

*** $P < 0.0001$

La figura 11 mostra due istogrammi di frequenza di scarica media registrati da due neuroni rubrali localizzati nella porzione parvicellulare (fig. 11A) e nelle porzione magnocellulare (fig. 11B), dove è possibile osservare sia gli effetti indotti dal rilascio di NA e sia quelli indotti dal rilascio di clonidina sulla risposta eccitatoria indotta dal Glu.

In entrambi gli istogrammi è visibile sulla risposta indotta dal Glu, il confronto fra l'effetto esercitato dall'ammina e quello esercitato dall'agonista. Come si può osservare sia la NA che la clonidina producono una riduzione della risposta eccitatoria indotta dal Glu, inoltre, l'applicazione dell'agonista produce un effetto più marcato già a partire dalla prima prova.

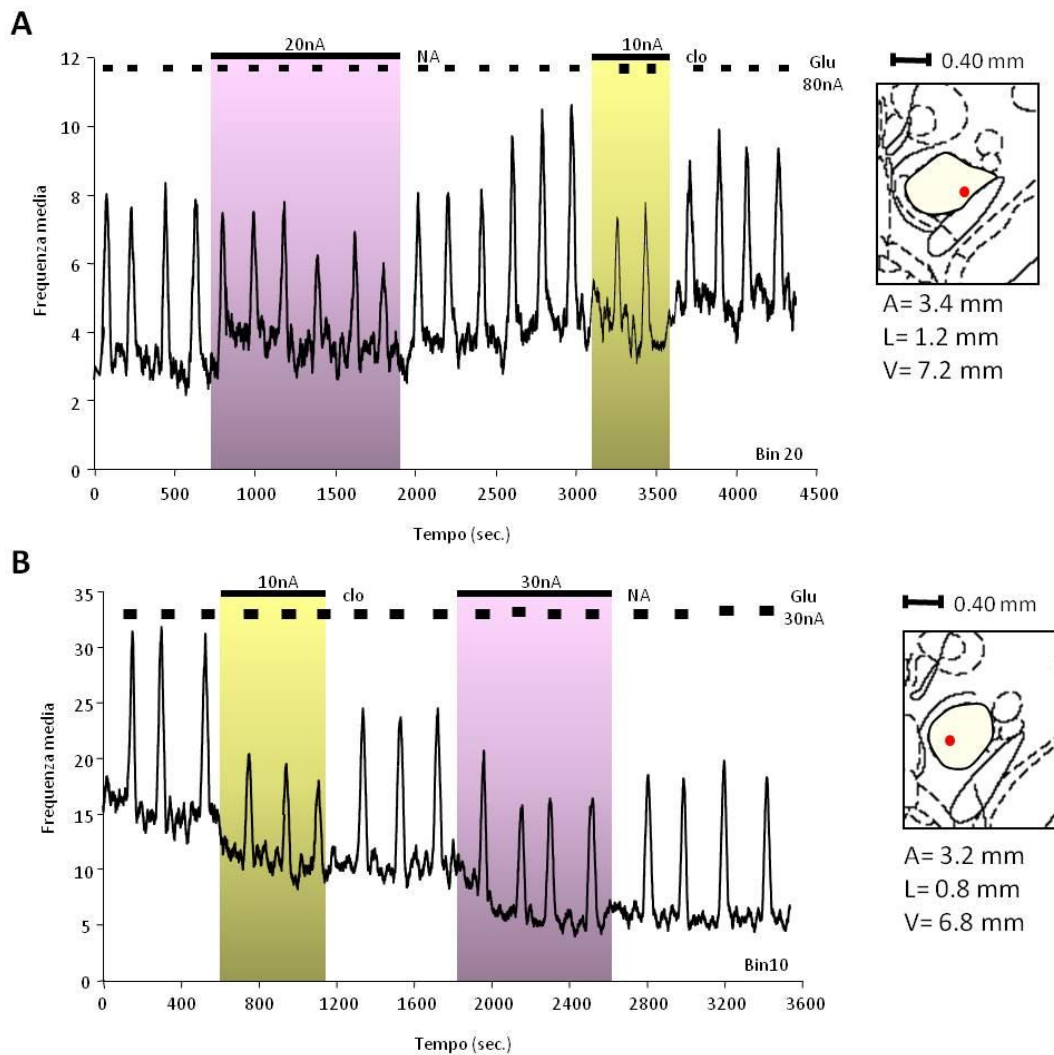


Fig. 11_Istogrammi di frequenza media di due neuroni rubrali localizzati nella porzione magnocellulare (**A**) e parvocellulare (**B**) dove si osserva come l'azione inibitoria esercitata dalla NA sulla risposta al Glu viene mimata dall'applicazione di clo.

La figura 12 mostra l'andamento della frequenza di scarica media di un neurone rubrale localizzato nella porzione magnocellulare a seguito dell'applicazione di Glu, NA e ioimbina. In questo caso, il rilascio di NA provoca una depressione della risposta al Glu successivamente bloccata in presenza di ioimbina che, quindi, riporta la risposta al Glu ai valori di controllo.

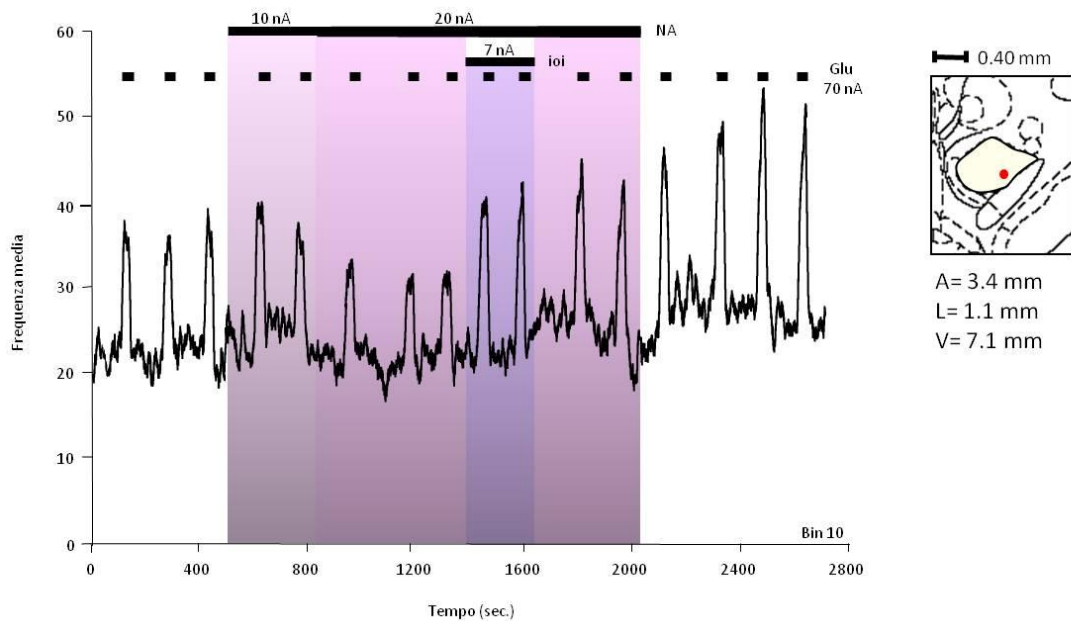


Fig.12 Istogramma di frequenza media di un neurone rubrale localizzato nella porzione magnocellulare dove si osserva come la ioimbina blocca l'effetto inibitorio esercitato dalla NA sulla risposta al Glu.

Ruolo dei Recettori β

Per valutare il ruolo dei recettori β nella modulazione noradrenergica della responsività al Glu in neuroni rubrali, sono state condotte delle indagini che richiedevano l'utilizzo di Isoproterenolo (iso) e Timololo (tim) rispettivamente agonista e antagonista dei recettori β .

Sono stati testati 12 neuroni rubrali nei quali l'applicazione di iso ha determinato soprattutto incrementi della risposta eccitatoria evocata dal Glu. In qualche caso sono stati osservati dei decrementi di tale risposta.

Nella figura 13A viene mostrata la localizzazione dei neuroni saggiati con iso dove è stata riscontrata l'azione inibitoria (▲) ed eccitatoria (●) dell'agonista β sulla risposta indotta dal Glu. La figura 13B e 13C illustra la localizzazione immunoistochimica dei recettori β_1 e β_2 noradrenergici nel NR.

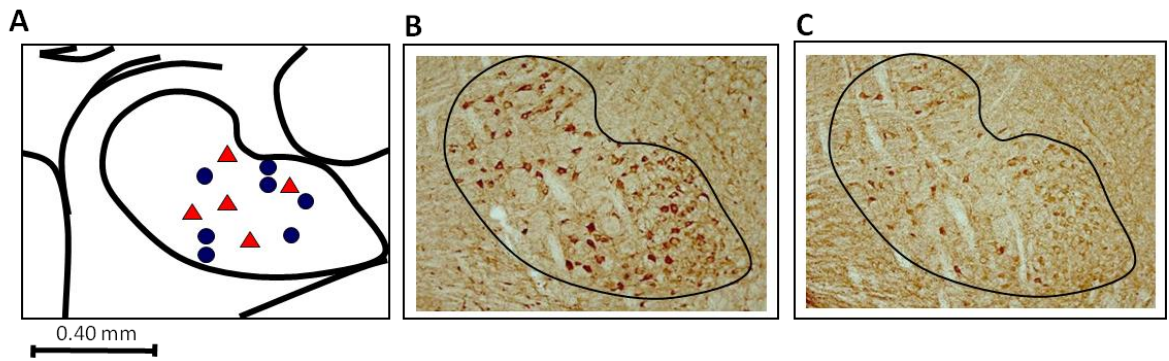


Fig. 13A_Localizzazione dei neuroni saggiati con iso (n=12) dove è stata osservata l'azione inibitoria (●) ed eccitatoria (▲) dell'agonista β sulla risposta indotta dal Glu.

Fig.13B-C_Localizzazione immunoistochimica dei recettori β_1 e β_2 noradrenergici nel NR (Ingr. 10X).

Gli effetti dell' iso sui parametri N, D e P sono mostrati in figura 14A e 14B. L'analisi complessiva mostra una significatività soprattutto nei casi in cui l'applicazione di iso ha potenziato la risposta al Glu.

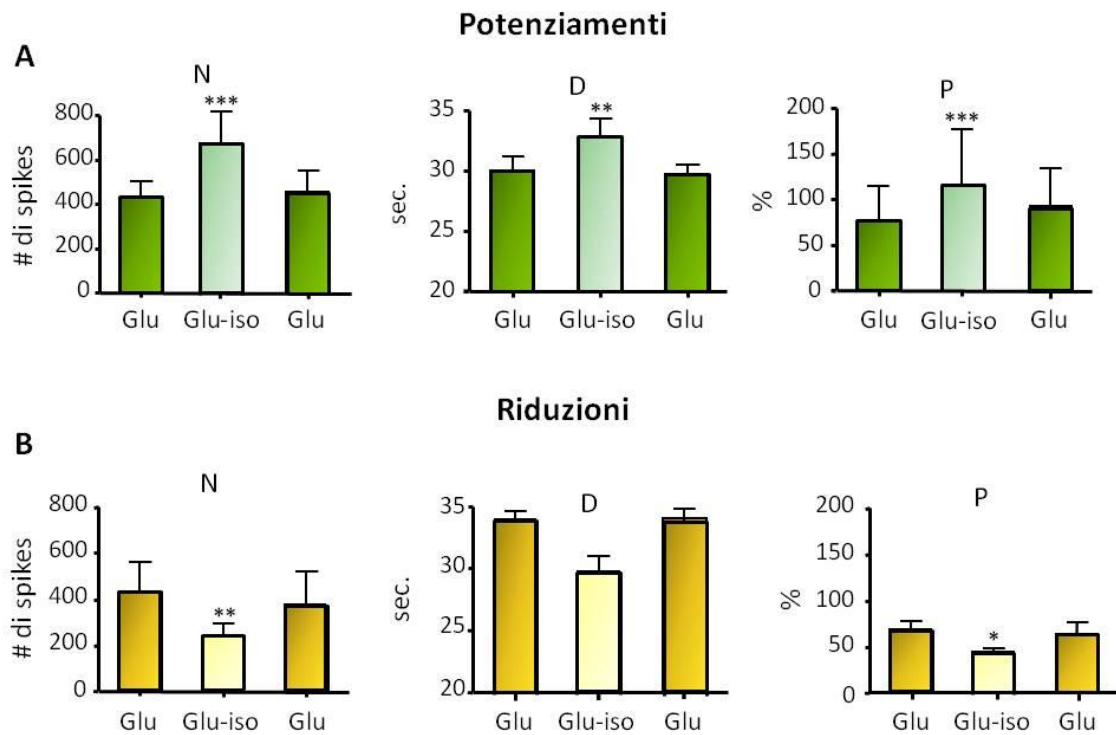


Fig. 14_Variazione dei valori dei parametri N, D e P durante l'azione eccitatoria (A) e inibitoria (B) esercitata dal iso sulla risposta al Glu in neuroni rubrali.

*** P<0.0001 ** P<0.001 * P<0.01

Nella figura. 15 è possibile osservare un istogramma di frequenza media di un neurone rubrale che esibisce un incremento della risposta eccitatoria evocata dal Glu in seguito all'applicazione di iso.

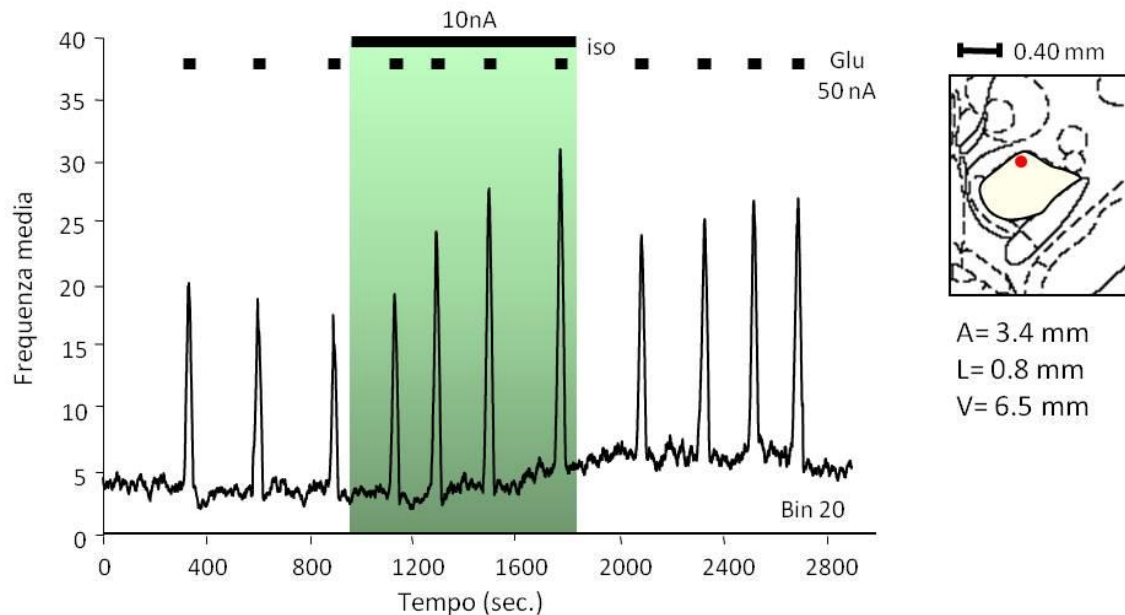


Fig.15_Istogramma di frequenza media di un neurone rubrale localizzato nella porzione parvicellulare dove si osserva l'azione eccitatoria esercitata dall'iso sulla risposta al Glu.

Nella figura. 16, invece, si può osservare l'azione inibitoria esercitata dall'iso sulla risposta al Glu. Appare, inoltre, evidente la relazione dose-dipendenza; aumentando la concentrazione di iso la riduzione della risposta al Glu appare più marcata.

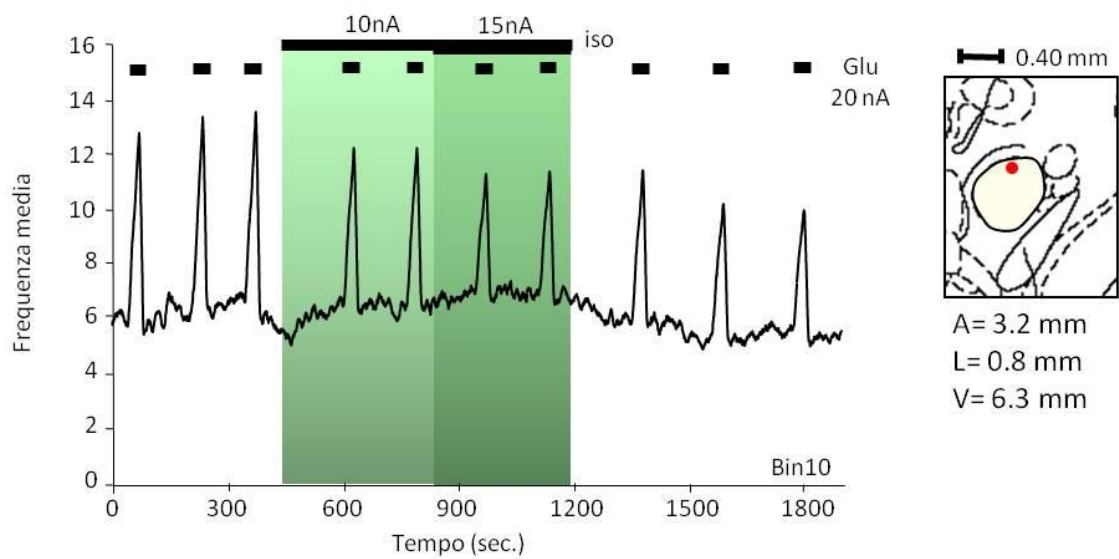


Fig.16_Istogramma di frequenza media di un neurone rubrale localizzato nella porzione parvicellulare dove si osserva l'azione inibitoria esercitata dall'iso sulla risposta al Glu.

La figura 17 mostra un istogramma di frequenza media di un neurone rubrale dopo l'applicazione di Glu, NA e tim.

Dall'andamento di questo istogramma si deduce che il tim non blocca l'effetto inibitorio della NA sulla risposta al Glu ma lo incrementa ulteriormente.

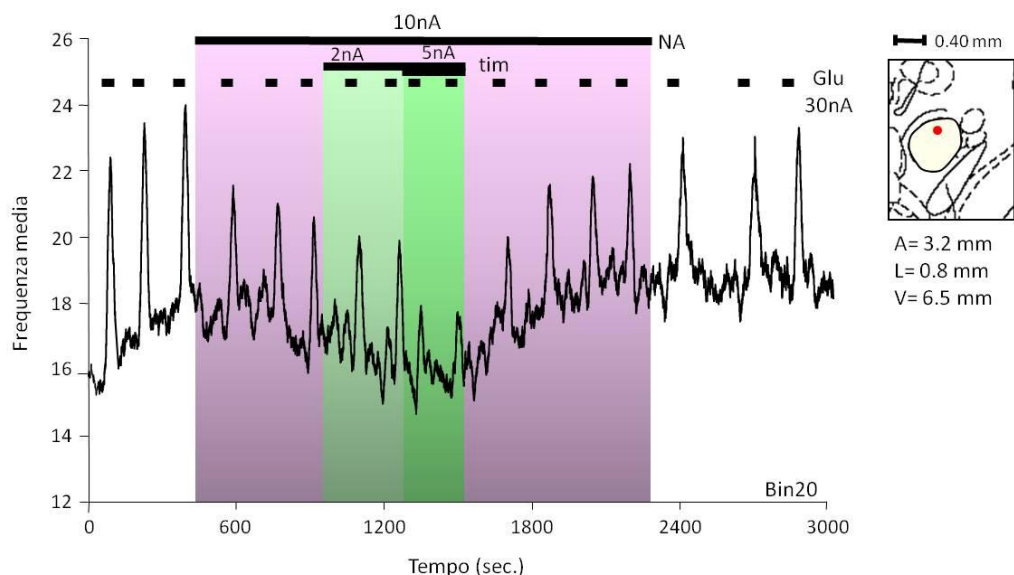


Fig.17_Istogramma di frequenza media di un neurone rubrale localizzato nella porzione parvicellulare dove si osserva come il timololo (tim), un antagonista per i recettori β , non blocca l'effetto inibitorio esercitato dalla NA sulla risposta al Glu ma lo incrementa ulteriormente.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le nostre indagini sperimentali hanno avuto lo scopo di verificare l'azione modulatoria della NA sulla risposta eccitatoria evocata dal Glu in neuroni rubrali. Inoltre, è parso utile valutare il ruolo dei recettori α_2 e β noradrenergici in tale modulazione.

Studi condotti precedentemente in vari modelli animali hanno accertato la presenza di innervazioni noradrenergiche soprattutto nella porzione magnocellulare del NR (Versteeg et al. 1976; Jellinger et al. 1981; Bosler et al. 1983; Huffman et al. 1977). Tali innervazioni provengono soprattutto dal LC ovvero la struttura del SNC che contiene la maggior quantità di neuroni di natura noradrenergica.

Ciranna e collaboratori nel 1996 hanno osservato nel nucleo rosso di ratto che l'applicazione di NA produce sia riduzioni sia potenziamenti della frequenza di scarica di base dei neuroni agendo, rispettivamente, sui recettori α_2 e β .

L'effetto inibitorio della NA è stato osservato anche in altre regioni del SNC oltre al NR, quali la corteccia prefrontale e visiva (Sawaguchi Y. et al. 1990), il tubercolo olfattivo (Guevara-Aguilar R. et al. 1985), il talamo (Pape et al. 1989), il tronco dell'encefalo (Fukada et al. 1990), la corteccia cerebellare (Hoffer BJ. Et al. 1973; Parfitt K.D. 1988) e i nuclei cerebellari.

In altre strutture del SNC quali la corteccia somatosensoriale, il raphe (Couch. 1970) e le cellule del Purkinje della corteccia cerebellare (Marshall K. C. e Tsai W. H. 1988; Parfitt K. D. et al. 1988) la NA è in grado di modificare la frequenza di scarica dei neuroni, generando risposte miste.

Successivi studi hanno dimostrato che la NA è in grado di modulare la risposta indotta da altri neurotrasmettitori, indipendentemente dalla modulazione diretta esercitata dall'amina sulla frequenza di scarica di base di neuroni rubrali così come in altre strutture del SNC (Ciranna et al.2000).

I nostri risultati indicano che la NA modifica la risposta eccitatoria evocata dal Glu in neuroni rubrali inducendo decrementi e in qualche caso incrementi di tale risposta. Inoltre gli effetti indotti dall'applicazione dell'amina sono dose-dipendenti e reversibili.

Gli effetti della NA erano indipendenti dalla modulazione diretta esercitata sulla frequenza di scarica di base, infatti, la modulazione della risposta al Glu è stata osservata in neuroni in cui la frequenza di scarica di base incrementava, decrementava o non subiva alcun effetto in seguito al rilascio di NA.

I diversi effetti che la NA è in grado di produrre sono dovuti all'interazione dell'amina con i diversi tipi di recettori noradrenergici.

Infatti, studi di ibridazione in situ e di immunoistochimica hanno dimostrato la presenza dei recettori α_2 e β a livello del NR (Domyancic et al. 1997; Nicholas et al. 1993b).

Sono state eseguite delle indagini sperimentali in cui si utilizzavano agonisti e antagonisti selettivi per i recettori α_2 e β noradrenergici.

L'applicazione di clonidina, un agonista per i recettori α_2 , ha mimato l'effetto indotto dal rilascio di NA. In particolare, l'applicazione dell'agonista ha determinato una riduzione della risposta eccitatoria evocata dal Glu in tutti i neuroni rubrali saggiati.

A confermare il coinvolgimento dei recettori α_2 nella depressione indotta dalla NA sulla risposta al Glu, sono state effettuate delle indagini nelle quali è stata applicata la ioimbina, antagonista dei recettori α_2 . L'applicazione dell'antagonista bloccava l'effetto inibitorio esercitato dalla NA o dalla clo.

Queste osservazioni indicano che la NA esercita il suo effetto inibitorio sulla responsività al Glu in neuroni rubrali utilizzando i recettori α_2 .

L'applicazione di isoproterenolo, un agonista per i recettori β noradrenergici, ha determinato nella maggior parte dei neuroni rubrali saggiati effetti opposti a quelli esercitati dalla NA. In particolare, il rilascio dell'agonista ha determinato un incremento della responsività al Glu in neuroni rubrali e in alcuni casi decrementi.

L'applicazione di timololo, un antagonista dei recettori β accentua ulteriormente l'effetto inibitorio esercitato dalla NA sulla risposta al Glu. E' evidente che NA esercita effetti inibitori sulla responsività dei neuroni rubrali al Glu interagendo con i recettori α_2 mentre induce effetti eccitatori attivando i recettori β .

La trasmissione glutamatergica è modulata dalla NA anche in altre aree del SNC.

Studi condotti sulle cellule del Purkinje hanno dimostrato che la NA è in grado di deprimere l'eccitazione prodotta dall'applicazione di Glu (Marshall KC e Tsai WH. 1998). Studi condotti sulle cellule del Purkinje, hanno dimostrato che l'amina può indurre anche incrementi della risposta eccitatoria al Glu. Nei casi in cui è stato osservato questo effetto, è stato riscontrato sempre un coinvolgimento dei recettori β noradrenergici (Mori-Okamoto et al. 1988).

Quest'ultimo dato è coerente con l'osservazione che i recettori β siano implicati nell'attenuazione della risposta inibitoria evocata dalla NA sulla responsività dei neuroni rubrali al Glu.

A livello del NR è stata studiata la modulazione noradrenergica sulla risposta inibitoria indotta dal GABA. In particolare, tale effetto può essere potenziato o attenuato dalla coinfusione di NA (Ciranna et al. 2000).

La NA è in grado di modulare l'inibizione GABAergica anche in altre strutture del SNC quali: i nuclei cerebellari profondi (Gould et al. 1997), i neuroni ippocampali (Madison et al. 1988), i neuroni della corteccia somato-sensoriale (Sessler et al. 1995), i neuroni ipotalamici (Sessler et al. 1995) e i neuroni corticali cerebellari (Mitoma et al. 1999; Yeh et al. 1983).

In conclusione, i dati ottenuti dalle indagini sperimentali indicano che la NA è in grado di modulare la risposta eccitatoria del Glu nei neuroni del NR. In particolare, la NA esercita principalmente una riduzione, e in qualche caso un potenziamento, della risposta indotta dal Glu. Inoltre, tale effetto è mediato dai recettori α_2 e β noradrenergici. I recettori α_2 sono implicati nelle riduzioni della risposta eccitatoria, mentre i recettori β nei potenziamenti di tale risposta.

Come già noto, il nucleo rosso è coinvolto nel controllo motorio mediante le afferenze provenienti dalla corteccia cerebrale, dal nucleo dentato e dal nucleo interposito. Questi dati consentono di avanzare l'ipotesi che la NA è in grado di modulare la ritrasmissione dei messaggi che originano da tale struttura e diretti verso il midollo spinale e il cervelletto.

In conclusione, poiché la NA, presenta un'affinità più elevata per i recettori adrenergici di tipo α_2 che per i β , questi risultati suggeriscono che, mentre una

moderata attivazione delle vie noradrenergiche tende a deprimere la responsività al Glu e quindi il firing dei neuroni rubrali, un'attività intensa delle stesse vie avrebbe effetto opposto sulla funzionalità del NR, cioè un potenziamento dell'attività di trasmissione delle informazioni corticali e cerebellari.

BIBLIOGRAFIA

- **Anthony A., Schepelmann S., Guillaume JL., Strosberg AD., Pounder RE., Wakefield AJ.** (1998) *Localization of the beta (beta) 3-adrenoceptor in the human gastrointestinal tract: an immunohistochemical study.* Aliment Pharmacol Ther. Jun; 12(6):519.
- **Aston Jones G., Shipley G., Chouvet M., Ennis M., Van Bockstaele E., Pieribone V., Shiekhatter H., Akaoka G., Drolet B., Astier P., Charlety R., Valentino J., Williams** (1991) *Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology.* Prog. Brain Res. 88:47.
- **Aston Jones G., Shipley G., Chouvet M., Ennis M., Van Bockstaele E., Pieribone V., Shiekhatter H., Akaoka G., Drolet B., Astier P., Charlety R., Valentino J. and Williams.** (1991) *Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology.* Prog. Brain Res. 88: 47.
- **Aston-Jones G., Foote S. L., Bloom F. E.** (1984) *Anatomy and physiology of locus coeruleus neurons: functional implication* In: Ziegler M. G., Lake C. R. (eds) Noradrenaline. Williams & Wilks, Baltimore, pp. 92-116.
- **Barresi M., Caldera M., Grasso C., Li Volsi G., Licata F., Santangelo F.** (2009) *Noradrenergic modulation of neuronal responses to glutamate in the vestibular complex.* Neurosci Lett Oct 30;464(3):173.
- **Berridge CW, Waterhouse BD.** (2003) *The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes.* Brain Res Brain Res Rev. Apr;42(1):33.
- **Bonde C., Noraberg J., Noer H., Zimmer J.** (2005) *Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures.* Neuroscience 136(3):779.

- **Bonde C., Sarup A., Schousboe A., Gegelashvili G., Zimmer J., Noraberg J.** (2003) *Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzoyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions.* Neurochem Int. Sep-Oct; 43(4-5):371.
- **Bosler O., Nieoullon A., Onteniente B., Dusticier N.** (1983) *In vitro autoradiographic study of the monoaminergic innervation of the cat red nucleus; identification of serotonergic terminals.* Brain Res. 259:288.
- **Boyajian C. L., Leslie f. M.** (1987) *Pharmacological evidence for α_2 -adrenoceptor heterogeneity: differential binding properties of [3 H]rauwolscine and [3 H]diazoxan in rat brain.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 1092.
- **Boyajian C. L., Loughlin S. E., Leslie F. M.** (1987) *Anatomical evidence for α_2 -adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3 H]rauwolscine and [3 H]diazoxan in rat brain.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 1079.
- **Bremner J.D., Kristal J.H., Southwick S.M., Charney D.S.** (1996) *Noradrenergic mechanism in stress and anxiety: I. Preclinical studies.* Synapse 23:28.
- **Brodal A.** (1981) *Neurological Anatomy. In relation to clinical medicine.* Oxford University Press.
- **Bruno V., Battaglia G., Copani A., D'onofrio M., Di Iorio P., De Blasi A., Melchiorri D., Flor PJ., Nicoletti F.** (2001) *Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs.* J Cereb Blood Flow Metab. Sep; 21(9):1013.
- **Bruns D., Jahn R.** (1995) *Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles.* Nature Sep 7; 337 (6544):62.
- **Bylund D. B., Blaxall H. S., Iversen L. J., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Lomasney J. W.** (1992) *Pharmacological characteristics of α_2 adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning.* Mol. Pharmacol. 42: 1.
- **Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R. J.R., Trendelenburg U.** (1994) *International*

Union of Pharmacology nomenclature of adrenergic receptors. Pharmacol. Rev. 46:121.

- **Caughell K. A., Flumerfelt B. A.** (1977). *J. Comp. Neurol.* 176: 295.
- **Chapman AG.** (1998) *Glutamate receptors in epilepsy.* Prog Brain Res. 110:371.
- **Charney D.S., Woods S.W., Price L.H., Goodman W.K., Glazer W.M., Heninger G.R.** (1990) *Noradrenergic dysregulation in panic disorder.* In Ballenger J.C. (ed) *Neurobiology of panic disorder.* Liss New York, pp 91.
- **Chouch J. R.** (1970) *Responses neurons in the raphe nuclei to serotonin, norepinephrine and acetylcholine and their correlation with on excitatory synaptic input.* Brain Res. 19: 137.
- **Ciranna L., Licata F., Li Volsi G., Santangelo F.** (1996) *Noradrenaline modifies the spontaneous spiking activity of the red nucleus neurons in the rat by activation of α_2 - and β -adrenoceptors.* Brain Res. 743:284.
- **Ciranna L., Licata F., Li Volsi G., Santangelo F.** (2000) *Neurotransmitter-mediated control of neuronal firing in the red nucleus of the rat: reciprocal modulation between Noradrenaline and GABA.* Exp. Neuro. 163:253.
- **Condè F.** (1988) *Cerebellar projections to the red nucleus of the cat.* Behav Brain Res. Apr-May; 28(1-2):65-8.
- **Conde F., Conde H.** (1980) **Demonstration of a rubrothalamic projection in the cat, with some comments on the origin of the rubrospinal tract.** Neuroscience 5(4):789.
- **Couch J.R.** (1970) *Responses neurons in the raphe nuclei to serotonin, norepinephrine and acetylcholine and their correlation with on excitatory synaptic input.* Brain Res. 19:137.
- **Courville J.** (1956) *Somatotopical organization of the projection from the nucleus interpositus anterior of the cerebellum to red nucleus. An experimental study in the cat with silver impregnation methods.* Expin. Brain Res. 2:191.
- **Cuello A., C. Horn A. S., Mackay A.V., Iversen L. L.** (1973) *Letter: catecholamines in the median eminence: new evidence for a major noradrenergic input.* Nature; 243:465.

- **Curet O. and Montegny C.** (1988) *Electrophysiology characterization of adrenoreceptors in the rat dorsal hippocampus. I. Receptors mediating the effects of microiontophoretically applied norepinephrine.* Brain Res. 475: 35.
- **De Paermentier F., Chetham SC., Crompton MR., Horton RW.** (1989) *Beta-adrenoceptors in human brain labeled with [3H] dihydroalprenolol and [3H] CGP 12177.* Eur J Pharmacol. Aug 29; 167(3):397.
- **Dessy C., Moniotte S., Ghisdal P., Havaux X., Noirhomme P., Balligand JL.** (2004) *Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization.* Circulation. Aug 24; 110(8):984.
- **Di Mauro M, Bronzi D, Li Volsi G, Licata F, Lombardo P, Santangelo F.** (2008) *Noradrenaline modulates neuronal responses to GABA in vestibular nuclei.* Neuroscience. Jun 2;153(4):1320.
- **Difazio MC, Hollingsworth Z., Young AB., Penney JB Jr.** (1992) *Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brain.* Neurology. Feb; 42(2):402.
- **Domyancic A.V., Morilak.** (1997) *Distribution of alpha-adrenergic 1A receptor mRNA in the brain visualized by in situ hybridization.* J. Comp. Neurol. 386:358.
- **Flumerfelt BA.** (1978) *Organization of the mammalian red nucleus and its interconnection with the cerebellum.* Experientia. Sep 15; 34(9):1178.
- **Flumerfelt B. A., Gwyn D. G.** (1973) Anat. Rec. 175: 321.
- **Flumerfelt BA., Gwyn DG.** (1974) *Proceedings: The red nucleus of the rat: its organization and interconnexions.* J Anat. Nov; 118(Pt 2):374.
- **Foote S. L., Bloom F. E., Aston Jones G.** (1983) *Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity.* Physiol Rev 63:844.
- **Fukada H. and Ono H.** (1990) *Control of spinal motor system by descending noradrenergic neuron.* Nippon Yakurigaku-Zasshi 96: 1.
- **Fumagalli G., Clementi F., Nicosia S., Paoletti R.** *Farmacologia generale e molecolare.* Utet.

- **Gibson AR, Houk JC, Kohlerman NJ.** (1985) *Magnocellular red nucleus activity during different types of limb movement in the macaque monkey.* J Physiol Jan;358:527.
- **Gibson AR, Houk JC, Kohlerman NJ.** (1985) *Relation between red nucleus discharge and movement parameters in trained macaque monkeys.* J Physiol. Jan;358:551.
- **Giuffrida R, Li Volsi G, Perciavalle V.** (1988) *Influences of cerebral cortex and cerebellum on the red nucleus of the rat.* Behav Brain Res. Apr-May; 28(1-2):109.
- **Gould T. J., Adams C. E. and Bickford P. C.** (1997) *Beta-adrenergic modulation of GABA-ergic inhibition in the deep cerebellar nuclei of F344 rats.* Neuropharmacology 36:75.
- **Granholm A.C., Palmer M.R.** (1988) *Electrophysiological effects of norepinephrine on Purkinje neurons in intraocular cerebellar graft: alpha- vs beta- specificity.* Brain Res. Sep 6; 459(2):256.
- **Guevara-Aguilar R., Solano–Flores LP., Garcia-Diaz DE., Aguillar-Baturoni HU. And Wayner MJ.** (1985) *Effects of dopamine and norepinephrine on neuronal activity of the olfactory tubercle.* Brain Res. Bull. 15:665.
- **Hinrichsen CF., Watson CD.** (1983) *Brain stem projection to the facial nucleus of the rat.* Brain Behav Evol.; 22(2-3).153.
- **Hoffer B.J., Siggins G.R., Oliver A.P., Bloom F.E.** (1973) *Activation of the pathway from locus coeruleus to rat cerebellar Purkinje neurons: pharmacological evidence of noradrenergic central inhibition.* J. Pharmac. Exp. Ther. 184:553.
- **Houk JC.** (1989) In: *Models of Brain Function*, ed by Cotteril. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. pp. 309.
- **Hu HJ., Alter BJ., Carrasquillo Y., Qiu CS., Gereau RW 4th.** (2007) *Metabotropic glutamate receptor 5 modulates nociceptive plasticity via extracellular signal-regulated kinase-Kv4.2 signaling in spinal cord dorsal horn neurons.* J Neurosci Nov 28; 27(48):13181.

- **Huffmann R.D., Davis R.** (1977) *Pharmacology of the brachium conjunctivum: red nucleus synaptic system in the baboon*. J. Neurosci. Res. 3:175.
- **Huisman AM., Kuypers HG., Conde F., Keizer K.** (1983) *Collaterals of rubrospinal neurons to the cerebellum in rat. A retrograde fluorescent double labeling study*. Brain Res. Apr 4; 264(2):181.
- **Humphrey D. R., Gold R., Reed D. J.** (1984) *Sizes, laminar and topographic origins of cortical projections to the major divisions of the red nucleus in the monkey*. J. Comp. Neurol. 225: 75.
- **Humphrey D. R., Reed D. J.** (1976) *Cells of origin of cortico-rubral projections from the arm area of primate motor cortex and their synaptic actions in the red nucleus*. Brain Res. 110: 162.
- **Humphrey DR., Gold R., Reed DJ.** (1984) *Size, laminar and topographic origins of cortical projection to the major division of the red nucleus in the monkey*. Comp Neurol. May 1; 225(1):75.
- **Iwahori N., Nakamura K.** (1991) *A golgi study on the red nucleus in the mouse*. Okajimas Folia Anat Jph. May; 68(1):71.
- **Jellinger K., Reynolds G.P., Riederer P.** (1981) *Dopamina and noradrenaline in the magno- and parvocellular portion of the red nucleus*. In P. Riederer and E Usdin (ed), Transmitter biochemistry of human brain tissue, Mcmillan, Oxford 115.
- **Jellinger K., Reynolds G. P., Riederer P.** (1981) *Dopamina and noradrenaline in the magno- and parvocellular portions of red nucleus*. In P. Riederer and E Usdin (ed), Transmitter biochemistry of human brain tissue, Mcmillan, Oxford 115.
- **Jones B. E., Pare M., Beaudet A.** (1986) *Retrograde labeling of neurons in the brainstem following injections of [3H]choline into the rat spinal cord*. Neurosci. 18: 901.
- **Jones C. R., Palacios J. M.** (1991) *Autoradiography of adrenoceptors in rat and human brain: alpha-adrenoceptors and idazoxan binding sites*. Prog. Brain Res. 88: 271.

- **Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M.** (2003) *Principles of Neural Science*.
- **Katsumaru H., Muracami F., Wu J.Y., Tsukahara N.** (1986) *Sprouting of GABAergic synapses in the red nucleus after lesions of the nucleus interpositus in the cat*. J. Neurosci., 6: 2864.
- **Katsumaru H., Muracami F., Wu J.Y., Tsukahara N.** (1984) *GABAergic intrinsic interneurons in the red nucleus of the cat demonstrated with combined immunocytochemistry and anterograde degeneration methods*. Neurosci. Res., 1: 35.
- **Keifer J., Houk J.C.** (1994). *Motor function of the cerebellorubrospinal system*. Physiol. Rev. 74: 509.
- **Kennedy PR., Gibson AR., Houk JC.** (1986) *Functional and anatomic differentiation between parvicellular and magnocellular regions of red nucleus in the monkey*. Brain Res. Jan 29;364(1):124.
- **Kerkerian L, Nieoullon A, Dusticier N.** (1983) *Topographic changes in high-affinity glutamate uptake in the cat red nucleus, substantia nigra, thalamus, and caudate nucleus after lesions of sensorimotor cortical areas*. Exp Neurol. Sep;81(3):598.
- **Kerkerian L, Nieoullon A., Dusticier N.** (1983) *Topographic changes in high affinity glutamate uptake in the cat red nucleus, substantia nigra, thalamus and caudate nucleus after lesions of sensorimotor areas*. Exp. Neurol., 81: 598.
- **Kew JN., Kemp JA.** (2005) *Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology*. Psychopharmacology (Berl) Apr; 179(1):4.
- **King JS., Dom RM., Conner JB., Martin GF.** (1973) *An experimental light and electron microscopic study of cerebellorubral projections in the opossum, Didelphis marsupialis virginiana*. Brain Res. Mar 30;52:61.
- **Kolta A. and Reader T.A.** (1989) *Modulatory effects of catecholamines on neurons of the rat visual cortex: single cell iontophoretic studies*. Can. J. Physiol. Pharmac. 67:615.

- **Kusama T., Otami K., Kawana E.** (1966) *Projections of the motor, somatic sensory, auditory and visual cortices in cats.* In Progress in Brain Res. Ed Tokizane and Scad, Amstrerdam, vol. 21A pp.292.
- **Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG Jr.** (1967) *Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines.* Nature. May 6;214(5088):597-8.
- **Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ.** (1967) *Differentiation of receptors responsive to isoproterenol.* Life Sci. Nov 1;6(21):2241-9.
- **Langer SZ, Enero MA.** (1974) *The potentiation of responses to adrenergic nerve stimulation in the presence of cocaine: its relationship to the metabolic fate of released norepinephrine.* J Pharmacol Exp Ther. Dec;191(3):431.
- **Lewis D. A.** (2001) *The catecholamine innervation of primate cerebral cortex.* In M. V. Solanto, A. F. T. Arnest, F. X. Castellanos (ed), Stimulant Drugs and ADHA: Basic and Clinical Neuroscience oxford university Press, New York, pp. 77-103.
- **Li Volsi G, Licata F, Fretto G, Mauro MD, Santangelo F.** (2001) *Influence of serotonin on the glutamate-induced excitations of secondary vestibular neurons in the rat.* Exp Neurol. Dec;172(2):446.
- **Licata F., Li Volsi G., Ciranna L., Maugeri G. and Santangelo F.** (1998) *5-Hydroxytryptamine modifies neuronal responses to glutamate in the red nucleus of the rat.* Exp. Brain Res. Jan. 118(1):61.
- **Licata F., Li Volsi G., Di Mauro M., Fretto G., Ciranna L. and Santangelo F.** (2001) *Serotonin modifies the neuronal inhibitory responses to gamma-aminobutyric acid in the red nucleus: a microiontophoretic study in the rat.* Exp. Neurol. 167(1): 95.
- **Licata F., Li Volsi G., Maugeri G., Ciranna L., Santangelo F.** (1993) *Effects of noradrenaline on the firing rate vestibular neurons.* Neuroscience 53:149.
- **Lodish, Baltimore** (2000) *Molecular cell biology. G Protein-Coupled Receptors and Their Effectors.* NEW YORK,. 4th ed.
- **Loescher W.** (1998) *Pharmacology of glutamate receptor antagonist in the Kindling model of epilepsy.* Prog Neurobiol. Apr; 54(6):721.

- **Mabuchi M., Kusama T.** (1966) *The cortico-rubral projection in the cat.* Brain Res. 2:254.
- **Madison D. and Nicoll R. A.** (1998) *Norepinephrine decrease synaptic inhibition in the rat hippocampus.* Brain Res. 442:131.
- **Marshall KC. And Tsai WH.** (1988) *Noradrenaline induced short and long duration potentiation of glutamate excitation of cultured purkinje neurons.* Can J. Physiol. Jun; 66(6): 848.
- **Masu M., Tanabe K., Tsuchida R., Shigemoto R., Nakanishi S.** (1991) *Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor.* Nature. 349:760.
- **Mitoma H. and Konishi S.** (1999) *Monoaminergic long-term facilitation of GABA-mediated inhibitory transmission at cerebellar synapses.* Neuroscience 88: 871.
- **Mitrofanis J.** (2002) *Distinctive patterns of connectivity between the zona incerta and red nucleus of the rats.* Anat Embryol. Jul; 205(4):283.
- **Molnar E., Isaac JT.** (2002) *Developmental and activity dependent regulation of ionotropic glutamate receptors at synapses.* ScientificWorldJournal. Jan 5; 2:27.
- **Monaghan DT.** (1991) *Agonist and antagonist preferring N-methyl-D-aspartate receptors and independent activation of their ion channel.* In Meldrum BS., Meldrum F., Simon RP., Woods JH. (Eds.). Excitatory Amino Acids, Raven, New York, pp. 203.
- **Monaghan DT., Olverman HJ., Nguyen L., Watkins JC., Cotman CW.** (1988) *Two classes of N-methyl-d-aspartate recognition site differential distribution and differential regulation by glycine.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9836.
- **Moore R.Y.** (1980) *The reticular formation: monoamine neuron system.* In Hobson J. A Brazier M. A. B. (ed). The reticular formation Revisited. 67.
- **Moore R.Y.** (1982) *Catecholamine neurons system in brain.* Ann. Neurol. 12:321.

- **Moore R.Y., Bloom F.E.** (1979) *Central Catecholamine neuron system: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine system*. Ann. Rev. Neurosci. 2:113.
- **Mori-Okamoto J., Tatsuno J.** (1988) *Effects of noradrenaline on the responsiveness of cultured cerebellar neurons to excitatory amino acids*. Brain Res. 448:259.
- **Nakanishi S.** (1992) *Molecular Diversity of glutamate receptors and implication for brain functions*. Science 258:597.
- **Nicholas A.P., Hokefelt T., Pieribone V.A.** (1996) *The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization*. Trend Pharmacol. Sci. 17:245.
- **Nicholas A.P., Pieribone V.A., Hokfelt T.** (1993) *Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study*. Neuroscience 56:1023.
- **Nicholas A.P., Pieribone V.A., Hokfelt T.** (1993b) *Distributions of mRNA for alpha-2 adrenergic receptors subtypes in rat brain: an in situ hybridization study*. J. Comp. Neurol. 328:575.
- **Nieoullon A., Dusticier N.** (1981) *Decrease in choline acetyltransferase and in high affinity glutamate uptake in the red nucleus of the cat after cerebellar lesions*. Neurosci. Lett., 24: 267.
- **Nieoullon A., Vuillon-Cacciuttuolo G., Dusticier N., Kerkerian L, André D., Bosler O.** (1988) *Putative neurotransmitters in the red nucleus and their involvement in postlesion adaptive mechanisms*. Behav Brain Res. 1988 Apr-May;28(1-2):163.
- **Nieuwenhuys R.** (1985) *Chemoarchitecture of the brain*. Springer, Berlin pp. 119-30 e 115.
- **Nyberg- Hansen, Brodal A.** (1964) *Site and mode of termination of rubro-spinal fibres in the cat. An experimental study with silver impregnation methods*. J. Anat. 98: 235.

- **Olson L., Fuxe K.** (1971) *On the projection from the locus coeruleus noradrenaline neurons: the cerebellar innervations.* Brain Res.28:165.
- **Padel Y.** (1993) *Magnocellular and parvocellular red nuclei. Anatomico-functional aspects and relations with cerebellum and other nerve centres.* Rev Neurol 149(11):703.
- **Pagosian VI.** (1975) *Neuronal organization of the large-cell segment of the cat's red nucleus.* Arkh Anat Gistol Embriol. Mar; 68(3):71.
- **Palacios J. M., Wamsley J.K.** (1984) *Catecholamine receptors. In Handbook of chemical Neuroanatomy.* Elsevier, Amsterdam Vol. 3, pp. 325.
- **Pape H.C., McCormick D.A.** (1989) *Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current.* Nature 340:715.
- **Parfitt K.D., Freedman R., Bickford-Wimer P.C.** (1988) *Electrophysiological effects of locally applied noradrenergic agents at cerebellar Purkinje neurons: receptor specificity.* Brain Res 462:242.
- **Patt S., Gerhard L., Zill E.** (1994) *A golgi study on the red nucleus in man.* Histol Histopathol. Jan; 9(1):7.
- **Paxinos G.** (1995) *The rat nervous system.* Academy Press.
- **Paxinos G. and Watson C.** (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Compact third edition Accademic Press.
- **Paxinos G., Watson C.** (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Compact third edition Accademic Press.
- **Pin JP, Acher F.** (2002) *The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology.* Curr Drugs Target CNS Neurol Disord. Jun; 1(3):297.
- **Pompeiano O., Brodal.A.** (1957) *Experimental demonstration of a somatotopical origin of rubro-spinal fibres in the cat.* J Comp Neurol. 108:225.
- **Purves, Dale.** (2001) *The Biogenic Amines.* Sunderland (MA), 2nd ed.

- **Ralston DD.** (1994) *Cerebellar terminations in the red nucleus of Macaca fascicularis: an electron-microscopic study utilizing the anterograde transport of WGA:HRP.* Somatosens Mot Res.;11(2):101.
- **Redmond D. E., Huang Y. H., Snyder D., Maas J.** (1976) *Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey Macaca Arctoides.* Brain Res. 116: 502.
- **Reid JM., Flumerfelt BA., Gwyn DG.** (1975) *An ultrastructural study of the red nucleus in the rat.* Comp Neurol. Aug 1; 162(3):363.
- **Reid JM., Gwyn DG., Flumerfelt BA.** (1975) *A cytoarchitectonic and Golgi study of the red nucleus in the rat.* Comp Neurol. Aug 1; 162(3):337.
- **Rhoades R., Pflanzner R.** 2004. *Fisiologia Generale e Umana.* 2a ed.
- **Rinvik E., Walberg F.** (1963) *Demonstration of somatotopically arranged cortico-rubral projection. In the cat. An experimental study with silver methods.* J Comp. Neurol.120:393.
- **Roger M., Cadusseau J.** (1987) *Anatomical evidence of a reciprocal connection between the posterior thalamic nucleus and the parvocellular division of the red nucleus in the rat. A combined retrograde and anterograde study.* Neuroscience. May; 21(2): 573.
- **Rorick-Kehn LM, Johnson BG., Burkey JL., Wright RA., Calligaro DO., Marek GJ., Nisenbaum ES., Catlow JT., Kingston AE., Giera DD., Herin MF., Monn JA., McKinzie DL., Schoepp DD.** (2007) *Pharmacological and pharmacokinetic properties of a structurally novel, potent and selective metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist: in vitro characterization of agonist (-) - (1R,4S,5S,6S) -4-amino - 2 -sulfonylbicyclo [3.1.0] -hexane -4,6 - dicarboxylic acid (LY404039).* J Pharmacol Exp Ther. Apr; 321(1):308-17.
- **Sadun A.** (1975) *Differential distribution of cortical terminations in the cat red nucleus.* Brain Res. Nov 28;99(1):145.
- **Sawagushi Y., Matsumara M., Kubota K.** (1990) *Catecholaminergic effects on neural activity related to a delayed response task in monkey prefrontal cortex.* J. Neurophysiol. 63:1385

- **Sessler F. M., Liu W., Kirifides M.L., Mouradian R. D., Lin R. C. S. and Waterhouse B. D.** (1995) *Noradrenergic enhancement of GABA-induced input resistance changes in layer V regular spiking pyramidal neurons of rat somatosensory cortex.* Brain Res. 675: 171.
- **Sheich J.Y., Leong S.K. and Wong W.C.** (1983) J Comp. Neurol.214:79.
- **Shokunbi MT., Hrycyshyn AW., Flumerfelt BA.** (1986) *A horseradish peroxidase study of the rubral and cortical afferents to the lateral reticular nucleus in the rat.* Comp Neurol. Jun 15; 248(3):441.
- **Stern K.** (1938) *Note on the nucleus ruber magnocellularis and its efferent pathway in man.* Brain; 61:284.
- **Swanson L. W.** (1976) *The locus coeruleus: a cutoarchitectonic Golgi and immunohistochemical study in the albino rat.* Brain Res. 110: 39.
- **Swanson L. W., Artman B. K.** (1975) *The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the localization of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-b-hydroxylase.* J. Comp. Neurol. 163. 467.
- **Swenson R. S., Castro A.J.** (1983) *The afferent connections of the inferior olivary complex in rats. An anterograde study using autoradiographic and axonal degeneration techniques.* Neurosciece 8(2):259.
- **Ten Donkelaar H.J.** (1988) *Evolution of the red nucleus and rubrospinal tract.* Behav. Brain Res Apr-May 28; (1-2):9.
- **Unemoto H., Sasa M., Takaori S.** (1985) *A noradrenaline-induced inhibition from locus coeruleus of nucleus accumbens neuron receiving input from hippocampus.* Jap. J.Pharmac. 39:223.
- **Ungerstedt U.** (1971) *Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain.* Acta. Physiol. Scan. Suppl. 367:1.
- **Vernon Lin M.D., Ph.D. Diana D., Cardenas M.D., M.H. Nancy C. Cutter M.D., P.T. Frederick S. Frost M.D., Margaret C. Hammond M.D., Inder Perakash M.D., Robert Waters M.D., 2002.** Spinal Cord Medicine.

- **Versteeg, D.H.G., Van der Gugten J., De Jong W., Palkovits M.** (1976) *Regional concentrations of noradrenaline and dopamine in rat.* Brain Res. 113:563.
- **Von Euler US.** (1946) *Sympathin in adrenergic nerve fibres.* J Physiol. Sep 18;105.
- **Voogd J.** (1964) *The cerebellum of the cat. Structure and Connection.* Assen : Van Gorcum, p 215.
- **Watkins JC., Jane DE.** (2006) *The glutamate story.* Br Pharmacol. Jan; 147 Suppl 1:S100.
- **Winson J., Dahl D.** (1985) *Action of the norepinephrine in the dentate gyrus. II. Ionophoretic studies.* Expl Brain. Res. 59:497.
- **Woodward D.J., Moises H.C., Waterhouse B.D., Yen H.H., Chen J.E.** (1991) *The cerebellar norepinephrine system: inhibition, modulation and gating.* Progress in Brain Res. 88:331.
- **Woolley ML., Pemberton DJ., Bate S., Corti C., Jones DN.** (2007) *The mGlu2 but not the mGlu3 receptor mediates the actions of the mGluR2/3 agonist, LY379268, in mouse models predictive of antipsychotic activity.* Psychopharmacology (Berl) Dec 5.
- **Yeh H. H., Woodward D. J.** (1983) *Beta-1 adrenergic receptors mediate noradrenergic facilitation of Purkinje cell responses to gamma-aminobutyric acid in cerebellum of rat.* Neuropharmacology 22(5):629.
- **Zarate-Lagunes M, Gu WJ, Blanchard V, Francois C., Muriel MP., Mouatt-Prigent A., Bonici B., Parent A., Hartmann A., Yelnik J., Boehme GA., Pradier L., Moussaoui S., Faucheux B., Raisman-Vozari R., Agid Y., Brice A., Hirsch EC.** (2001) *Parkin immunoreactivity in the brain of human and non-human primates: an immunohistochemical analysis in normal conditions and in Parkinsonian syndromes.* J Comp Neurol. Apr 2; 432(2): 184.
- **Zhu CZ., Wilson SG., Mikusa JP., Wismer CT., Gauvin DM., Lynch JJ 3rd., Wade CL., Decker MW., Honore P.** (2004) *Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities.* Eur J Pharmacol. Dec 15; 506(2):107.