



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



# Università degli studi di Cagliari

Dipartimento di scienze della vita e dell'ambiente - Sezione di Neuroscienze

Scuola di dottorato in Neuroscienze e Scienze morfologiche

Dottorato in Neuroscienze - Ciclo XXVI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/11 BIO /14 MED/25

## **Isolamento sociale nel ratto adolescente: differenze di genere nella sensibilità allo stress ed influenza sulla generazione successiva**

Tutor: Prof.ssa Mariangela Serra

Dottorando: Dott.ssa Anna Garau

Coordinatore: Prof. Walter Fratta

Anno Accademico: 2012-2013

# INDICE

Introduzione .....	4
Lo stress.....	4
Sensibilità allo stress nel periodo perinatale e nell'adolescenza .....	18
Differenze di genere nella risposta allo stress.....	25
Ruolo dell'allopregnanolone durante la gravidanza.....	32
Isolamento sociale.....	37
Obiettivo della tesi .....	42
Materiali e metodi.....	43
Animali e isolamento sociale.....	43
Figli di isolati e di controlli.....	43
Osservazione del comportamento materno .....	44
Test dell'Elevated Plus-Maze.....	45
Test di Vogel .....	46
Foot-shock stress.....	47
DST: Dexamethasone Suppression Test .....	48
Dosaggio degli steroidi .....	48
Western Blot.....	49
Statistica .....	52
RISULTATI .....	53
Effetto dell'isolamento sociale sui livelli basali cerebrocorticali e plasmatici di AP e sullo stato emozionale nei ratti maschi.....	53
Effetto dell'isolamento sociale sull'attività basale dell'asse IIS nei ratti maschi.....	54
Effetto dell'isolamento sociale nella risposta allo stress acuto indotto dal foot-shock nei ratti maschi. ...	56
Effetto dell'isolamento sociale sui livelli basali cerebrocorticali e plasmatici di AP e sullo stato emozionale nei ratti femmina.....	57
Effetto dell'isolamento sociale sull'attività basale dell'asse IIS nei ratti femmina.....	59
Effetto dell'isolamento sociale sui livelli ippocampali dei GR e degli MR nei ratti femmina. ....	60
Effetto dell'isolamento sociale nella risposta allo stress acuto indotto dal foot-shock nei ratti femmina. ...	61
Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici di AP, CTS, 17 $\beta$ -estradiolo, ossitocina e vasopressina durante la gravidanza ed il post partum. ....	62

Effetto dell'isolamento sociale sulla qualità delle cure materne. ....	63
Effetto transgenerazionale dell'isolamento sociale sui livelli basali di AP. ....	64
Effetto transgenerazionale dell'isolamento sociale sulla sensibilità ad uno stress acuto.....	64
Effetto transgenerazionale dell'isolamento sociale sulla sensibilità ad uno stress cronico.....	65
Discussione .....	67
Bibliografia.....	72

# INTRODUZIONE

## LO STRESS

La prima definizione di “stress” fu data da Hans Selye nel 1936. Osservando i mammiferi, lo studioso notò che rispondevano a stimoli di diversa natura con una reazione fisiologica molto simile, caratterizzata dallo stato di attivazione dell’asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) e dalla conseguente produzione di glucocorticoidi. Ne concluse che lo stress è una reazione aspecifica dell’organismo ad una molteplicità di fattori di diversa natura (fisici, biologici e psico-sociali), definiti “stressors”, che tendono ad alterare il normale equilibrio omeostatico dell’organismo.

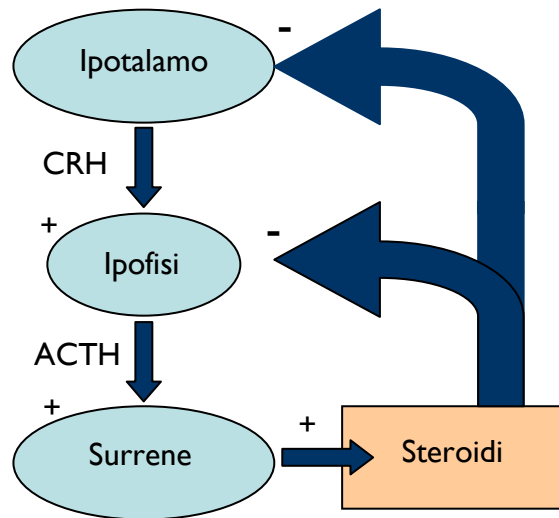
In risposta allo stress, l’organismo mette in atto una serie di meccanismi atti a ristabilire l’omeostasi. Queste risposte possono essere di tipo comportamentale (aumento di vigilanza, allerta, attenzione), vegetativo (aumento dell’attività cardiaca, della frequenza respiratoria, diminuzione dell’attività dei sistemi gastro-intestinale, urinario, riproduttivo etc.) ed endocrino (produzione di corticosteroidi e catecolamine che attraverso meccanismi differenti rendono l’organismo più resistente e ne migliorano le prestazioni).

Se di breve durata, lo stress è definito acuto. Se si protrae nel tempo viene definito cronico. Se lo stress che si presenta ripetutamente nel tempo è sempre della stessa natura si parla di stress omotipico, in caso contrario di stress eterotipico.

Quando un organismo è sottoposto ad una situazione stressante, è necessaria un’azione immediata. L’attività di più sistemi in tutto il corpo e del cervello deve essere coordinata per sviluppare una risposta allo stress (risposta di lotta o fuga). In periferia questo si traduce in un rapido aumento del flusso sanguigno ai muscoli e al cuore, mentre il sistema immunitario è inibito. Nel cervello tutti i processi cognitivi devono essere rivolti ad una risposta di adattamento alla situazione potenzialmente pericolosa, tutti i processi che non sono immediatamente necessari saranno inibiti.

Dunque, la risposta allo stress implica una duplice azione: il coinvolgimento del sistema endocrino, con un aumento della secrezione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) dall'ipofisi e di corticosterone dal surrene e un aumento dell'attività del sistema nervoso autonomo. Di conseguenza la risposta adattativa dell'individuo ai diversi "stressors" e la sua attivazione comporta dei cambiamenti sistemici e comportamentali che migliorano la capacità omeostatica aumentando la possibilità di sopravvivenza. Tuttavia, condizioni di stress cronico fisico e/o psicosociale possono portare a degli squilibri del sistema nervoso centrale, immunitario, cardiovascolare, rendendo l'organismo più suscettibile alla patologia. Infatti, la deviazione dalle caratteristiche ideali di questa risposta può dipendere dall'intensità e dalla durata dello stress.

L'organismo ha la capacità di mantenere la stabilità attraverso un cambiamento (allostasi). Sebbene i meccanismi allostatici siano protettivi nel breve periodo, a lungo termine possono insorgere dei problemi (specialmente se i processi allostatici diventano cronici o inefficienti); il costo di questi processi è proprio il carico allostatico. Se questi cicli allostatici prolungano la loro durata o non si interrompono, il carico finisce per divenire un "sovraccarico" allostatico che logora le cellule, i tessuti e gli organi, compromettendone le funzioni. Un elevato carico allostatico potrebbe derivare da un'iperattivazione cronica del sistema dello stress (McEwen, 1998a; McEwen and Stellar, 1993) e portare ad una serie di conseguenze negative sulla salute a lungo termine, come il diabete, l'ipertensione, il cancro e i disturbi cardiovascolari (McEwen, 1998a,b).



**Figura 1 - Rappresentazione schematica dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene**

L'IIS è la centrale di controllo e rappresenta il principale coordinatore delle risposte, metaboliche e comportamentali, dell'organismo. Questo sistema neuroendocrino stress-reattivo aiuta l'organismo ad adattarsi a maggiori richieste e a mantenere l'omeostasi dopo lo sforzo, ma è anche di vitale importanza per sostenere il normale funzionamento fisiologico. Il prodotto finale di questo processo nell'uomo è il cortisolo, che ha una vasta gamma di effetti fisiologici nel corpo; potenzialmente ogni singola cellula nucleata del corpo potrebbe essere un bersaglio per il cortisolo. Il cortisolo gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo, mobilitando risorse per fornire energie. Questo aiuta a superare l'aumento della domanda metabolica in seguito a sfide più difficili da affrontare. Esso regola o impatta su altri importanti sistemi fisiologici, come il sistema immunitario, l'asse simpatico-surrenale-midollare, il sistema cardio-vascolare, nonché processi affettivi e cognitivi. L'ipotalamo produce l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH), che agendo sulle cellule corticotrope dell'adenoipofisi promuove il rilascio dell'ACTH, il quale regola la secrezione di glucocorticoidi da parte della corteccia surrenale; nell'uomo il glucocorticoide principale è il cortisolo, mentre nel ratto è il corticosterone (CTS). Questi ultimi presentano un meccanismo di autocontrollo che permette di mantenere costante la loro concentrazione a livello fisiologico. Infatti, una volta immessi nel circolo

sanguigno, esercitano un meccanismo a feed-back negativo agendo a livello dell'ippocampo, dell'ipotalamo e dell'ipofisi e inibendo quindi la produzione di CRH e ACTH (Figura 1).

Il CRH è prodotto dai neuroni parvocellulari del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo. Sono stati identificati due recettori a cui si lega: il recettore di tipo 1 (CRH-R1) e di tipo 2 (CRH-R2). Il CRH-R1 è particolarmente espresso nell'ipofisi e nella corteccia e media prevalentemente le risposte e l'azione dell'IIIS; il CRH-R2, sebbene presente in alcune aree cerebrali, è più espresso nel cuore, nella muscolatura scheletrica e nel tratto gastrointestinale (Kishimoto et al. 1995; Lovenberg et al. 1995). Il CRH rilasciato nell'eminenza mediana, attraverso il circolo portale raggiunge le cellule corticotrope dell'adenoipofisi che, in risposta, rilasciano l'ACTH, un peptide di 39 amminoacidi, derivante dalla proopiomelanocortina (POMC). L'ACTH ha come bersaglio la zona corticale della ghiandola surrenale e stimola la formazione degli ormoni steroidei.

La via biosintetica che porta alla sintesi degli steroidi richiede come primo evento la traslocazione del colesterolo dalla membrana esterna mitocondriale a quella interna e questo passaggio rappresenta la tappa limitante della sintesi degli steroidi. La regolazione di questo trasporto è mediata dall'attivazione della "Translocator protein" (TSPO). Il legame dell'ACTH con i recettori surrenalici comporta un incremento intracellulare di adenosina monofosfato ciclico (cAMP); tale incremento determina l'attivazione del peptide DBI (Diazepam Binding Inibitor). Il DBI attiva il TSPO permettendo l'ingresso del colesterolo nel mitocondrio (Figura 2).

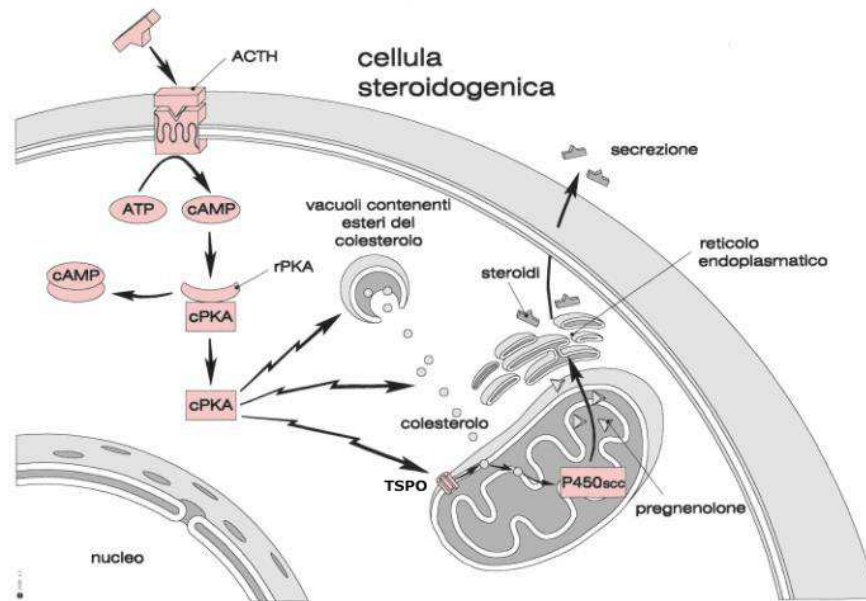
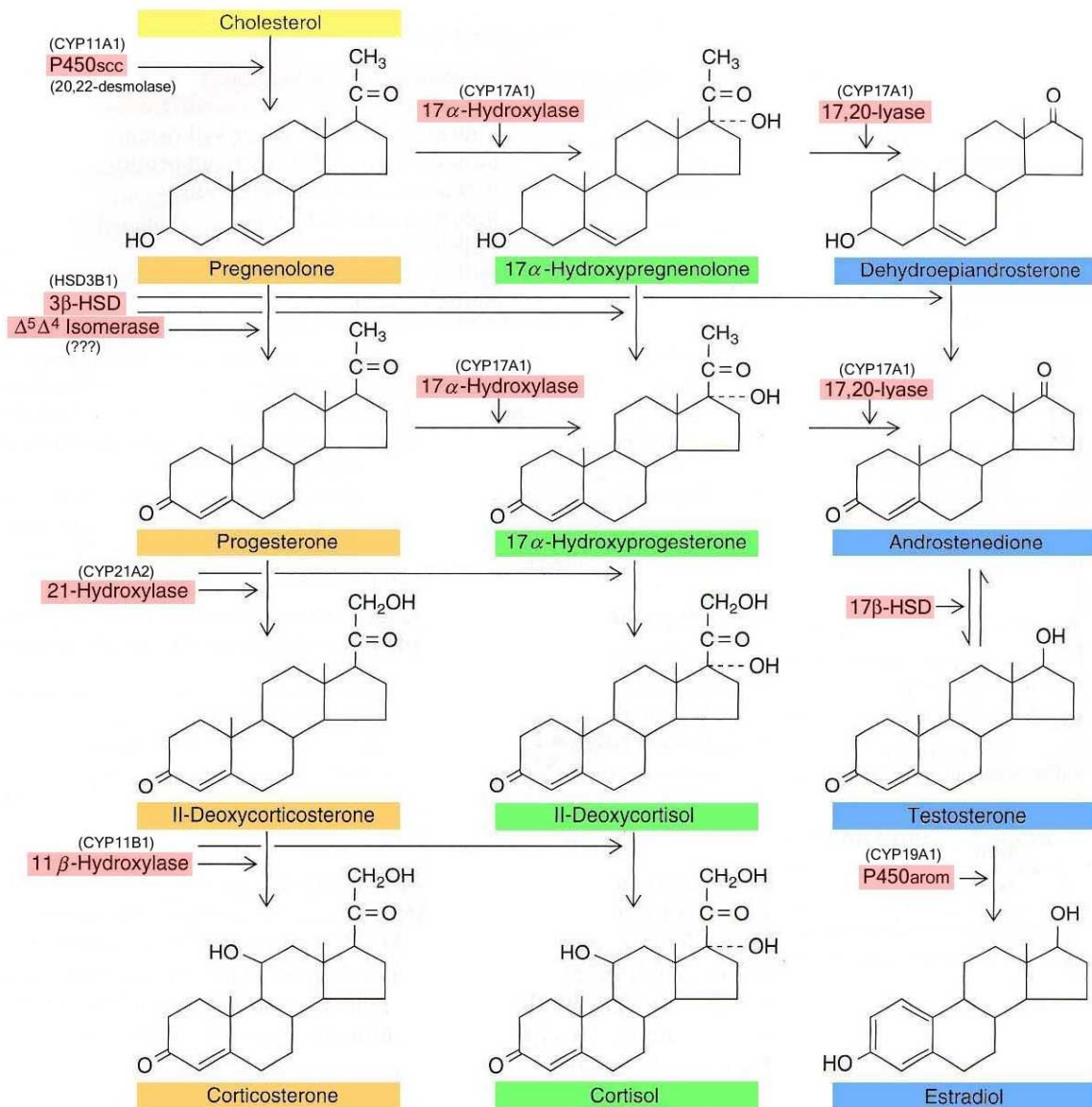


Figura 2 - Regolazione e siti cellulari della steroidogenesi

E' stato proposto che nel trasferimento del colesterolo all'interno del mitocondrio eserciti un ruolo importante la Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). Questa è una proteina di 30 KDa localizzata nella membrana mitocondriale esterna, la cui estremità C-terminale contiene un dominio idrofobico che potrebbe essere implicato nel legame con il colesterolo sul lato citoplasmatico. La proteina StAR viene contemporaneamente clivata da una proteasi specifica e la parte restante penetra nel mitocondrio bloccando l'ulteriore passaggio di colesterolo e di conseguenza l'ulteriore sintesi di steroidi.





**Figura 3 – Rappresentazione grafica della steroidogenesi a partire dal colesterolo**

Il colesterolo, una volta trasportato all'interno del mitocondrio, viene convertito in pregnenolone (PRE) attraverso una reazione catalizzata dal citocromo P450<sub>scc</sub> che scinde la catena laterale del carbonio 20 del colesterolo (Figura 3). Il PRE migra dai mitocondri al reticolo endoplasmatico e può essere convertito, attraverso due diverse vie biosintetiche, in:

- Progesterone (PROG), mediante l'azione dell'enzima 3β-idrossisteroide deidrogenasi (3β-HSD), il quale, a sua volta, viene metabolizzato in CTS attraverso

l'azione di due enzimi, il primo rappresentato dalla 21-idrossilasi (CYP21A2) ed il secondo dalla 11 $\beta$ -idrolasi (CYP11B1)

- 17 $\alpha$ -idrossipregnenolone, mediante l'azione dell'enzima 17 $\alpha$ -idrossilasi (CYP17A1), che viene poi metabolizzato in cortisolo attraverso la formazione di due intermedi, il 17 $\alpha$ -idrossiprogesterone (tramite l'enzima CYP17A1) ed il deossicortisolo (tramite l'enzima CYP11B1).

Il 17 $\alpha$ -idrossipregnenolone può essere metabolizzato, attraverso l'azione di una liasi (CYP17A1), in deidroepiandrosterone (DHEA), il quale viene metabolizzato in androstenedione (CYP17A1) e successivamente in testosterone attraverso la 17 $\beta$ -HSD. Quest'ultimo può essere convertito in estradiolo attraverso l'azione di un'aromatasi (CYP19A1).

Il progesterone può essere inoltre convertito in:

- 5 $\alpha$ -diidroprogesterone (5 $\alpha$ -pregnan-20-one o 5 $\alpha$ -DHP) dall'enzima 5 $\alpha$ -reduttasi, il quale, attraverso l'enzima 3 $\alpha$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\alpha$ -HSD) si trasforma in allopregnanolone (3 $\alpha$ -idrossi-5 $\alpha$ -pregnan-20-one o AP)
- 11-deossicorticosterone (DOC) per azione dell'enzima P450c21, il quale viene successivamente convertito in diidrodossicorticosterone (DHDOC) dalla 5 $\alpha$ -reduttasi ed infine in tetraidrodossicorticosterone (5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-one o THDOC) ad opera della 3 $\alpha$ -HSD (Figura 4).

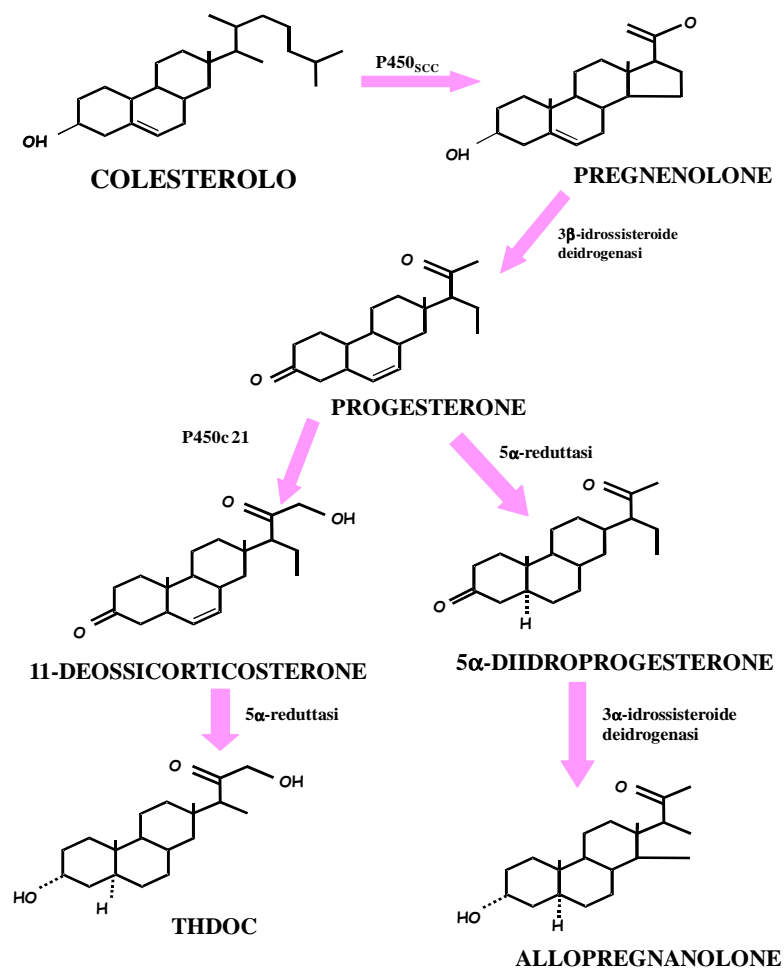


Figura 4 - Biosintesi degli steroidi neuroattivi

I due metaboliti del progesterone, AP e THDOC, sono tra i più potenti ed efficaci modulatori allosterici positivi endogeni del recettore  $GABA_A$ , in quanto facilitano l'interazione tra l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) e le benzodiazepine ai loro siti di legame sul recettore, potenziando la corrente al cloro ( $Cl^-$ ) e conseguentemente la trasmissione GABAergica (Majewska et al., 1986). L'evidenza che i neurosteroidi hanno la capacità di attivare il recettore  $GABA_A$ , sia potenziando il legame del GABA (Harrison et al., 1987) sia, a dosi più alte, andando ad aprire direttamente il canale (Puia et al., 1990), dimostra come questi composti giochino un ruolo cruciale nella modulazione della soglia dell'eccitabilità neuronale e in molte funzioni cerebrali.

La somministrazione sistemica o intracerebroventricolare di dosi farmacologiche di AP e THDOC induce un effetto ansiolitico, anticonvulsivante, ipnotico, sedativo e

miorilassante, visibile sia nell'uomo che nell'animale (Majewska et al., 1986 e 1992; Harrison et al., 1987; Lambert et al., 1995).

La capacità con la quale insorgono questi effetti suggerisce che siano mediati da un'azione diretta di questi ormoni su specifici recettori di membrana escludendo un meccanismo genomico.

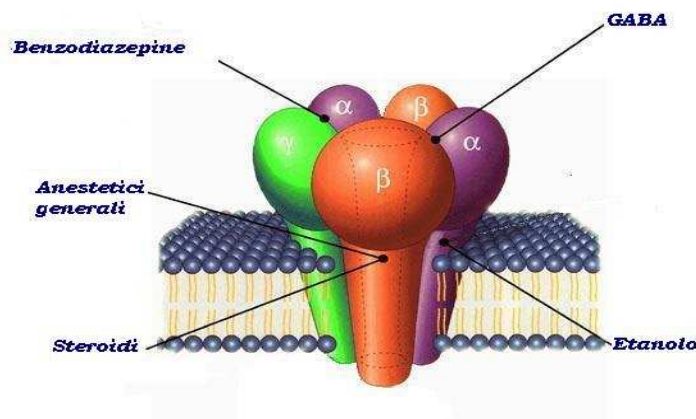


Figura 5 - Rappresentazione schematica del recettore GABA<sub>A</sub>

Il recettore GABA<sub>A</sub> (Figura 5) è un eteropentamero facente parte della famiglia dei recettori canale che include il recettore della glicina, il recettore nicotinico per l'acetilcolina e il recettore 5-HT per la serotonina; in particolare il recettore GABA<sub>A</sub> è associato ad un canale permeabile allo ione cloro e regola la maggior parte della neurotrasmissione inibitoria del cervello. Si conoscono 19 tipi di subunità che presentano circa il 30-40% di omologia nella loro sequenza amminoacidica (Seeburg et al., 1990) e vengono divise in 8 classi denominate con le lettere dell'alfabeto greco: α (6 isoforme), β (tre isoforme), γ (tre isoforme), δ, ε, π, ρ, Θ (tre isoforme). La combinazione di queste subunità porta alla formazione di diversi recettori GABA<sub>A</sub> aventi profili farmacologici diversi e localizzazione cerebrale differente. Nel sistema nervoso dei mammiferi la maggior parte dei recettori GABA<sub>A</sub> è costituita dalla combinazione di due subunità α e due subunità β che si assemblano assieme ad una subunità δ o γ per formare il pentamero.

L'AP, come già detto precedentemente, facilita l'interazione del GABA e delle benzodiazepine con i loro siti di legame (Majeswska et al., 1986), inducendo una modificazione allosterica del recettore  $GABA_A$  con conseguente aumento del potenziamento della trasmissione GABAergica (Puia et al., 1990, Lambert et al., 1985).

Studi recenti hanno identificato due specifici siti di legame a livello del complesso recettoriale  $GABA_A$ . Il primo, localizzato sulla subunità  $\alpha$ , media la capacità degli steroidi di potenziare l'attività dello ionoforo  $Cl^-$  attraverso una facilitazione allosterica dell'azione del GABA; il secondo, localizzato in corrispondenza delle regioni di interfaccia tra la subunità  $\alpha$  e quella  $\beta$ , quando viene attivato, modula direttamente la funzione del canale del cloro (Hosie et al. 2006).

Una scoperta fondamentale per capire il ruolo fisiologico degli ormoni steroidei è data dall'evidenza che, nel cervello, alcune cellule gliali (soprattutto gli oligodendrociti) sono capaci di sintetizzare steroidi "ex novo" a partire dal colesterolo, e i neuroni di metabolizzare precursori (pregnanolone, progesterone) che provengono dalla periferia. La dimostrazione che il sistema nervoso centrale (SNC) sintetizza steroidi e contiene a livello di membrana "bersagli" funzionali per una rapida azione di questi ormoni, ha aperto un nuovo entusiasmante capitolo nello studio della farmacologia degli ormoni steroidei e della funzione dei recettori  $GABA_A$ . Questi ormoni sarebbero una componente fondamentale dei meccanismi fisiologici rilevanti nel controllo dell'attività delle aree cerebrali coinvolte nella regolazione delle emozioni e più in generale dell'eccitabilità neuronale.

E' importante sottolineare che è stato dimostrato che l'AP è capace inoltre di modulare la trascrizione dei geni per le subunità del recettore  $GABA_A$  (Follesa et al., 1998, Concas et al., 1998). Infatti, le fluttuazioni fisiologiche di AP durante il ciclo mestruale, la gravidanza e la menopausa, inducono variazioni nella struttura e nella funzione del recettore  $GABA_A$ .

(Follesa et al., 1998, Concas et al., 1998, Smith et al., 1998; Fenelon e Herbison, 1996). Pertanto, alterazioni nella regolazione della secrezione periferica e centrale di questi ormoni, alterando il pattern di espressione del recettore GABA<sub>A</sub>, modificano la soglia di eccitabilità delle cellule.

Diversi studi hanno dimostrato che le concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC sono modificate in alcuni modelli sperimentali di stress acuto. E' stato visto che l'esposizione degli animali a stimoli stressanti come il foot-shock, l'inalazione di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), il nuoto forzato e la stessa manipolazione precedente al sacrificio, inducono un rapido aumento delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di steroidi neuroattivi (Purdy e coll., 1991, Barbaccia e coll., 1996,1997). Questo effetto è simile a quello dei farmaci ansiogenici come le  $\beta$ -carboline o come l'isoniazide, un inibitore della sintesi del GABA (Horton et al., 1979), che riducono la trasmissione GABAergica inducendo uno stato d'ansia sia nell'animale che nell'uomo (Barbaccia et al., 1996).

Il meccanismo attraverso cui lo stress determina l'aumento della concentrazione plasmatica e cerebrale di AP e THDOC è mediato dall'attivazione dell'IAS. E' stato dimostrato che in animali castrati e surrenectomizzati, cioè privati dei principali organi steroidogenici periferici, il foot-shock non è in grado di modificare le concentrazioni cerebrali di AP e THDOC (Barbaccia et al., 1997).

Come precedentemente accennato, i corticosteroidi, una volta rilasciati dal surrene nel circolo sanguigno, esercitano i loro effetti attraverso l'interazione con i loro recettori. Sia nel cervello che in periferia, sono espressi due tipi distinti di recettori per i corticosteroidi: il recettore per i glucocorticoidi (GR) e il recettore per i mineralcorticoidi (MR). Nel cervello, gli MR si trovano principalmente nell'ippocampo, nella struttura limbica, nel setto, nell'amigdala (Reul and de Kloet, 1985) e mediano il controllo dell'attività basale dell'asse. I GR sono presenti in tutto il cervello, con maggiore densità nel sistema limbico (ippocampo e setto) e nei neuroni parvocellulari del nucleo

paraventricolare ipotalamico (Reul and De Kloet, 1985). Essi, inoltre, sono presenti nei neuroni monoaminergici ascendenti del tronco cerebrale. I GR si attivano con elevati livelli plasmatici di corticosteroidi, raggiunti dopo un evento stressante o durante il picco di impulsi ultradiani; la loro funzione è quella di sostenere gli stress e superarli (de Kloet and Reul., 1987). Gli MR posseggono un'affinità per i corticosteroidi molto elevata; infatti, essi vengono saturati in condizioni basali ed è stato postulato che possano essere coinvolti nella definizione della soglia di reattività agli stress (Joëls et al., 2008). L'equilibrio tra le azioni mediate da MR e GR è indispensabile per determinare la risposta agli stress di un individuo. Alterazioni di questo equilibrio possono determinare una disregolazione del sistema di risposta allo stress e aumentare la vulnerabilità ai disturbi ad esso legati (de Kloet et al., 2005;. McEwen, 2008). Sia gli MR che i GR agiscono da fattori di trascrizione in seguito al legame con il ligando. Essi risiedono nel citoplasma e, quando legano l'ormone, il complesso ligando-recettore trasloca nel nucleo e regola la trascrizione dei geni bersaglio (Beato and Sanchez-Pacheco, 1996). L'insorgenza degli effetti genomici è lenta, le prime risposte fisiologiche dovrebbero essere visibili con un ritardo di almeno 15 minuti, o spesso nell'ordine di ore (Haller e coll., 2008). Ciò è in netto contrasto con la realtà di alcuni degli effetti dei corticosteroidi nei neuroni, di cui, i più veloci, sono stati osservati in pochi secondi o minuti (Tabella 1, Groeneweg et al., 2011).

Overview signal partners of central nongenomic corticosteroid effects					
Receptor	Signal partners	Required for	Time	System	References
mMRa	ERK 1/2	Aumento del rilascio del glutamato	5 min	Topo, ippocampo	[1]
mMRa	G-proteins	Inibizione delle correnti al K <sup>+</sup>	5 min	Topo, ippocampo	[1]
mGRb	cAMP, PKA, CREB	Stimolazione della consolidazione della memoria	24 h	Ratto, in vivo	[2, 3]
mGRb	cAMP, PKA	Inibizione della working memory	60 min	Ratto, in vivo	[3]
mGRb	Ca <sup>++</sup> , PLC	Riduzione del rilascio di vasopressina	20 min	Ratto, ipotalamo	[4, 5]
cGRc	PKA	Inibizione delle correnti ATP-indotte	Secondi	Ratto, radice dorsale del ganglio	[6]

References: [1] (Olijslagers et al., 2008), [2] (Roozendaal et al., 2010), [3] (Barsegyan et al., 2010), [4] (Liu et al., 1995), [5] (Liu and Chen, 1995), [6] (Liu et al., 2008).

a Membrane-associated MR. b Membrane-associated GR. c Cytoplasmic GR.

Tabella 1- da Groeneweg et al., 2011

In accordo, più recentemente è stata identificata una sotto-popolazione di MR e GR localizzati sulla membrana plasmatica (Karst et al., 2005; Liu et al., 2008). È importante sottolineare che gli MR di membrana hanno un'affinità per i glucocorticoidi più bassa rispetto agli MR genomici. Dal momento che gli MR di membrana sono strutturalmente identici a quelli nucleari, è stato ipotizzato che la diversa affinità mostrata dagli MR di membrana per gli agonisti sia legata ad una modificazione nella loro conformazione in seguito all'associazione con la membrana (Norman et al., 2004). Tali recettori sembrerebbero essere soggetti ad un trafficking tra citoplasma e membrana indotto da particolari situazioni fisiologiche o stressanti (Karst et al., 2005; Linthorst et al., 2000). Poco si sa sulla dinamica del trafficking, ma pare che, almeno per quanto riguarda i GR, potrebbe essere un meccanismo molto simile a quello per i recettori agli estrogeni (Dominguez and Micevych, 2010).



Come già detto, gli MR e i GR sono coinvolti nella risposta allo stress. Gli MR sono importanti per il mantenimento dell'integrità e della stabilità neuronale, come dimostrato dall'evidenza che l'apoptosi che si manifesta nel giro dentato dell'ippocampo, in seguito a surrenectomia, è revertita da basse concentrazioni di corticosterone sufficienti ad attivare solo gli MR nucleari (Nair et al., 2004). I GR modulano la risposta allo stress riportando la cellula in condizioni basali e facilitando il recupero, promuovendo il metabolismo energetico e, in concerto con ammine e neuropeptidi, favorendo il consolidamento della memoria (Roozendaal et al., 2009). D'altra parte, i GR e gli MR di membrana sembrerebbero essere importanti per una risposta rapida del feedback negativo che il corticosterone indurrebbe soprattutto a livello ippocampale ed ipotalamico (Tasker and Herman, 2011). L'attivazione dei GR, localizzati sui neuroni CRH, e dei GR e degli MR a livello ipotalamico, evoca un complesso meccanismo che coinvolge i sistemi glutammatergico, GABAergico ed endocannabinoergico al fine di ripristinare l'omeostasi, inibendo la secrezione del CRH. Attraverso un circuito a feedback negativo (rapido) il prodotto finale inibisce la prima tappa della via che l'ha generato.

## **SENSIBILITÀ ALLO STRESS NEL PERIODO PERINATALE E NELL'ADOLESCENZA**

Nell'uomo il periodo perinatale, che va dal concepimento al primo anno di vita circa, è una fase fondamentale per lo sviluppo fisico e psichico dell'individuo. In questo periodo il concepito forma il suo corpo, costruisce i suoi primi rapporti, avvia le sue prime comunicazioni e le esperienze che gli consentiranno di muovere i primi passi nella vita. Siamo nella fase in cui vengono messe le basi per la realizzazione delle condizioni di salute e malattia, dello stato di futuro benessere e di malessere attraverso le esperienze, maturate in buona parte nell'ambiente naturale materno.

Poiché la vita psicologica di un individuo ha inizio durante i nove mesi di gravidanza, l'interesse per il periodo gestazionale nella letteratura non è recente. Tuttavia, per le fasi della vita che precedono la nascita, c'è stata una notevole diffusione delle ricerche solo negli ultimi anni: la precocità e la compiutezza delle competenze fetali sensoriali e percettive, nonché la complessità delle attività esibite, ha portato l'attenzione sull'insieme di esperienze che il bambino vive nell'età prenatale e su come ciò possa costituire il nucleo fondamentale dell'esperienza psichica ed emozionale dell'individuo, costituendo la base per lo sviluppo successivo. Il grande impulso scientifico è stato sicuramente dovuto all'avvento delle moderne tecniche ad ultrasuoni che hanno consentito l'osservazione in tempo reale dell'attività spontanea fetale e delle sue reazioni alle più diverse stimolazioni: attraverso gli apporti multidisciplinari della neuroanatomia comparata, della psicofisiologia clinica, della psicologia sperimentale, unitamente agli studi di tipo osservativo, ecografico e neonatale, è possibile, infatti, ricostruire un'immagine abbastanza completa del bambino e della sua vita psicoemotiva fin dai primordi (Della Vedova, 1999).

Il feto è dotato di sensorialità articolata e differenziata e inizia a comporre quegli schemi inconsci di comportamento che lo accompagneranno tutta la vita. Possiamo sostenere che i processi di apprendimento e memorizzazione inizino durante il periodo prenatale e che nell'ontogenesi risultino privilegiati gli apprendimenti degli stimoli a struttura ritmica, sia

perché questi sono caratteristici del battito cardiaco di cui il feto ha una precoce e prolungata esperienza, sia perché mediati da substrati lateralizzati a destra che sono i primi a svilupparsi (Leppanen et al., 1994).

Dalla letteratura emergono numerosi studi che dimostrano come ogni esperienza della vita intrauterina rappresenti una fetta di esperienza che il feto memorizza. Tutto questo andrà a costituire il bagaglio esperienziale del feto.

Alcuni esperimenti dimostrano l'esistenza di rapporti comunicativi materno-fetali che si mantengono anche dopo la nascita e che fanno ipotizzare un certo inizio di vita psichica a livello prenatale. Winnicott fu il primo a rilevare come la comunicazione che si instaura tra la madre ed il feto è determinante per l'importantissima relazione di attaccamento e per il successivo sviluppo psichico del bambino (Della Vedova, 2005).

Alcuni studi hanno verificato che il feto è influenzato da intensi turbamenti degli stati emotivi materni e manifesta questo restando per alcune ore successive all'evento disturbante in uno stato di agitazione motoria; se la situazione di stress materno persiste, l'eccitazione motoria fetale diventa un tratto stabile riflettendosi nel basso peso alla nascita.

La psicologia prenatale e perinatale, riconoscendo al nascituro le capacità di ricevere, elaborare e rispondere a stimolazioni intra ed extrauterine anche a contenuto emotivo, colloca dunque l'inizio della vita psichica allo stadio prenatale (Righetti e Sette, 2000).

Studi condotti sugli animali hanno evidenziato che esperienze stressanti vissute in età infantile inducono un'iperattività a lungo termine dell'IIS (Plotsky PM et al., 1993; Ladd CO et al., 2000).

L'importanza dell'interazione madre-figlio nello sviluppo neonatale dei mammiferi, include non solo la nutrizione ma anche il contatto fisico. Nei ratti è stato dimostrato che alterazioni di questo rapporto, come per esempio la deprivazione materna (maternal

separation) che consiste nel separare i piccoli dalla loro madre subito dopo la nascita e per lunghi periodi di tempo, ha delle serie conseguenze nei piccoli una volta diventati adulti, sia a livello comportamentale, in cui si è evidenziato un aumento del comportamento ansioso (Caldji C. et al., 2004; Liu D. et al., 2000), sia a livello neuroendocrino dove, soprattutto nei maschi, si evidenzia un aumento della risposta a nuovi eventi stressanti (Ladd CO et al., 1996; Francis DD et al., 1999).

L'ambiente materno e l'intensità delle cure materne modifica l'espressione dei GR nell'ippocampo, bersaglio dei meccanismi di feedback mediati dai glucocorticoidi (Liu D et al., 1997). Tra le cure materne i comportamenti osservati e considerati come più affettuosi sono l'arched back nursing (ABN), ovvero quando la mamma allatta i suoi cuccioli col dorso inarcato e il pups licking-grooming (LG), cioè quando la mamma lecca e pulisce i piccoli (Myers et al. 1989). Da adulti, i piccoli deprivati del contatto materno, mostrano una diminuzione dell'espressione dei GR ippocampali dovuta alla diminuzione del feedback negativo, a cui segue un aumento della secrezione di glucocorticoidi in risposta ad eventi stressanti.

Questi risultati dimostrano che gli effetti del primo ambiente sullo sviluppo delle risposte allo stress da parte dell'asse IIS, riflettono una naturale plasticità che in epoca postnatale trova una programmazione nelle cure materne, le quali sono in grado di attivare le prime risposte biologiche a stimoli avversi. Tale plasticità permetterebbe agli animali di adottare sistemi difensivi verso le richieste specifiche dell'ambiente, attraverso uno sviluppo di risposte del SNC allo stress nelle prime fasi della vita (Hofer, 1983 Cramer, 1989).

È stato infatti dimostrato che figlie femmine di topo che hanno ricevuto delle cure materne ridotte, attraverso per esempio un precoce svezzamento, mostrano a loro volta una riduzione delle cure materne verso la loro futura prole (Kikusui e coll., 2005). Analogamente, figlie di ratto separate artificialmente dalle loro madri, sia per brevi e ripetuti periodi di tempo (Lovic e coll., 2001), sia tramite completa deprivazione materna

(Gonzalez e coll., 2001), esibiscono cure materne ridotte. In accordo, figlie femmine di ratto che mostrano verso i loro cuccioli un'alta frequenza di LG (High LG) e di ABN (High ABN), a loro volta presenteranno una frequenza più alta di questi comportamenti verso la propria prole rispetto alle figlie che hanno ricevuto dalle proprie madri una bassa frequenza di LG (Low LG) e di ABN (Low ABN) (Champagne e coll., 2003). A conferma del fatto che la quantità di tempo speso dalle madri nell'interagire con la propria prole possa rappresentare un fattore ereditario di carattere naturale e che questi tratti vengano poi espressi dalle figlie femmine attraverso le generazioni successive (Fairbanks, 1989; Fairbanks, 1996), è stato dimostrato che una figlia di madre con un'alta frequenza di LG e ABN (High LG-ABN) raramente diventerà una madre con una bassa frequenza di LG e ABN (Low LG-ABN) o viceversa (Champagne e coll., 2003). Un'ulteriore conferma è arrivata da studi di adozione crociata (cross-fostering), tramite i quali è evidente come il comportamento materno delle figlie biologiche delle Low LG-ABN, se allevate da madri High LG-ABN, risulti indistinguibile rispetto alle figlie naturali delle stesse madri High LG-ABN; analogamente, figlie di madri High LG-ABN, allevate dalle madri Low LG-ABN, si comportano con la propria prole in modo identico alle figlie naturali delle Low LG-ABN (Francis e coll., 1999; Liu e coll., 1997; Champagne e coll., 2003). I dati presenti in letteratura sui roditori suggeriscono quindi che la tipologia di ereditarietà che si presenta in questi casi non è di tipo genetico, ma piuttosto dipende dall'interazione tra madre e figlia durante il periodo postnatale. Inoltre, il comportamento materno può regolare lo sviluppo del sistema nervoso, che media le risposte endocrine e comportamentali allo stress e controlla diversi processi, tra i quali apprendimento e memoria (Liu e coll., 2000; Caldji e coll., 1998). Infatti, studi sulla risposta fisiologica e comportamentale allo stress, indicano come i piccoli allevati da madri Low LG-ABN mostrino elevate concentrazioni di ACTH e CTS in seguito a stress moderati, nonché ridotti livelli di GR nell'ippocampo ed elevati livelli di CRH nell'ipotalamo rispetto ai figli delle madri High LG-ABN (Caldji e

coll., 1998; Liu e coll., 1997). Questi risultati suggeriscono un aumento dell'attività dell'asse IIS nella prole delle madri Low LG-ABN. Fisiologicamente, in seguito ad uno stimolo stressante, il rilascio del CTS induce un feedback negativo attraverso l'interazione con i GR (Sapolsky e coll., 1996); i ridotti livelli di GR riscontrati nei figli delle madri Low LG-ABN sono responsabili dell'aumento dei livelli basali di CTS in seguito a stimoli stressanti (Liu e coll., 1997). Da un punto di vista comportamentale questa alterazione neuroendocrina sembra indurre uno stato ansioso, confermato da una ridotta attività esplorativa nel test dell'open-field e da un'aumentata inibizione nell'elevated plus maze (Caldji e coll., 1998). Oltre agli effetti mediati dall'asse IIS nei figli di madri Low LG-ABN, è stata riscontrata nell'amigdala una ridotta densità di recettori per le benzodiazepine (Caldji e coll., 2000; Liu e coll., 2000; Francis e coll., 1999); inoltre è stato dimostrato un aumento delle subunità  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  ed una diminuzione della  $\alpha 1$  e della  $\gamma 2$  del recettore  $GABA_A$  (Caldji e coll., 2003). Questi animali presentano una maggiore sensibilità agli stimoli stressanti, indotta presumibilmente da un aumento di CRH, il cui rilascio è sotto il controllo dell'attività GABAergica nell'amigdala, attività che in questi animali risulta essere ridotta (Owens e coll., 1991; Skelton e coll., 2000). Questi effetti possono essere revertiti attraverso l'adozione dei figli di madri Low LG-ABN da parte di madri High LG-ABN (Caldji e coll., 2003). Questi risultati suggeriscono che le cure materne possono alterare in modo permanente l'espressione di diverse subunità del recettore  $GABA_A$  in aree cerebrali implicate nella risposta allo stress.

L'adolescenza è quel delicato periodo dell'esistenza in cui avviene la transizione dall'infanzia all'età adulta. Questa fase della vita ha inizio con la pubertà, ossia con l'insieme di trasformazioni fisiche che portano alla piena capacità riproduttiva, e termina quando l'individuo è ritenuto a tutti gli effetti, da sé e dagli altri, un membro della comunità degli adulti. Già da questa prima definizione si possono intuire i complessi

compiti di cambiamento individuale e relazionale che l'adolescenza comporta e la difficoltà ad individuare in modo univoco la fine di questo periodo.

Prima di tutto l'adolescente è chiamato a distaccarsi dal concetto di sé costruito sull'opinione dei genitori, per sostituirlo con una considerazione di sé derivata dai giudizi dei coetanei, ove è di fondamentale importanza l'aspetto fisico, l'attrazione sessuale e l'intelligenza. L'adolescente può sentirsi valutato negativamente in alcuni di questi settori e ciò comporta inevitabilmente ansia, frustrazione o l'atteggiarsi in modo compensativo nel tentativo di primeggiare in ambiti in cui si è considerati poco abili. I cambiamenti che interessano l'adolescente si ripercuotono all'interno del contesto familiare. Il ragazzo in questo periodo ha due esigenze tra loro contrastanti: da un lato sente il bisogno di essere protetto dalla famiglia di origine e vorrebbe restare bambino, dall'altro vuole differenziarsi e acquisire autonomia. In questo periodo della vita diventano fondamentali gli amici; l'adolescente sente l'esigenza di fare parte di un gruppo di coetanei con cui trascorrere il tempo libero, condividere interessi, confrontarsi. Fare parte di un gruppo rafforza la propria autostima, ci si sente più forti perché non soli, il gruppo conferisce un'identità e un senso di appartenenza ai suoi membri. Accanto ai vantaggi dell'appartenere ad un gruppo, si possono intravedere degli aspetti negativi: protetti dal gruppo ci si sente forti e si possono commettere azioni sconsiderate, dettate da sensazioni di onnipotenza, o si possono assumere comportamenti contrari ai propri principi per la paura di contraddire il gruppo e rimanere soli.

Dalla letteratura emerge come il cervello dell'adolescente sia particolarmente vulnerabile allo stress. Esperienze fortemente stressanti vissute in questa fase della vita, come episodi di abusi sessuali o l'infanzia e l'adolescenza trascorsa in orfanotrofi, possono portare a problemi sia a livello di sviluppo psichico, sia a livello comportamentale, che perdurano tutta la vita e influenzano la capacità di rispondere in maniera adeguata ad uno stress in età adulta.

Studi effettuati sugli animali evidenziano una stretta correlazione tra stress in adolescenza e sensibilità allo stress nell'età adulta in maniera sesso-specifica.

L'adolescenza è un periodo di maggiore vulnerabilità e lo stress subito durante questo periodo influenza in modo negativo lo sviluppo del cervello, modificandolo in modo permanente.

In particolare, gli studi nei roditori indicano che i ratti maschi e femmine adolescenti mostrano, in risposta allo stress, un rilascio di CTS più prolungato nel tempo rispetto ai ratti adulti (Romeo et al, 2004;. Viau et al, 2005;. Romeo e McEwen, 2006). Inoltre, l'esposizione ad uno stress durante l'adolescenza, può aumentare la stessa reattività allo stress. Un recente studio (Barha K. et al., 2011) mostra come uno stress cronico intermittente (restraint stress) durante l'adolescenza aumenta la secrezione di CTS nel maschio, ma non nella femmina; al contrario, femmine adulte esposte ad uno stress durante l'adolescenza hanno livelli basali di CTS significativamente più alti rispetto alle femmine adulte di controllo. I risultati di questo studio sono in accordo con la letteratura sulle differenze di sesso nelle risposte biologiche allo stress, questa differenza potrebbe in parte essere dovuta a differenze di genere dell'attivazione dell'IAS (Bale, 2006; Kajantie e Phillips, 2006).



## **DIFFERENZE DI GENERE NELLA RISPOSTA ALLO STRESS**

Numerosi studi hanno dimostrato che i livelli di glucocorticoidi sono più alti nelle femmine rispetto ai maschi dopo stimolazione dell'asse IIS (Haleem et al., 1988; Heinsbroek et al, 1991; Kant et al., 1983; Kitay, 1961 e 1963, Yoshimura et a.l, 2003). Al contrario, la prova empirica è molto più equivoca negli esseri umani. Mentre le risposte dell'asse IIS all'esercizio fisico sembrano non differire tra uomini e donne (Friedmann e Kindermann, 1989; Kirschbaum et al., 1992a; Kraemer et al., 1989), la maggior parte degli studi sullo stress psicologico ha rivelato che ci sono differenze di sesso significative o risposte del cortisolo più elevate in uomini giovani rispetto alle donne giovani dopo l'esposizione ad uno stress psicologico acuto della vita reale (ad esempio gli esami accademici) o ad attività stressanti controllate in laboratorio (Collins e Frankenhaeuser, 1978; Earle et al., 1999; Forsman e Lundberg, 1982; Frankenhaeuser et al., 1980 e 1978; Kirschbaum et al., 1995a,b; Lundberg, 1983; Nicolson et al., 1997; Polefrone e Manuck, 1987; Stoney et al., 1987; Stroud et al. 2002). ACTH e cortisolo libero nell'uomo sono fino a due volte più elevati rispetto alle donne e la sola previsione di un imminente compito stressante nell'ambito psicosociale ha portato ad una significativa risposta del cortisolo libero solo negli uomini (Kirschbaum et al. , 1992b).

L'osservazione che lo stress acuto psicologico da un lato (come gli esami universitari della vita reale) e i test di stimolazione farmacologica dall'altro (come un'iniezione di CRH), sembra portare a diversi modelli sesso-specifici della responsività dell'asse IIS e alla necessità di chiarire esattamente quali siano i test applicati e quali livelli dell'asse IIS vengono attivati e studiati. A seconda della natura di uno stimolo, infatti, vengono attivati diversi percorsi per arrivare all'attivazione dell'asse IIS. Fattori di stress psicologico attivano l'asse IIS attraverso il sistema limbico (corteccia prefrontale, ippocampo, amigdala), fino alla stimolazione del nucleo paraventricolare (PVN) dell'ipotalamo, mentre i fattori di stress fisiologici svolgono la loro azione direttamente attraverso il PVN

(Herman e Cullinan, 1997). In accordo, mentre la maggior parte dei test di stimolazione dell'asse IIS agiscono principalmente a livello ipofisario o surrenalico, gli stress di tipo psicologico certamente richiedono un'elaborazione a livelli cerebrali superiori. È inoltre necessario considerare la possibilità che diverse dosi di un trattamento farmacologico possano cambiare la messa a fuoco del test prescelto e, di conseguenza, le differenze sessuali riscontrate nei vari studi potrebbero eventualmente essere attribuite a differenze nelle procedure di stimolazione dell'asse IIS applicate. Infine, oltre i livelli di cortisolo che aumentano con la risposta allo stress, sembra essere un importante indice di valutazione il tempo impiegato per tornare alle condizioni basali e quindi negli studi sullo stress dovrebbe essere fornita un'analisi più fine di questo parametro. Nella loro review informativa sull'invecchiamento e sulla risposta dell'asse IIS allo stress degli esseri umani, Seeman e Robbins (1994) sottolineano questa idea con la definizione del termine "resilienza allo stress", inteso come lo schema generale delle risposte dell'asse IIS alle sfide, che comprende l'entità della prima risposta alla sfida, l'ampiezza della risposta e il tasso di recupero dell'asse IIS per tornare allo stato basale. Si può ipotizzare che valutare tali parametri dopo l'esposizione ad uno stress potrebbe anche essere rilevante per gli esiti sulla salute (Dienstbier, 1989, Linden et al., 1997) e che vi è un elevato rischio di un esito negativo sulla salute quando il recupero per tornare alle condizioni basali è prolungato o impedito (Sapolsky et al., 2000). Questo problema è discusso anche nel quadro del carico allostatico (McEwen, 1998a,b). Infatti, una rapida e forte risposta dell'asse IIS accoppiata ad un processo di recupero rapido potrebbe essere una forma di adattamento, prima fornendo l'organismo dell'energia necessaria per affrontare una sfida, seguita poi da un adeguato ritorno alle condizioni basali (Linden et al., 1997; Sapolsky et al., 2000). Un ritorno lento allo stato basale potrebbe tradursi in una più lunga esposizione complessiva agli ormoni dello stress e potrebbe indicare una disregolazione del sistema dello stress (Sapolsky et al., 2000).

Le differenze sessuali osservate nella risposta e/o nell'attività dell'asse IIS sottolineano che le diverse risposte possono essere causa di dimorfismi sessuali nella funzione del cervello, nei livelli degli steroidi sessuali circolanti e dei corticosteroidi vincolati ai livelli di globulina. Regioni cerebrali limbiche, tra cui la corteccia prefrontale, l'ippocampo e l'amigdala, si presume che siano coinvolte nei processi innescati da uno stress psicologico (Herman e Cullinan, 1997; Herman et al., 1996).

Tra i candidati principali per spiegare le differenze di sesso nelle risposte allo stress dell'asse IIS troviamo gli steroidi gonadici circolanti. Tra questi, l'estradiolo in particolare sembra esercitare un effetto modulatore sul funzionamento dell'asse IIS, compresi la reattività dell'asse IIS e la sensibilità dei glucocorticoidi al feedback negativo (Young, 1995a,b). Gli studi sugli animali rivelano costantemente una forte influenza stimolante dell'estradiolo sul funzionamento dell'asse IIS (Handa e McGivern, 1999; Kitay, 1961, 1963. Lesniewska et al., 1990; Norman et al., 1992; Viau e Meaney, 1991; Xiao et al., 1994), con effetti modulatori su gli MR e i GR (Burgess e Handa, 1992; Carey et al., 1995; Peiffer et al., 1991; Redei et al., 1994; Turner, 1992). Inoltre, l'estradiolo può aumentare direttamente la trascrizione genica del CRH nell'ipotalamo attraverso il legame di elementi responsivi agli estrogeni sul gene CRH (Vamvakopoulos e Chrousos, 1993). Mentre possono essere citati molti studi su animali, che hanno direttamente studiato l'impatto degli estrogeni sulla regolazione dell'asse IIS, pochi studi sperimentali sono stati condotti sull'uomo e l'evidenza empirica è piuttosto incoerente.

Gli androgeni esercitano specifici e in parte contrastanti effetti a diversi livelli del regolamento dell'asse IIS, come mostrato in diversi studi su animali (Bingaman et al., 1994; El Hani et al., 1980; Handa et al., 1994; Kitay, 1963; Lesniewska et al., 1990; Viau e Meaney, 1996), ma questo dovrebbe testimoniare che il testosterone può anche esercitare effetti estrogenici dopo essere stato metabolizzato ad estrogeno attraverso aromatizzazione, sia nel cervello che nei tessuti periferici (Bagatell et al., 1994; Chowen et

al., 1990; Finkelstein et al., 1991; Naftolin, 1994; Weissberger e Ho, 1993). I dati sull'uomo sono scarsi. In uno studio in doppio cieco, controllato con placebo, sono state studiate le risposte dell'asse IIS allo stress indotto in laboratorio in 75 uomini e donne di età avanzata; dopo due settimane di DHEA o del trattamento con placebo (Kudielka et al., 1998), le donne trattate con DHEA hanno risposto allo stress con rilascio di ACTH simile a quello degli uomini, ma significativamente superiore rispetto alle donne che hanno assunto placebo.

Infine, anche se gli effetti mediati dall'estradiolo sembrano essere i più potenti modulatori della regolazione dello stress attraverso la regolazione dell'asse IIS, anche il progesterone potrebbe contribuire. In studi su animali è stato dimostrato che il progesterone può funzionare come un antagonista dei glucocorticoidi, può legarsi ai GR e agli MR (in un sito diverso da quello glucocorticoidi), può aumentare il tasso di dissociazione dei glucocorticoidi dal recettore, è in grado di modulare il numero dei recettori nell'ippocampo e può diminuire l'efficacia del feedback del cortisolo dopo una sollecitazione stressante (Ahima et al., 1992; Carey et al., 1995; Duncan e Duncan, 1979; Keller-Wood et al., 1988; Rousseau et al., 1972; Svec, 1988; Turner e Weaver, 1985). Tuttavia, i dati sull'impatto dei progestinici sull'asse IIS negli esseri umani sono risultati estremamente rari e quelli disponibili non suggeriscono una mediazione significativa di ACTH e risposte allo stress con rilascio di cortisolo (Burleson et al., 1998; Lindheim et al., 1994). Accanto al ruolo degli steroidi sessuali, è anche possibile che alcune delle differenze osservate nella reattività dell'asse IIS possa essere spiegata dai diversi livelli di corticosterone globulin protein (CBG) nei maschi e nelle femmine. In cinque diversi studi sullo stress indotto in laboratorio (Kudielka et al., 2004b), rispetto agli uomini più anziani, i livelli di CBG erano significativamente più alti nelle donne più anziane, anche se non sono emerse differenze tra i sessi negli adulti più giovani. Gli elevati livelli totali plasmatici di cortisolo nelle donne anziane e, almeno in parte, le maggiori risposte con rilascio di

cortisolo libero salivare negli uomini più anziani, possono essere attribuite alle differenze osservate nei livelli di CBG. In sintesi, il quadro generale sembra indicare che gli uomini adulti rispondano ad uno stress psicologico con maggiori aumenti di cortisolo rispetto alle donne. Si può ipotizzare che da un lato la maggiore reattività allo stress osservata negli uomini potrebbe essere causalmente associata ad un elevato rischio per le malattie legate ad alti livelli di cortisolo, come le malattie cardiovascolari e il diabete e questo potrebbe aiutare a spiegare la maggiore prevalenza di queste malattie nei maschi. D'altro canto, la risposta del cortisolo più bassa osservata nelle donne può essere correlata ad un'iporeattività dell'asse IIS, che è associata con un aumentato rischio di malattie autoimmuni, una condizione molto più frequente nelle donne. Molta più ricerca dovrebbe essere garantita sull'importanza della specificità degli eventi stressanti. Sulla base di solo pochi studi che applicano i conflitti interpersonali o psicosociali, in contrasto con i più usuali stress indotti in laboratorio che vengono utilizzati, l'ipotesi che le donne mostrano risposte più elevate nei compiti interpersonali rimane speculativa. Tuttavia, è stato provato che i tassi più elevati di depressione e disturbi d'ansia nelle donne potrebbero riflettere risposte allo stress iperattive in contesti interpersonali. Infine, le differenze sessuali nella struttura delle regioni limbiche del cervello e nell'elaborazione cognitiva di un fattore di stress, così come le differenze di steroidi sessuali circolanti e dei livelli di CBG, potrebbero essere responsabili del descritto dimorfismo sessuale dell'asse IIS nelle risposte ad uno stress.

Lo stress subito dalla donna durante la sua vita ha importanti conseguenze sull'accudimento della prole. Nei roditori, le cure materne hanno inizio al momento della nascita dei piccoli, sotto la spinta del cambiamento delle condizioni endocrine che si verifica durante il parto, quando calano bruscamente i livelli di progesterone e aumentano quelli di prolattina ed estrogeni. Inoltre, l'ossitocina sembra giocare un ruolo fondamentale nel promuovere l'inizio delle cure materne. Infatti, iniezioni

intracerebroventricolari (ICV) di ossitocina inducono rapidamente la comparsa di comportamenti materni in femmine di ratto vergini (Pedersen C.A. et al., 1982). Le variazioni ormonali da sole non sono però sufficienti a garantire il mantenimento delle cure materne. Infatti, i cambiamenti ormonali nell'ultima fase della gravidanza e durante tutto il periodo post-partum attivano il circuito neurale del comportamento materno, che coinvolge diverse aree cerebrali, come l'area preottica mediale dell'ipotalamo, il setto laterale, il nucleo accumbens e l'amigdala. Tuttavia, è il comportamento degli stessi cuccioli e gli stimoli ad essi correlati, come odori, suoni e sensazioni tattili, ad indurre nella madre un forte stimolo motivazionale a continuare le cure materne, anche quando i livelli ormonali diminuiscono (Clinton S.M. et al., 2007). A questo proposito, un'affascinante teoria è stata proposta in un lavoro di Clinton S.M. e coll. (2007), secondo cui i cuccioli agirebbero come stimolo di rinforzo a livello del sistema di gratificazione dopaminergico delle madri, per cui la "fase di mantenimento" del comportamento materno, quando i livelli ormonali iniziano a decadere, sarebbe guidata principalmente da tali meccanismi di ricompensa.

Diversi studi dimostrano come lo stress a cui è sottoposta la madre durante la gestazione possa alterare le cure materne e lo sviluppo della prole (Champagne e coll., 2006; Moore e Power, 1986). Infatti ratti femmina sottoposte a stress durante l'ultima settimana di gravidanza, esibiscono ridotte cure materne verso la prole (Champagne e coll., 2006). Studi condotti sulle scimmie hanno dimostrato come lo stress indotto dall'isolamento sociale possa influenzare la qualità delle cure materne (Arling e Harlow, 1967). Infatti, in femmine di scimmia allevate in condizioni di isolamento durante i primi sei mesi di vita, sono state osservate delle alterazioni del comportamento materno da adulte (Arling e Harlow, 1967; Seay e coll., 1964), come abbandono e infanticidio. Nei roditori la completa deprivazione materna, ottenuta attraverso la separazione dei piccoli dalla madre al terzo giorno postpartum e col completo isolamento (Hall, 1975), determina in questi ultimi,

una volta adulti, uno stato ansioso, iperattività locomotoria, alterazioni cognitive e del comportamento sociale, in particolare nelle cure materne (Gonzalez e coll. 2001, 2002; Lovic e coll., 2001).

## **RUOLO DELL'ALLOPREGNANOLONE DURANTE LA GRAVIDANZA**

Gli ormoni steroidei giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo e/o nella funzione del sistema SNC. Tradizionalmente, si considera che gli ormoni secreti dalle gonadi abbiano degli effetti sul cervello, sulla funzione neuroendocrina e sul comportamento. L'effetto di attivazione degli ormoni nel cervello e/o nei comportamenti avviene attraverso l'azione di questi nel SNC già sviluppato.

Per tutta la durata della vita, le femmine mature sperimentano maggiori variazioni per quanto riguarda i progestinici circolanti (progesterone e suoi metaboliti naturali) e raggiungono livelli più elevati di questi rispetto ai maschi. Per esempio, durante la fase follicolare del ciclo mestruale, i livelli di progesterone delle donne sono bassi (simili agli uomini); tuttavia, i livelli circolanti durante la fase luteale, sono da due a quattro volte superiori (Purdy et al 1990; Wang et al. 1996; Genazzani et al. 1998; Sundström e Backström 1998a,b; Freeman et al. 2002; Gracia et al. 2003;). Gli effetti degli ormoni si verificano durante i periodi critici dello sviluppo (tipicamente pre- o perinatale) e danno luogo a cambiamenti permanenti nella struttura del SNC (nelle aree sessualmente dimorfiche dell'ipotalamo) e/o nella funzione (ad esempio nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi o surrene; Melcangi e Panzica 2003). Durante la gravidanza, i livelli sierici di progestinici aumentano, con un picco nel terzo trimestre, per poi raggiungere l'apice 1-24 ore dopo il parto (Sundström et al., 1999; Luisi et al., 2000; Herbison, 2001). Il pattern di secrezione di progestinici durante la gravidanza suggerisce che i progestinici potrebbero avere un qualche effetto organizzativo sulla programmazione fetale e sullo sviluppo neuronale della prole, così come degli effetti di attivazione per la mamma.

E' da sempre riconosciuto che il mantenimento della gravidanza dipende da livelli elevati di progestinici definiti appunto "pro gestazionali". Infatti, i progestinici possono avere effetti di soppressione sull'azione e/o sulla risposta allo stress dell'asse IIS. Ad esempio, la somministrazione di progestinici sintetici riduce l'incidenza delle nascite pretermine



(Preterm birth PTB, ovvero il parto prima delle 36 settimane di gestazione) tra le donne (Keirse 1990; Doggrell 2003; Sanchez- Ramos 2005). In uno studio multicentrico, randomizzato e controllato con placebo, di donne in gravidanza con una storia di PTB spontanee, la somministrazione settimanale del  $17\alpha$ -idrossiprogesterone (17-OHP) ha ridotto il PTB del 33 % rispetto al placebo (Petrini et al., 2009). Recentemente è stato studiato il ruolo dell'AP per accertare se può avere effetti simili. Durante la gravidanza, i livelli di AP plasmatici e ipocampali sono più alti rispetto alle variazioni tipiche presenti nel ciclo mestruale (Holzbauer, 1975). Nelle donne in stato di gravidanza i livelli di AP plasmatico aumentano durante la gestazione, con un picco nel terzo trimestre, per poi ritornare ai livelli di controllo entro 1h dal parto. Un declino simile nei livelli di AP circolante è stato osservato anche nei ratti (Concas et al., 1998). Nei ratti, il declino dei livelli di AP si verifica anche nel cervello appena prima del parto (Concas et al., 1998).

In particolare, vi è una relazione inversa tra AP e secrezione di glucocorticoidi. Gli studi dimostrano che nelle pecore le concentrazioni di AP, anche nel cervello fetale, aumentano durante la fine della gestazione, raggiungendo livelli massimi prima del termine. Tali concentrazioni poi calano drammaticamente dopo la nascita (Nguyen et al., 2003). Aberrazioni che si verificano durante la gestazione, come le nascite pretermine, sono tra le cause più importanti di morte neonatale negli Stati Uniti (MacDorman et al., 2007) e sono associate con lo stress (Hedegaard et al., 1993; Wadhwa et al., 1993; Paarlberg et al., 1995; Rini et al. 1999). Fattori di stress, siano essi psicologici, fisici e/o di tipo immunitario, raddoppiano il rischio di PTB. Per esempio, una coorte sopravvissuta di donne in gravidanza, risiedendo in una zona gravemente colpita dall'uragano Katrina, ha avuto un'incidenza di PTB pari al 14%, rispetto al 6% delle superstiti gravide residenti in una zona meno gravemente danneggiata (Xiong et al., 2008).

Un altro lavoro di Yawno e colleghi riguardante questo problema, descrive la necessità della sintesi di AP per mitigare gli effetti di potenziali esiti negativi alla nascita. Questi studi

sono stati eseguiti in pecore che, come gli esseri umani, hanno una gestazione relativamente lunga. In questa specie, la placenta diventa la principale fonte di progesterone e le concentrazioni plasmatiche aumentano notevolmente con l'avanzare della gestazione, fino ad arrivare a livelli circolanti molto elevati entro la fine della gestazione. Gran parte del progesterone arriva così al sangue fetale e può essere rapidamente metabolizzato per la produzione di neurosteroidi nel cervello. La placenta umana esprime la  $5\alpha$ -reduttasi di tipo 1 e di tipo 2 (Vu et al., 2009) che convertono il progesterone in  $5\alpha$ -DHP (Vu et al. 2009). Questo metabolita può essere ulteriormente convertito in AP dalla  $3\alpha$ -idrossisteroide reduttasi nel cervello, contribuendo agli elevati livelli gestazionali (Nguyen et al., 2003). Precedenti studi, utilizzando la finasteride per sopprimere la conversione del progesterone nei metaboliti neuroattivi, hanno dimostrato che i neurosteroidi gestazionali hanno un ruolo cruciale nella soppressione dell'attività del SNC fetale (Nicol et al., 1997).

Le concentrazioni di AP diminuiscono drasticamente in seguito alla perdita della placenta alla nascita. Il trattamento con finasteride negli studi di Yawno e colleghi era stato utilizzato per imitare il netto calo delle concentrazioni dell'AP che si verifica in seguito a nascita pretermine. Questa caduta prematura può avvenire prima che il feto abbia avuto un'adeguata esposizione ai livelli normali di neurosteroidi alla fine della gravidanza e quando i neonati possiedono una capacità di sintesi che può essere limitata (Vu et al., 2009). Gli studi di Yawno e colleghi, quindi, indicano che il declino dei livelli di neurosteroidi può ridurre la soglia convulsiva e predisporre il neonato pretermine all'iperattività. Così, le azioni dei neurosteroidi sul recettore  $GABA_A$  potrebbero sottendere un importante meccanismo attraverso il quale la quiescenza fetale del cervello è mantenuta fino al termine normale della gravidanza.

L'azione dei neurosteroidi nella stimolazione dei recettori  $GABA_A$ , che sono in gran parte extrasinaptici per modulare l'attività tonica, suggerisce che questi steroidi possono elevare di più la soglia convulsiva e proteggere dall'ipereccitabilità (Belelli et al. 2005).

Yawno e coll. (2007) somministrando la finasteride, hanno dimostrato che l'inibizione della formazione dell'AP potenzia l'asfissia (occlusione del cordone ombelicale), inducendo morte cellulare nella vulnerabile regione ippocampale. Il report di Yawno e colleghi indica che l'ipereccitabilità e l'attività convulsiva contribuiscono a questo aumento della morte cellulare. Queste osservazioni suggeriscono che il neonato prematuro è compromesso dalla mancanza di neurosteroidi nel cervello. È importante sottolineare che gli studi descritti da Paris e Frye in un lavoro mostrano effetti negativi sulla prole a causa della ridotta esposizione ai neurosteroidi durante la gravidanza per quanto riguarda le prestazioni cognitive durante l'adolescenza. La relazione di Paris e Frye spiega come le prestazioni cognitive dei ratti adolescenti vengono alterate quando essi sono stati esposti ad uno stress alla fine della gestazione e perché l'inadeguata sintesi dell'AP nella mamma stressata potrebbe essere un importante meccanismo che porta a questi risultati. Infatti, ridotte concentrazioni circolanti di AP nelle mamme stressate, rispetto ai controlli, predicono la formazione ridotta di AP nella corteccia prefrontale della prole, nonché la performance cognitiva alterata dei figli adolescenti. Questi risultati forniscono ulteriore supporto per il concetto che la formazione dell'AP in risposta allo stress durante la gravidanza può essere alla base di importanti meccanismi che hanno conseguenze, non solo per il supporto immediato della gravidanza, ma anche per gli effetti duraturi sulla funzione cognitiva della prole. Nel loro insieme questi dati sottolineano il ruolo cruciale dei neurosteroidi materni nella gravidanza e nello sviluppo della prole.

L'AP può servire come un mediatore importante durante la gravidanza per promuovere la quiescenza dei neuroni attivati dallo stress nel cervello della mamma. Quando un fattore di stress, ad esempio un insulto ipossico, è vissuto dalla prole prima o durante il parto, le

azioni inibitorie dell'AP sui recettori  $GABA_A$ , potrebbero ridurre la neurodegenerazione, in parte attraverso la regolazione dell'attivazione centrale nel cervello fetale. L'esposizione ad uno stress in un momento critico durante la gestazione può provocare alterazioni nella sintesi dell'AP durante lo sviluppo della prole, alterando questi meccanismi protettivi. Tale disregolazione nella sintesi dell'AP può promuovere conseguenze comportamentali che si manifestano più tardi nella vita, come appunto una performance cognitiva peggiore nella fase adolescenziale.

## **ISOLAMENTO SOCIALE**

L'isolamento sociale è un modello di stress cronico nel ratto. Questo modello di stress cronico è stato validato negli anni '50 e '60 del secolo scorso, quando alcuni ricercatori descrissero il comportamento dei ratti e dei topi da esperimento allevati individualmente per lunghi periodi di tempo, senza il contatto fisico con gli animali della stessa specie. Esso consiste nella stabulazione dei ratti in gabbie singole per 30 giorni dallo svezzamento e questa condizione è particolarmente stressante per questi animali che sono gregari sia in natura che in cattività. Il periodo dopo lo svezzamento rappresenta una fase critica dello sviluppo, caratterizzata dal gioco e dal contatto con i propri simili, la sua interferenza influenza notevolmente il comportamento dell'animale adulto. Infatti, nei mammiferi, generalmente, l'infanzia e l'adolescenza costituiscono un periodo di alta plasticità del sistema nervoso centrale (Greenough e coll., 1987, O'Leary e coll., 1995). Molte evidenze sperimentali dimostrano che le situazioni stressanti (fisiche o psicologiche) che si presentano durante le prime esperienze dell'animale, possono influenzare negativamente lo sviluppo del cervello e il successivo comportamento in età adulta (Anisman e coll., 1998, Weiss e coll., 2001), così come nell'uomo le esperienze negative dell'infanzia e dell'adolescenza possono influenzare la probabilità che si manifestino disturbi neuropsichiatrici come la schizofrenia, la depressione e i disturbi d'ansia. Dunque, nei giovani animali da laboratorio, l'allontanamento dai propri simili e la privazione del contatto sociale per lunghi periodi di tempo è uno dei modelli sperimentali utilizzati per lo studio di questi disturbi psichiatrici. Ratti e topi da esperimento allevati individualmente per lunghi periodi di tempo, senza contatto fisico con gli animali della stessa specie, appaiono più reattivi alla manipolazione (Ader e coll., 1964, Hatch e coll., 1963), timidi (Moyer e Korn, 1965), emotivi (Koch e Arnold, 1972) ed aggressivi (Yen e coll., 1958). Un aspetto comportamentale che caratterizza gli animali socialmente isolati è l'aggressività verso lo sperimentatore rendendone difficile la manipolazione: essa è indice di uno stato

emozionale alterato. In genere l'aggressività si manifesta anche nei confronti dei propri simili, mostrando un aumento del comportamento muricida una volta che, dopo il periodo di isolamento, gli animali vengono rimessi in gruppo (Kostowski e coll., 1977, Karim e Arslan, 2000, Wongwitdecha e Mardsen, 1996).

Numerosi test utilizzati per valutare lo stato emozionale suggeriscono che l'isolamento sociale induce uno stato conflittuale, infatti gli animali isolati trascorrono più tempo nei bracci chiusi rispetto agli animali stabulati in gruppo nel test dell' Elevated Plus Maze (Karim e Arslan, 2000, Serra e coll., 2000) e mostrano una diminuzione del numero di bevute nel test di Vogel rispetto ai controlli (Serra e coll., 2000). Inoltre, l'animale isolato mostra un incremento dell'attività locomotoria (Silva-Gomez e coll., 2003, Sahakian e coll., 1977, Hellemans e coll., 2004) e impiega un tempo maggiore per entrare in un nuovo ambiente (neofobia) (Dalrymple-Alford e coll., 1984, Einon e coll., 1977).

Il comportamento conflittuale degli animali isolati è associato all'alterazione dell'attività del recettore GABA<sub>A</sub> (Robertson e coll., 1978, Harro e coll., 1990). In particolare la conflittualità indotta dall'isolamento sembra essere associata alla riduzione della funzione del recettore GABA<sub>A</sub> (Robertson e coll., 1978, Harro e coll., 1990, Serra e coll., 2000). Nei ratti e nei topi socialmente isolati sono stati osservati una riduzione del binding per il recettore GABA<sub>A</sub> in diverse aree del cervello (Essman, 1982, Braestrup e coll., 1979, Miachon e coll., 1990) e un aumento del binding del [<sup>35</sup>S]TBPS (Serra e coll., 2000) nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, che induce una diminuzione nella funzionalità del recettore GABA<sub>A</sub>. In accordo, l'isolamento sociale induce un disaccoppiamento funzionale tra il sito delle benzodiazepine e quello del GABA<sub>A</sub> nei recettori GABA<sub>A</sub> cerebrocorticali e ippocampali di ratto ricostruiti in oociti di *Xenopus Laevis* (Serra e coll., 2000), una riduzione della capacità del GABA di stimolare l'uptake di <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> in sinaptoneurosomi di topo (Gardner e coll., 1975) e una riduzione dell'effetto ansiolitico delle benzodiazepine in ratti sottoposti al test di interazione sociale (Wongwitdecha e Mardsen, 1996).

Un possibile meccanismo attraverso il quale lo stress cronico, determinato dall'isolamento sociale, induce una "down regulation" della trasmissione GABAergica, potrebbe essere dovuta ad una modificazione della conformazione del recettore GABA<sub>A</sub> in seguito ad una variazione dell'espressione delle specifiche subunità che lo compongono. Infatti, studi condotti nei nostri laboratori, hanno dimostrato che l'isolamento sociale modifica l'espressione di diverse subunità che compongono il recettore (Serra e coll., 2006). L'isolamento sociale nel ratto induce una riduzione dei livelli basali plasmatici, ippocampali e cerebrocorticali di AP (Serra et al. 2000), un effetto osservato anche nel topo (Matsumoto et al. 1999).

Il meccanismo molecolare responsabile della riduzione dei livelli di AP e THDOC non è ancora del tutto chiarito. E' stato ipotizzato (Matsumoto et al., 1999) che l'isolamento sociale riduca l'attività o l'espressione dell'enzima 3 $\alpha$ -HSD che catalizza la riduzione del DHP in AP; la diminuzione dell'attività di questo enzima porterebbe ad una riduzione dei livelli cerebrali di AP. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che, in alcuni ceppi di topo, l'effetto dell'isolamento sociale è selettivo per questo steroloide (Matsumoto et al., 1999). Tuttavia è plausibile che l'effetto di tale condizione sia mediato da altri meccanismi.

Studi condotti nei nostri laboratori hanno dimostrato inoltre che i ratti privati di qualsiasi interazione sociale, quando vengono esposti a nuovi stimoli stressanti, rispondono in maniera più marcata rispetto agli animali di controllo. In particolare, gli animali socialmente isolati, quando sottoposti ad uno stress acuto come il foot-shock, mostrano un aumento dei livelli di AP e di THDOC molto maggiore rispetto agli animali stabulati in gruppo (Serra e coll., 2000). Questa evidenza è in accordo con l'idea che, durante lo stress cronico, si sviluppi una "traccia facilitatoria" caratterizzata da una maggiore sensibilità dell'IIS ai nuovi stimoli stressanti (Akana et al., 1992).

L'evidenza che gli animali isolati mostrino una risposta più marcata rispetto a quelli stabulati in gruppo, suggerisce che in questi animali la funzione dell'asse IIS sia alterata.

Questa ipotesi è stata confermata da studi effettuati nei nostri laboratori mediante il test di “soppressione del desametasone”(DST) che ci ha permesso di studiare la funzionalità dell’asse IIS. Il desametasone (DEX) è uno steroide di sintesi circa 40 volte più potente del cortisolo o del corticosterone nell’indurre un feed-back negativo sull’asse IIS. Questo test permette di verificare l’eventuale presenza di alterazioni dell’asse IIS e di verificare se esistono delle differenze nella capacità del DEX di sopprimere la secrezione basale di CTS attraverso la sua interazione con i GR presenti nell’ipofisi e in altre aree del cervello. Ciò è possibile utilizzando due differenti dosi (Miller e coll., 1992). A basse dosi (3µg/kg i.p.) il DEX è in grado di determinare un effetto prevalentemente attraverso un’azione a livello ipofisario (Mizoguchi e coll., 2001), data la sua scarsa capacità di penetrare la barriera ematoencefalica (De Kloet e coll., 1975, Miller e coll., 1992, Meijer e coll., 1998). A dosi più elevate (500 µg/kg i.p.) il DEX penetra anche nel cervello (Miller e coll., 1992), legandosi ai recettori ippocampali e ipotalamici. Negli animali stabulati in gruppo, entrambe le dosi di DEX hanno dimostrato di ridurre significativamente la concentrazione plasmatica di CTS in modo dose-dipendente. Al contrario, negli animali socialmente isolati, la dose più bassa di DEX non è stata in grado di ridurre significativamente i livelli plasmatici di CTS, mentre la dose più alta riduce sensibilmente tali livelli, ma in maniera meno marcata rispetto a quella osservata negli animali di controllo (Serra e coll., 2005). Questi dati hanno suggerito che l’isolamento sociale nel ratto riduce il feed-back negativo, sia nell’ipofisi che nell’ipotalamo e nell’ippocampo, importanti nel controllo di tale funzione. Questa conclusione è supportata da numerosi studi che mostrano come lo stress cronico induca un aumento della sensibilità dell’asse IIS (Makino e coll., 1995, Burgin e coll., 1996, Mizoguchi e coll., 2001).

E’ inoltre interessante notare come la manipolazione degli animali isolati (due volte al giorno durante tutto il periodo dell’isolamento) prevenga la riduzione dei livelli cerebrocorticali e plasmatici di neurosteroidi (Serra e coll., 2000).



L'isolamento sociale induce delle profonde variazioni della morfologia neuronale. Negli animali socialmente isolati è stata infatti riscontrata una diminuzione della lunghezza dei dendriti e della densità delle spine dendritiche nei neuroni piramidali dell'area CA1 dell'ippocampo e nella corteccia prefrontale (Silva-Gomez et al., 2003) e una ridotta neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo (Westenbroek et al., 2004). Inoltre, l'isolamento sociale riduce i livelli di Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) nell'ippocampo, mentre non sono stati rilevati cambiamenti nello striato e nella corteccia prefrontale (Scaccianoce et al., 2006). Gli animali socialmente isolati, oltre ad alterazioni dello stato emozionale, mostrano anche alterazioni della memoria e dell'apprendimento spaziale (Hellemans e coll., 2004; Jones e coll., 1992; Pisu et al., 2011), del tempo di immobilità nel test del nuoto forzato o test di Porsolt (Heritch e coll., 1990) ed hanno un'alterata risposta comportamentale a diversi farmaci come i barbiturici (Einon e coll., 1976; Juraska e coll., 1983), gli oppioidi (Katz e Steinberg, 1972), gli agonisti dopaminergici così come gli psicostimolanti amfetamina-simili (Jones e coll., 1990; Smith e coll., 1997).

Tutte queste osservazioni suggeriscono come l'isolamento sociale abbia un effetto negativo sullo sviluppo e sul mantenimento delle funzioni cerebrali e sono in accordo con l'evidenza che alcune alterazioni comportamentali (quali ansia, aumento dell'attività motoria e deficit cognitivi), causate dall'isolamento sociale, siano parzialmente revertite dall'esposizione degli animali ad un ambiente socialmente "arricchito" o dalle interazioni sociali con animali della stessa specie (Hellemans e coll., 2004).

## **OBBIETTIVO DELLA TESI**

Sulla base di queste premesse, nell'attività di ricerca svolta durante il mio dottorato, ho voluto approfondire lo studio della problematica dell'isolamento sociale, utilizzando questo modello animale di stress cronico con i ratti femmina.

A tale scopo ho voluto valutare:

- eventuali differenze di genere indotte dall'isolamento sociale nell'effetto dello stress
- se l'isolamento sociale potesse causare delle variazioni ormonali durante la gravidanza e il post partum
- differenze comportamentali tra madri isolate e madri di controllo durante l'allattamento dei cuccioli
- l'effetto transgenerazionale, studiando la risposta allo stress acuto e cronico nella prole.

## **MATERIALI E METODI**

### **ANIMALI E ISOLAMENTO SOCIALE**

Sono stati utilizzati ratti maschi e femmina Sprague-Dawley (Figura 6) del ceppo CD (Charles River, Como, Italia). Gli animali sono stati stabulati con un ciclo artificiale giorno/notte di dodici ore (luce dalle 8:00 alle 20:00) ad una temperatura costante di  $23 \pm 2$  °C e con un'umidità del 65%. Gli animali hanno avuto libero accesso al cibo e all'acqua. Dopo la nascita, sono stati stabulati in gruppo assieme alla madre fino allo svezzamento; al 21° giorno di vita sono stati separati dalla madre: un gruppo è stato stabulato in gabbie singole (ratti socialmente isolati), mentre gli altri animali sono stati tenuti in gruppi di 6-8 per gabbia (ratti stabulati in gruppo, group-housed) per trenta giorni (Figura 7). I ratti sono stati assegnati ai due gruppi sperimentali in maniera casuale. La stabulazione degli animali e la loro manipolazione durante le procedure sperimentali sono avvenute nel rispetto della direttiva del Consiglio della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC).



**Figura 6- Il ratto Sprague-Dawley**

### **FIGLI DI ISOLATI E DI CONTROLLI**

Al trentesimo giorno di isolamento, i ratti maschi isolati sono stati messi in accoppiamento con femmine isolate ed i ratti maschi group-housed con femmine group-housed stabulati in gruppo. Allo svezzamento, sia i figli di ratti isolati che i figli di ratti di controllo sono stati stabulati in numero di 5 per gabbia (Figura 7).

Al momento degli esperimenti sia i genitori che i figli avevano due mesi d'età, raggiungendo un peso di circa 300-350 gr.

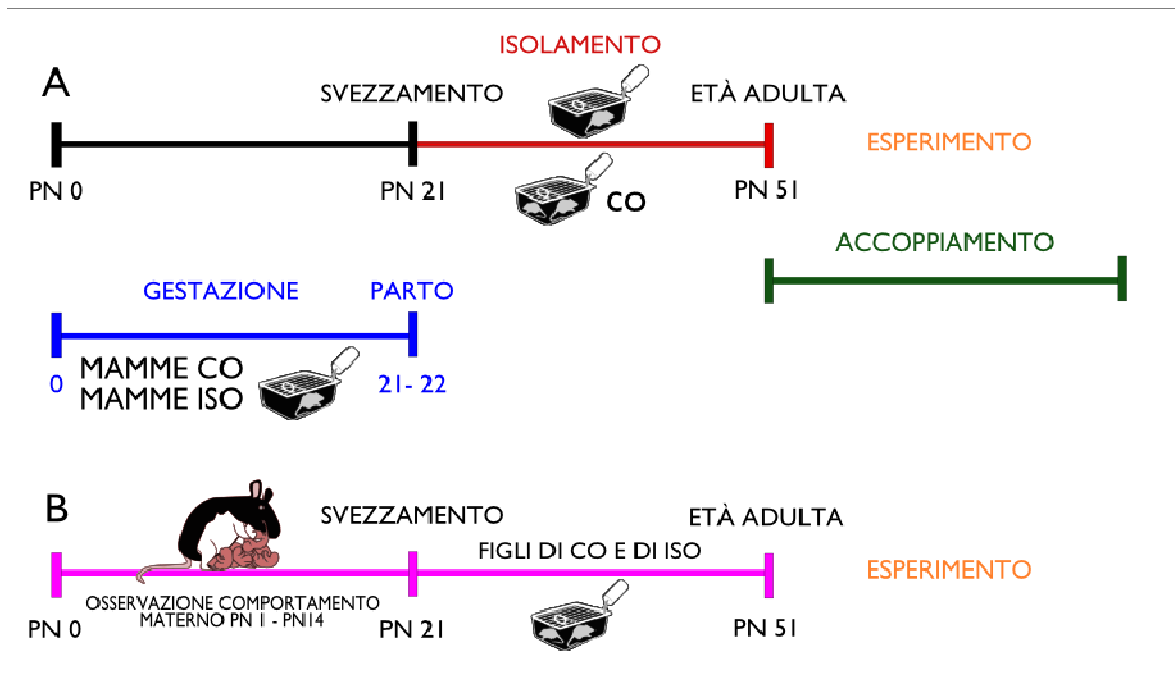


Figura 7 - Rappresentazione schematica della procedura dell'isolamento sociale (A) e dei figli di ratti isolati (B)

### OSSERVAZIONE DEL COMPORTAMENTO MATERNO

Abbiamo osservato il comportamento materno secondo il protocollo descritto da Myers e coll. (1989). Il comportamento di ogni madre verso la propria prole è stato osservato dal 1° al 14° giorno postpartum per 4h al giorno (Figura 7), divise in due diversi periodi: 2h la mattina (7:00-9:00) e 2h la sera (19:00-21:00). Per ciascuna madre sono state effettuate 100 osservazioni al giorno con un intervallo di circa 3 minuti tra due osservazioni successive. Ogni osservazione è caratterizzata dalla valutazione istantanea e dalla registrazione del comportamento da parte dell'osservatore. In particolare sono stati considerati i seguenti comportamenti materni:

1. Pup-licking, leccare e mordicchiare i piccoli
2. Nursing, allattare sdraiata
3. Arched-back nursing, allattare con la schiena inarcata col proprio corpo sopra i piccoli

4. Nest building, ricostruire il nido
5. Self grooming, pulizia del proprio corpo
6. In nest, rimanere a contatto con i piccoli
7. Resting, riposare
8. Eating & drinking, bere o mangiare senza avere nessun contatto con i cuccioli.

### TEST DELL'ELEVATED PLUS-MAZE

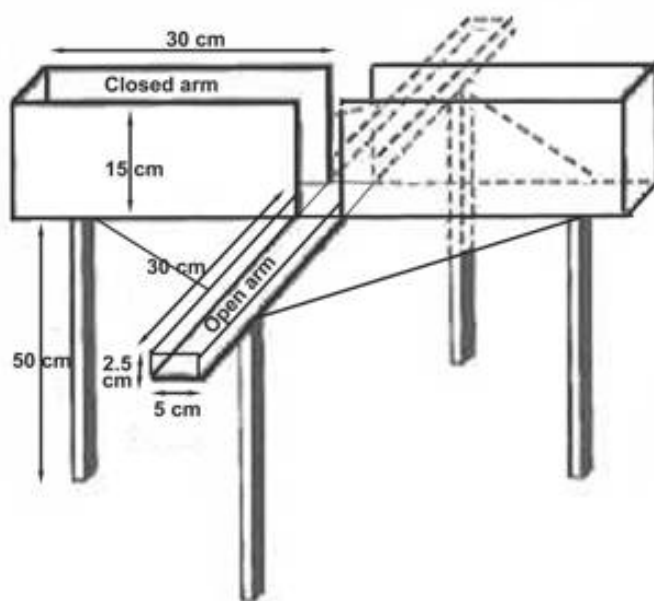


Figura 8 – L'apparato dell'elevated plus-maze

Il test dell'Elevated Plus-Maze (Figura 8) trova larga applicazione per la valutazione dello stato ansioso. In questo test l'ansia viene indotta da situazioni ambientali inusuali od ostili. Non implica la punizione dell'animale. E' basato sulla normale avversione dei ratti verso gli spazi aperti (nei quali è più difficile difendersi) e sulla

predilezione verso gli spazi chiusi (nei quali si sentono più al sicuro). Lo strumento, di plexiglass nero, è formato da quattro bracci disposti a croce, due dei quali chiusi (Figura 9) e due aperti (Figura 10) rispettivamente l'uno di fronte all'altro; è montato 50 centimetri al di sopra del piano del pavimento, in una stanza acusticamente isolata ed in penombra.



**Figura 9 - Il ratto nel braccio chiuso**



**Figura 10 - Il ratto nel braccio aperto**

Il ratto viene posto nella piattaforma centrale dell'apparato (start point) e ne viene osservato il comportamento esplorativo per 5 minuti, durante i quali vengono registrati il numero degli ingressi nei bracci aperti e chiusi ed il tempo speso al loro interno. Viene considerato ingresso in un braccio quando l'animale ha tutte e quattro le zampe al suo interno. La proporzione delle esplorazioni spontanee negli spazi aperti verso quelle negli spazi chiusi viene dunque considerata una misura dello stato d'ansia dell'animale.

### **TEST DI VOGEL**

Il test di Vogel viene largamente utilizzato per la valutazione dello stato ansioso. In questo test l'ansia viene indotta mediante l'induzione di uno stato conflittuale nell'animale, attraverso la somministrazione di uno shock elettrico. Prevede dunque la punizione dell'animale.

Viene eseguito su ratti privati dell'acqua nelle 36 o 48 ore precedenti l'esperimento. L'apparecchio (Figura 11) è costituito da una gabbia (20 x 28 x 20 centimetri) di plexiglass

oscurata e silenziosa, il cui pavimento consta di una serie di sbarre in ottone distanti 2 centimetri l'una dall'altra, collegate in modo che la polarità elettrica di due sbarre sia inversa.

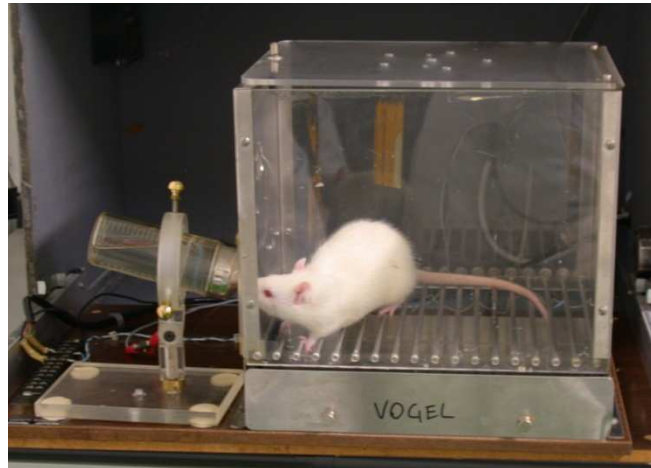


Figura 11 - L'apparato del test di Vogel

Nella gabbia è presente un biberon il cui beccuccio metallico è collegato ad un generatore di corrente attraverso il quale viene emessa una leggera scarica elettrica ad intervallo e durata variabili, la cui intensità è compresa tra 0.5-1 mA. Il generatore eroga una scarica elettrica ogni 15 leccate (“drinking period”) ed il tempo totale della sessione è di 3 minuti.

L'animale, posto nella gabbia, dopo un breve periodo di esplorazione trova l'acqua; ricevuta la scossa elettrica si allontana dalla fonte idrica, nonostante l'impellente stimolo della sete. Il ratto si ritira in una posizione immobile di attesa, combattuto tra la pulsione di soddisfare l'istinto della sete ed il timore del dolore dato dalla scossa elettrica (stimolo punitivo).

### **FOOT-SHOCK STRESS**

L'apparecchio del foot-shock è costituito da:

- una gabbia in plexiglas delle dimensioni di 28x22 x27 cm con due lati opachi;
- uno stimolatore collegato al pavimento della gabbia.

Il pavimento della gabbia è costituito da una serie di sbarre in ottone che sono collegate allo stimolatore in modo che la polarità elettrica di due sbarre successive sia inversa. Ogni secondo lo stimolatore rilascia una scarica elettrica di 0.2 mA della durata di 500 ms. Gli animali sono stati sottoposti al foot-shock stress per una durata totale di 5 minuti e sacrificati 30 minuti dopo per la misurazione degli steroidi nel cervello e nel plasma.

### **DST: DEXAMETHASONE SUPPRESSION TEST**

Il desametasone (Sigma) è stato somministrato con un'unica iniezione intraperitoneale alla dose di 500 µg/kg di peso corporeo. Il farmaco è stato disciolto in etanolo assoluto e poi portato a volume con soluzione fisiologica (600 µl di etanolo ogni 5 mg di farmaco). Gli animali di controllo hanno ricevuto la soluzione veicolante del farmaco. Il sacrificio è avvenuto 150 minuti dopo l'iniezione.

### **DOSAGGIO DEGLI STEROIDI**

Gli animali sono stati sacrificati con la ghigliottina (per la misurazione degli steroidi nel plasma) o mediante irradiazione di microonde della durata di 4 secondi focalizzata sulla testa per misurare gli steroidi cerebrali in modo da inattivare gli enzimi cerebrali e quindi bloccare il metabolismo degli steroidi dopo la morte. Il cervello è stato estratto dal cranio ed è stata poi sezionata la corteccia cerebrale, congelata a -20° C fino all'estrazione degli steroidi. Il sangue è stato prelevato dal corpo dell'animale, raccolto in provette contenenti eparina e centrifugato a 900 x g per 10 minuti in modo da separare il plasma che poi è stato congelato a -20° C fino al momento dell'estrazione.

Gli steroidi plasmatici sono stati estratti per quattro volte da 1 ml di plasma con 3 ml di acetato di etile. La fase organica è stata portata a secco sotto vuoto e il pellet è stato successivamente risospeso in esano-propanolo (70:30 v/v) prima del dosaggio. Il recupero (80-90%) degli steroidi attraverso le procedure di estrazione è stato controllato tramite l'aggiunta al plasma di quantità traccianti di corticosterone triziato (8000 cpm). La



corteccia cerebrale è stata pesata con una bilancia analitica e poi omogenata con un Polytron PT 10 (velocità 2/3 per 20 sec.) in 4 ml di tampone fosfato (pH 7.0). Gli steroidi cerebrali sono stati estratti per quattro volte dall'omogenato con 5 ml di acetato di etile. La fase organica è stata portata a secco sotto vuoto, il residuo è stato disciolto in 4 ml di n-esano e caricato su una colonna di Silica Seppak (Waters): i componenti sono stati poi eluiti con esano-propanolo (70:30 v/v). Gli steroidi sono stati separati e ulteriormente purificati tramite cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) utilizzando una colonna di Lichrosorb-diolo di 5µm (250 per 4 mm) (Chemteck Analitica), con un gradiente discontinuo di 2-propanolo (da 0 a 30%) in n-esano. Il recupero (50-60%) degli steroidi attraverso le procedure di estrazione e di purificazione è stato controllato tramite l'aggiunta all'omogenato di corteccia cerebrale di quantità traccianti di steroidi triziati (8000 cpm). La fase organica è stata portata a secco sotto vuoto e il pellet è stato successivamente risospeso in esano-propanolo (70:30 v/v) prima dell'effettuazione del dosaggio. L'analisi quantitativa degli steroidi è stata effettuata mediante dosaggio radioimmunologico (RIA) con anticorpi specifici per il corticosterone (MP Biomedicals) e AP (fornito dal dott. R. H. Purdy dell'Università di San Diego, California). I dati sono espressi come ng di steroide per grammo di corteccia cerebrale o per ml di plasma e sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA). La comparazione multipla delle medie è stata effettuata utilizzando il test "post hoc" di Newman-Keuls.

## **WESTERN BLOT**

La tecnica del Western blot (Towbin et al., 1979) è stata utilizzata per valutare l'espressione dei recettori per i glucocorticoidi (GR) e per i mineralcorticoidi (MR), per il fattore di rilascio della corticotropina (CRF) e del suo recettore I (CRFR1).

Il procedimento prevede sei fasi principali:

- I. preparazione dell'estratto proteico;

2. separazione delle diverse proteine attraverso l'elettroforesi su gel di poliacrilammide;
3. trasferimento delle proteine su una membrana di PVDF (polivinildienedifluoruro);
4. blocco di siti non specifici nella membrana;
5. aggiunta degli anticorpi e reazione antigene-anticorpo;
6. visualizzazione del complesso antigene-anticorpo.

Per l'estrazione dei campioni ho utilizzato un kit di estrazione (Bio Basic Inc.) che permette la separazione delle proteine citoplasmatiche e di membrana.

La concentrazione proteica dei campioni da caricare sul gel è stata determinata attraverso il metodo di Lowry. Una volta ottenuto l'estratto proteico, i campioni (40µg/15µl) sono stati denaturati in un bagnetto a secco (70°C) per 10 min e posti in ghiaccio; infine caricati nel gel di poliacrilamide (Bis-Tris Midi-gel 4-12%, Life Technologies) dove le proteine sono state separate (200V per 40-60 minuti)

In seguito alla corsa, le proteine sono state trasferite su un supporto solido (membrana di PVDF) sotto l'azione di un campo elettrico (elettroblotting) a 75V per un'ora.

Al termine del trasferimento la membrana è stata lavata in tampone (TBS-T, pH 7,6) e successivamente incubata con il blocking (latte magro in polvere, 5% p/v) per il blocco dei siti non specifici nella membrana, per impedire che l'anticorpo successivamente utilizzato si leghi su di essi in maniera non specifica.

Al termine del blocking la proteina d'interesse è stata rilevata nella membrana attraverso la marcatura con l'anticorpo primario (incubazione overnight, 4°C). Per i miei esperimenti ho utilizzato un anticorpo primario specifico per il recettore GR (Santa Cruz diluizione 1:200), per i recettori MR (Santa Cruz diluizione 1:200), per il CRF (Santa Cruz diluizione 1:200) ed uno per il recettore CRFRI (Santa Cruz diluizione 1:200). Come standard

interno ho utilizzato un anticorpo per la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) (Millipore diluizione 1:5000).

La membrana è stata successivamente incubata con l'anticorpo secondario legato al marcatore HRP (horseradish peroxidase) per 1 ora a temperatura ambiente e sviluppata attraverso l'utilizzo di un kit (Millipore Luminata™ Forte Western HRP Substrate). Al termine dello sviluppo, la quantità delle proteine espresse è stata determinata misurando la densità ottica della bande attraverso l'utilizzo del Geliance 600 (Perkin Elmer). Le immagini acquisite sono state digitalizzate ed analizzate per mezzo di uno specifico software.

I dati sono stati normalizzati dividendo la densità ottica di ciascuna banda specifica relative per le proteine MR, GR, CRF e CRFRI con quelle corrispondenti dello standard interno GAPDH.

## **STATISTICA**

I dati sono stati analizzati mediante l'analisi di varianza (ANOVA). La comparazione multipla delle medie è stata effettuata utilizzando il test "post hoc" Newman-Keuls.

I dati derivanti dagli studi comportamentali sono stati analizzati mediante il test del t-di Student.

## RISULTATI

Nel nostro laboratorio sono stati studiati gli effetti dello stress cronico, utilizzando come modello animale l'isolamento sociale. Nel corso degli anni è stato studiato nei ratti maschi l'effetto dell'isolamento sociale sui livelli basali cerebrocorticali e plasmatici di AP, sullo stato emozionale, sull'attività basale dell'asse IIS e sulla risposta allo stress acuto indotta dal foot shock.

### EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SUI LIVELLI BASALI CEREBROCORTICALI E PLASMATICI DI AP E SULLO STATO EMOZIONALE NEI RATTI MASCHI.

L'isolamento sociale per 30 giorni induce una significativa riduzione dei livelli basali di AP nella corteccia cerebrale del ratto maschio (Figura 12A) (Serra et al., 2000). Coerentemente con quanto riscontrato nella corteccia cerebrale, l'isolamento sociale riduce significativamente i livelli basali plasmatici di allopregnanolone rispetto ai ratti di controllo stabulati in gruppo (Figura 12B) (Serra et al. 2005).

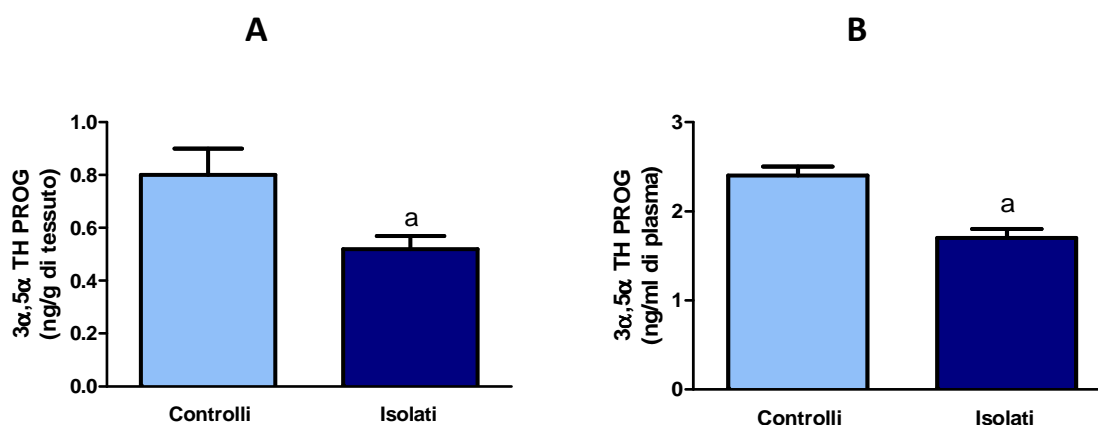


Figura 12 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli di AP nella corteccia cerebrale (A) e nel plasma (B) di ratto maschio. <sup>a</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media ± SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

La riduzione dei livelli basali di AP è associata ad un alterato stato emozionale e ad un comportamento ansioso; infatti, l'isolamento sociale induce una riduzione significativa del

tempo speso nei bracci aperti nel test dell'elevated plus maze (Figura 13A) e del numero dei licking periods nel test di Vogel (Figura 13B) rispetto ai controlli (Serra et al.2000).

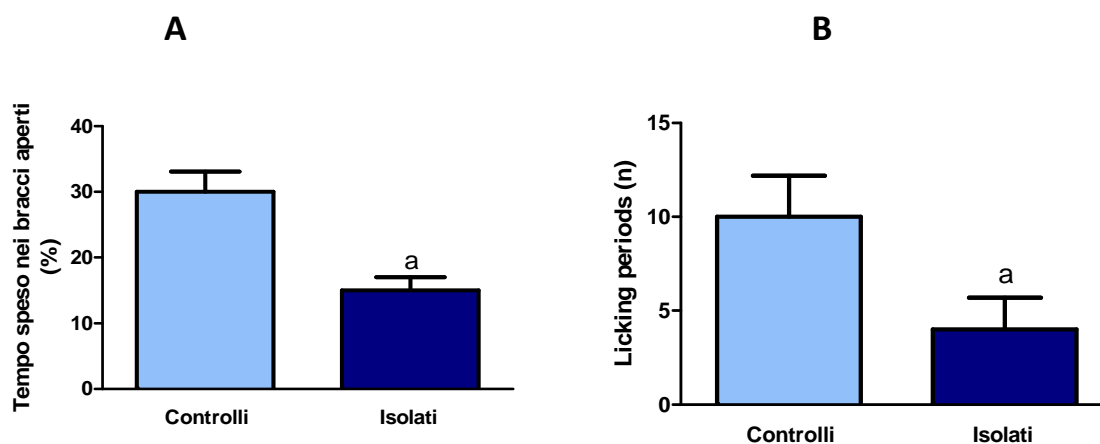


Figura 13 - Effetto dell'isolamento sociale nel test dell'elevated plus maze (A) e nel test di Vogel (B) nel ratto maschio. <sup>a</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media ± SEM di 25 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

### **EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SULL'ATTIVITÀ BASALE DELL'ASSE IIS NEI RATTI MASCHI.**

Per valutare l'attività dell'asse IIS sono state misurate le concentrazioni basali plasmatiche di CTS: i ratti socialmente isolati hanno mostrato una riduzione significativa delle concentrazioni plasmatiche di questo steroide rispetto al gruppo di controllo (Figura 14A). E' stato valutato inoltre l'effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici dell'ACTH. Come mostra la Figura 14B, l'isolamento sociale determina una riduzione significativa della concentrazione di ACTH rispetto ai ratti stabulati in gruppo (Serra et al. 2005).

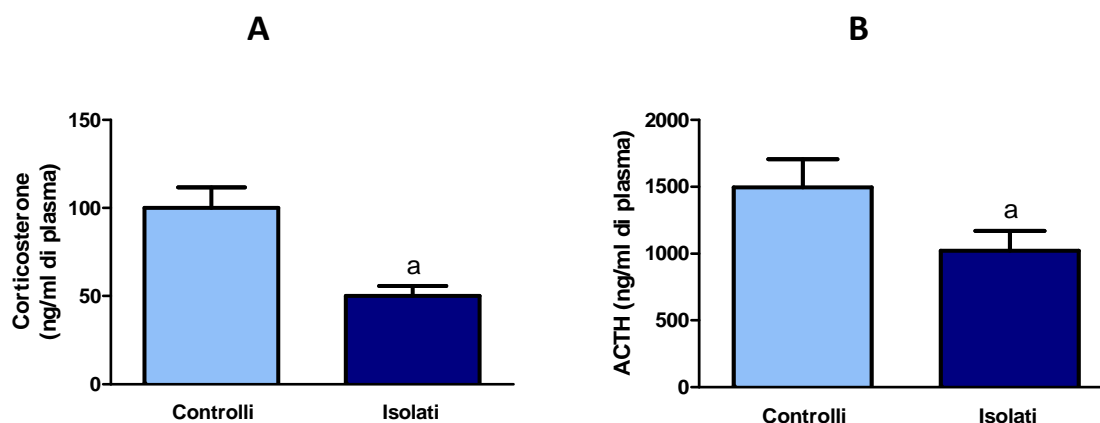


Figura 14 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici di CTS (A) e di ACTH (B) nel ratto maschio. <sup>a</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

Successivamente è stata misurata l'espressione, nell'ipotalamo di ratti socialmente isolati, del CRH e abbiamo riscontrato un aumento, sebbene non significativo, dell'espressione di CRH rispetto ai ratti di controllo (Figura 15).

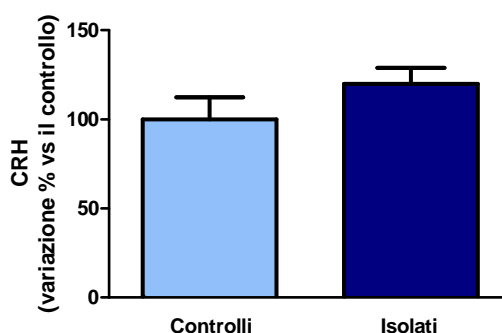


Figura 15 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli di CRH nell'ipotalamo di ratto maschio. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

L'attività basale dell'asse IIS è stata inoltre valutata attraverso il DST. La Figura 16 mostra i livelli plasmatici di CTS in seguito alla somministrazione di DEX: come si può osservare, la somministrazione acuta di DEX (500 $\mu$ g/kg) determina, nei ratti isolati, una significativa riduzione dei livelli di CTS rispetto ai livelli basali, riduzione meno marcata rispetto agli animali stabulati in gruppo (Serra et al.2005).

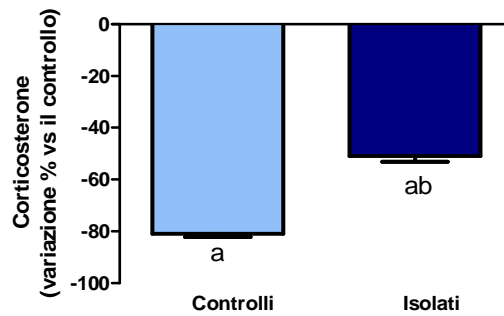


Figura 16 - Effetto del DEX sui livelli plasmatici di CTS nei ratti maschi socialmente isolati. Il DEX è stato somministrato alla dose di 500 µg/kg e gli animali sono stati sacrificati 150 minuti dopo l'iniezione. <sup>a</sup>p<0.01 vs i rispettivi controlli; <sup>b</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media ± SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

### EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE NELLA RISPOSTA ALLO STRESS ACUTO INDOTTO DAL FOOT-SHOCK NEI RATTI MASCHI.

E' stata inoltre valutata quale fosse la risposta ad un nuovo stimolo stressante acuto in seguito all'isolamento sociale. Nei ratti maschi il foot-shock stress determina un aumento significativo dei livelli plasmatici di CTS in entrambi i gruppi sperimentali (Serra e coll., 2000); tale incremento risulta però significativamente maggiore nei ratti socialmente isolati rispetto agli animali di controllo (Figura 17).

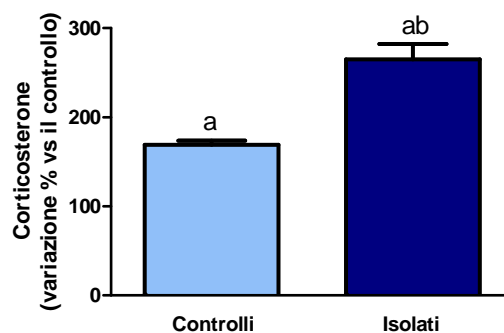


Figura 17 - Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici di CTS nel ratto maschio socialmente isolato. <sup>a</sup>p<0.01 vs i rispettivi controlli; <sup>b</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media ± SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

La risposta ad un nuovo stimolo stressante acuto nei ratti maschi socialmente isolati è stata valutata anche attraverso la misurazione dei livelli di AP; il foot-shock stress determina, come mostra la Figura 18, un aumento significativo dei livelli plasmatici (A) e



cerebrocorticali (B) di questo steroide in entrambi i gruppi sperimentali (Serra e coll., 2000); tale incremento risulta però significativamente maggiore nei ratti socialmente isolati rispetto agli animali di controllo.

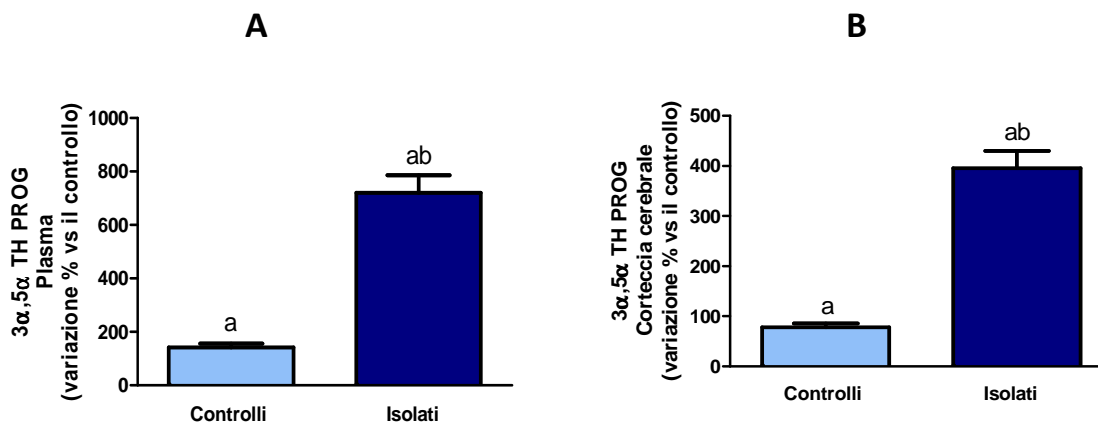


Figura 18 - Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici (A) e cerebrocorticali (B) di AP nel ratto maschio socialmente isolato. <sup>a</sup>p<0.01 vs i rispettivi controlli; <sup>b</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media ± SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

Durante la mia esperienza in laboratorio come dottoranda di ricerca ho approfondito lo studio della problematica dell'isolamento sociale e ho voluto applicare questo modello animale di stress cronico, nei ratti femmina, per valutare eventuali differenze di genere.

### **EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SUI LIVELLI BASALI CEREBROCORTICALI E PLASMATICI DI AP E SULLO STATO EMOZIONALE NEI RATTI FEMMINA.**

Coerentemente con i risultati ottenuti precedentemente nei ratti maschi, i ratti femmina isolati per 30 giorni immediatamente dopo lo svezzamento mostrano una significativa riduzione dei livelli basali cerebrocorticali e plasmatici di AP rispetto ai ratti femmina stabulati in gruppo (Figura 19 A e B, rispettivamente).

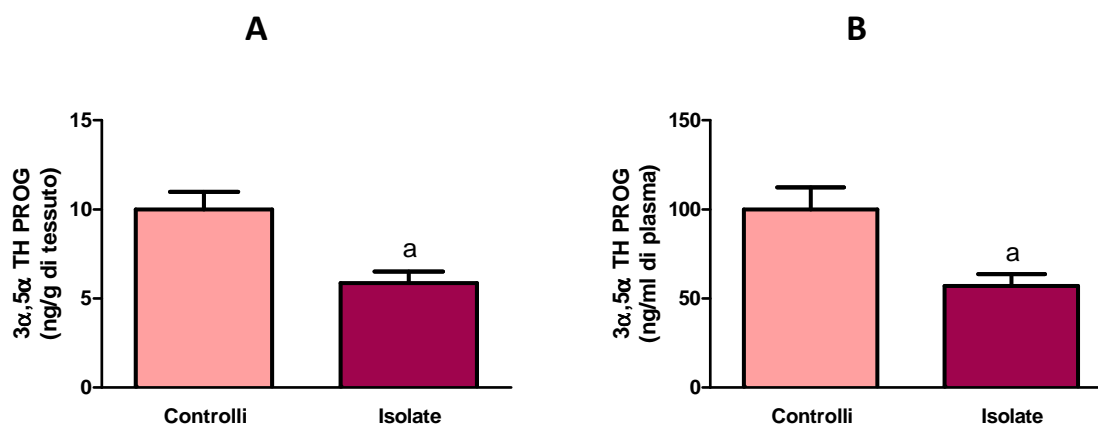


Figura 19 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli di AP cerebrocorticali (A) e plasmatici (B) di ratti femmina. <sup>a</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

La riduzione dei livelli basali di AP è associata ad un alterato stato emozionale e ad un comportamento ansioso; infatti, l'isolamento sociale induce nei ratti femmina, così come riscontrato nei maschi, una riduzione significativa del tempo speso nei bracci aperti nel test dell'elevated plus maze (Figura 20A) e del numero dei licking periods nel test di Vogel (Figura 20B).

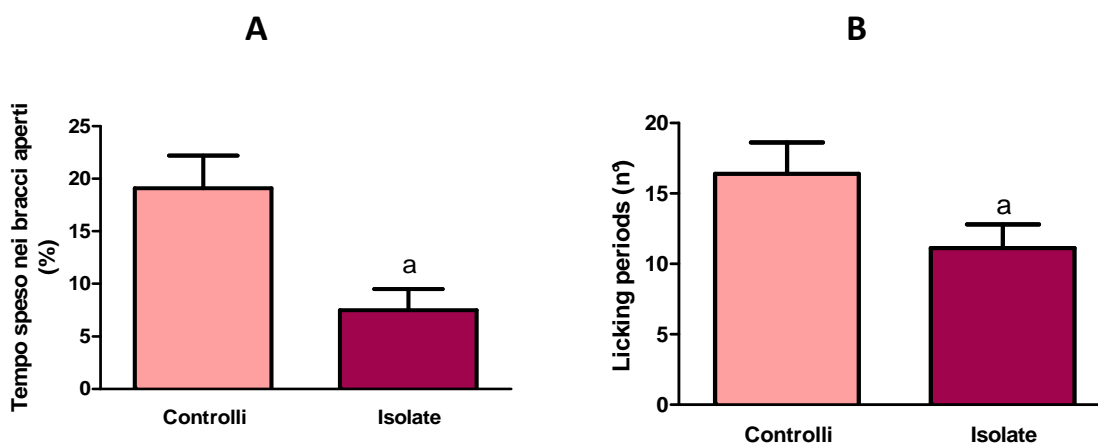


Figura 20 - Effetto dell'isolamento sociale nel test dell'elevated plus maze (A) e nel test di Vogel (B) nei ratti femmina. <sup>a</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 25 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

## EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SULL'ATTIVITÀ BASALE DELL'ASSE IIS NEI RATTI FEMMINA.

Per valutare l'attività dell'asse IIS ho misurato le concentrazioni basali plasmatiche di CTS nei ratti femmina socialmente isolati, e, come rilevato nei ratti maschi, si ha una riduzione significativa delle concentrazioni plasmatiche di questo steroide rispetto al gruppo di controllo (Figura 21).

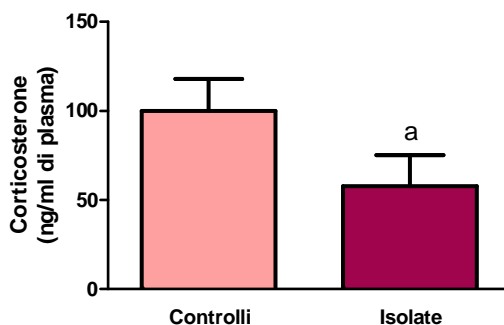


Figura 21 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici di CTS nei ratti femmina. <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

Inoltre ho voluto misurare, nell'ipotalamo di ratti femmina, l'espressione del CRH; l'isolamento sociale non determina alcuna variazione significativa nell'espressione del CRH ipotalamico rispetto ai controlli (Figura 22).

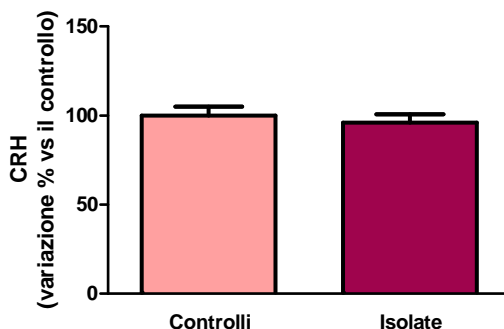


Figura 22 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli di CRH nell'ipotalamo di ratti femmina. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

Nei ratti femmina socialmente isolati ho voluto valutare inoltre l'espressione del recettore del CRH di tipo I nell'ipofisi, riscontrando una riduzione significativa della sua espressione rispetto ai ratti di controllo stabulati in gruppo. (Figura 23)

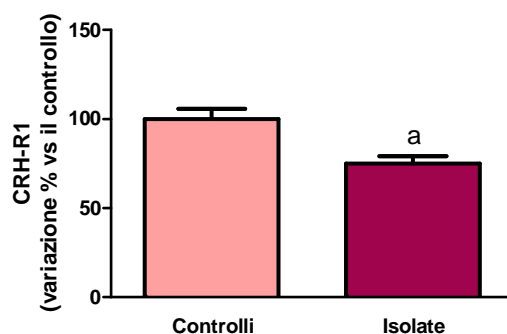


Figura 23 - Effetto dell'isolamento sociale sull'espressione del recettore CRH-R1 nell'ipotalamo di ratti femmina. <sup>a</sup>p<0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

### EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SUI LIVELLI IPOCAMPALI DEI GR E DEGLI MR NEI RATTI FEMMINA.

Considerando il coinvolgimento dei GR e degli MR nel feedback negativo dell'asse IIS, ho voluto valutare i livelli di questi recettori nell'ippocampo di ratti femmina socialmente isolati. Come mostra la Figura 24, l'isolamento sociale induce, nell'ippocampo, un aumento dell'espressione dei GR (A) ed una riduzione degli MR (B); entrambe le variazioni sono risultate statisticamente significative.

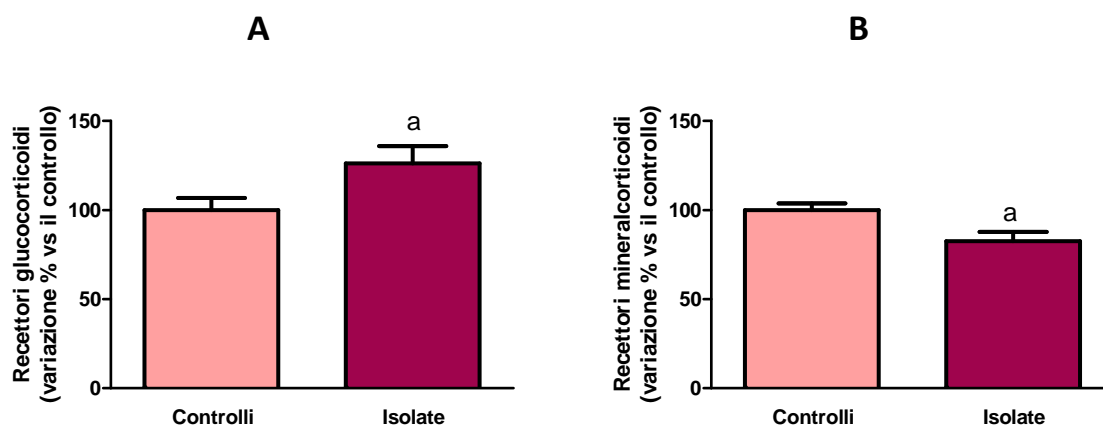


Figura 24 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli peptidici dei recettori per i glucocorticoidi (A) e per i mineralcorticoidi (B) nell'ippocampo di ratti femmina. <sup>a</sup>p<0.05 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

## EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE NELLA RISPOSTA ALLO STRESS ACUTO INDOTTO DAL FOOT-SHOCK NEI RATTI FEMMINA.

Successivamente ho valutato la risposta ad un nuovo stimolo stressante acuto nei ratti femmina socialmente isolati misurando i livelli di AP; come mostra la Figura 25, il foot-shock stress non determina alcuna variazione dei livelli plasmatici (A) e cerebrocorticali (B) di questo steroide in entrambi i gruppi sperimentali.

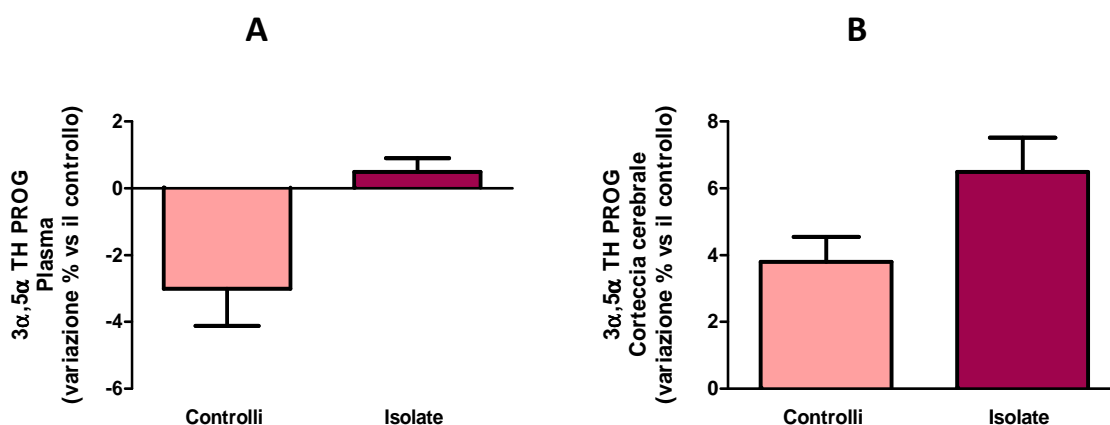


Figura 25 - Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici (A) e cerebrocorticali (B) di AP nei ratti femmina socialmente isolati. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

Ho inoltre voluto valutare la risposta steroidogenica indotta dallo stress sui livelli di CTS nei ratti femmina socialmente isolati. La Figura 26 mostra che, così come riscontrato nei maschi, l'effetto steroidogenico indotto dal foot-shock stress è significativamente maggiore nelle femmine isolate rispetto agli animali di controllo.

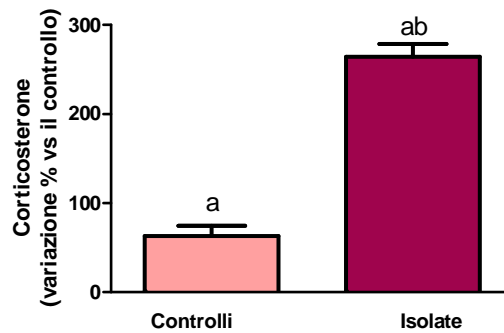


Figura 26 - Effetto dell'esposizione al foot-shock stress sui livelli di CTS nei ratti femmina socialmente isolati. Gli animali sono stati sacrificati 30 minuti dopo l'inizio dello stress. <sup>a</sup>p <0.01 vs i rispettivi controlli; <sup>b</sup>p <0.01 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

### **EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SUI LIVELLI PLASMATICI DI AP, CTS, 17 $\beta$ -ESTRADIOLO, OSSITOCINA E VASOPRESSINA DURANTE LA GRAVIDANZA ED IL POST PARTUM.**

Successivamente sono andata a studiare, nei ratti femmina socialmente isolati, l'assetto ormonale durante la gravidanza ed il post partum. Come mostra la Figura 27A, l'isolamento sociale determina una riduzione significativa dei livelli plasmatici di AP nelle ratte vergini utilizzate come controlli, mentre la gravidanza induce, in entrambi i gruppi sperimentali, un aumento significativo dei livelli di AP, livelli che si riducono nei giorni 3 e 8 post partum, sia nei ratti femmina isolati che in quelli di controllo. La concentrazione plasmatica di CTS viene modificata, in seguito all'isolamento sociale, solo nelle ratte vergini (Figura 27B). Le concentrazioni di 17 $\beta$ - estradiolo si riducono durante la gravidanza, per poi aumentare nel post partum in entrambi i gruppi sperimentali (Figura 27C). I livelli plasmatici di ossitocina si riducono al 3° giorno post partum in entrambi i gruppi sperimentali (Figura 27D). Non sono state riscontrate variazioni significative nelle concentrazioni plasmatiche di vasopressina, sia nei ratti femmina socialmente isolati che in quelli di controllo (Figura 27E).

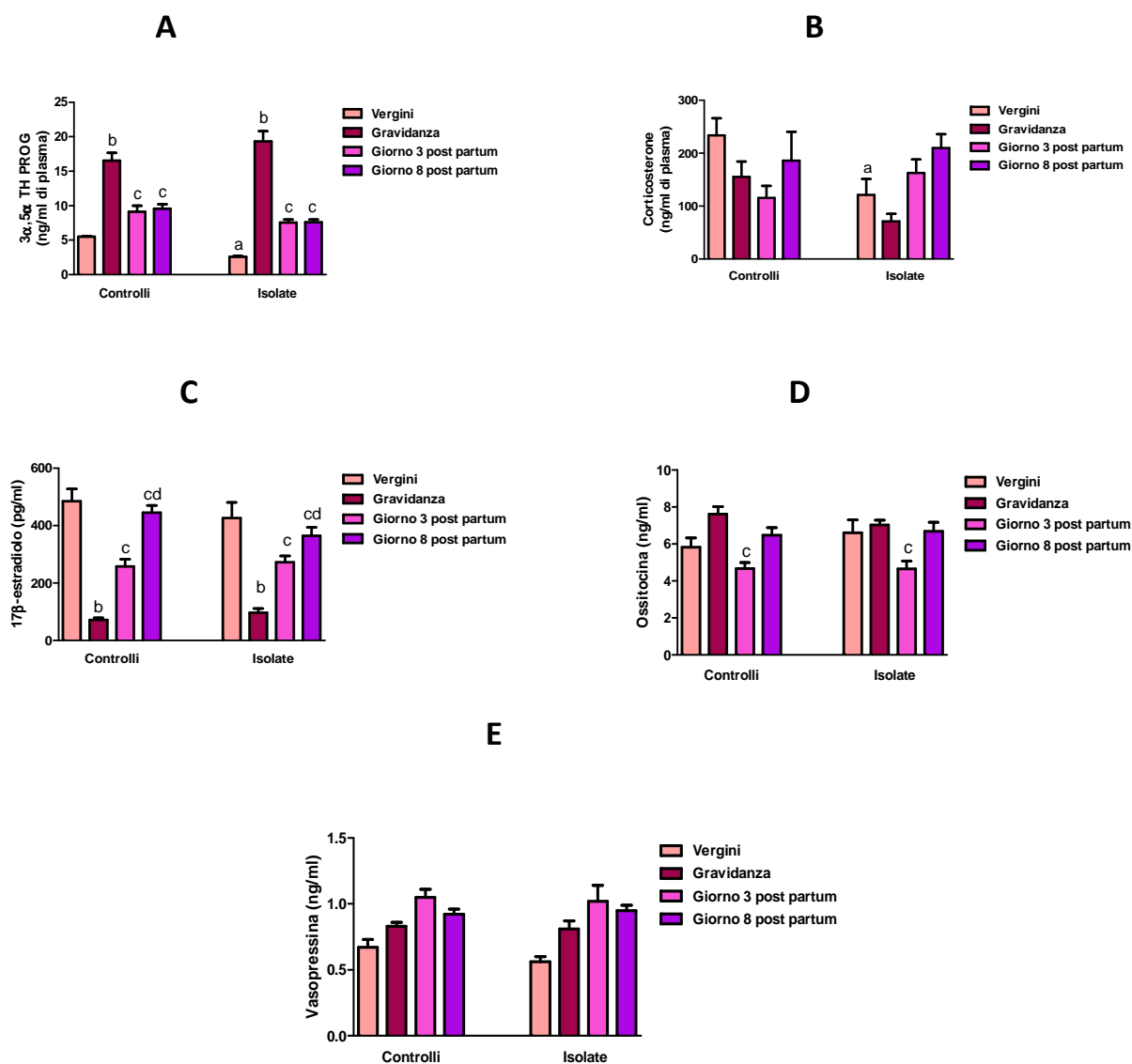


Figura 27 - Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici di AP, CTS, 17 $\beta$ -estradiolo, ossitocina e vasopressina in ratti femmina vergini, gravide e durante i giorni 3 e 8 post partum. <sup>a</sup>p<0.05 vs i controlli stabulati in gruppo (controlli-vergini); <sup>b</sup>p<0.05 vs il rispettivo gruppo vergini; <sup>c</sup>p<0.05 vs il rispettivo gruppo gravidanza. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

## EFFETTO DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SULLA QUALITÀ DELLE CURE MATERNE.

Per valutare se lo stato emozionale alterato mostrato nei test comportamentali potesse influenzare, nei ratti femmina isolati, la qualità delle cure materne, i ratti femmina di entrambi i gruppi sperimentali sono stati osservate dal 1° al 14° giorno dopo il parto; come mostra la Figura 28, l'isolamento sociale determina una riduzione significativa della frequenza dell' "arched-back nursing", comportamento che definisce l'affettuosità delle madri verso la propria prole.

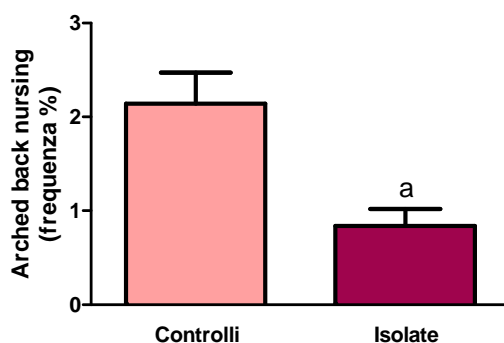


Figura 28 - Effetto dell'isolamento sociale sulla frequenza del comportamento materno arched back nursing. <sup>a</sup>p<0.05 vs i ratti stabulati in gruppo (controlli). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

### EFFETTO TRANSGENERAZIONALE DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SUI LIVELLI BASALI DI AP.

Per valutare se vi fosse un effetto transgenerazionale dell'isolamento sociale, ho misurato i livelli basali di AP nei figli dei ratti socialmente isolati, non sottoposti ad isolamento sociale, e nei relativi controlli (figli dei ratti stabulati in gruppo).

Come mostra la Figura 29, nella corteccia cerebrale dei figli maschi dei ratti socialmente isolati vi è un aumento significativo dei livelli di AP rispetto agli animali di controllo.

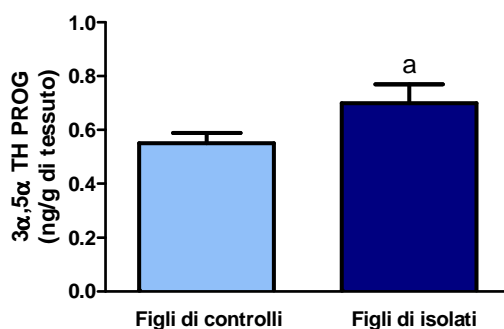


Figura 29 - Livelli cerebrocorticali di AP nei figli maschi dei ratti socialmente isolati. <sup>a</sup>p<0.05 vs i figli di controlli. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

### EFFETTO TRANSGENERAZIONALE DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SULLA SENSIBILITÀ AD UNO STRESS ACUTO.

Ho inoltre valutato la sensibilità ad uno stress acuto nei figli dei ratti socialmente isolati, misurando la risposta steroidogena nel tempo dei livelli plasmatici di CTS; a questo



scopo i figli maschi dei ratti socialmente isolati sono stati esposti al foot shock stress e sacrificati a diversi tempi dopo l'esposizione allo stress. Come mostra la Figura 30, il foot shock determina un incremento dei livelli di CTS a 5, 15 e 30 minuti in entrambi i gruppi sperimentali; la percentuale di incremento dei livelli plasmatici di CTS è però significativamente ridotta nei figli di isolati rispetto ai figli di controlli al 15° e al 30° minuto, per ritornare ai valori di controllo già a 60 minuti dopo l'esposizione al foot shock stress.

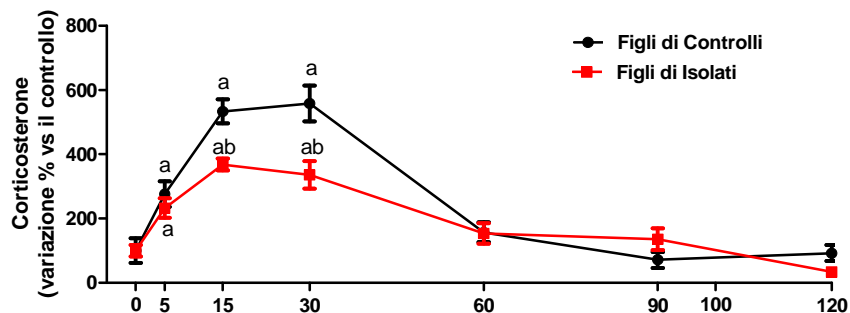


Figura 30 - Effetto del foot shock stress sui livelli plasmatici di CTS nei figli maschi di ratti socialmente isolati. <sup>a</sup>p<0.05 vs il rispettivo controllo non sottoposto al foot-shock stress (tempo 0). <sup>b</sup>p<0.05 vs i rispettivi figli di controlli. I dati rappresentano la media ± SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

### **EFFETTO TRANSGENERAZIONALE DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SULLA SENSIBILITÀ AD UNO STRESS CRONICO.**

E' generalmente noto come la resilienza rappresenti l'abilità di affrontare uno stress cronico senza che questo comporti delle alterazioni molecolari e comportamentali negative (Russo et al., 2012).

Ho quindi valutato la resilienza dei figli degli animali isolati allo stress cronico indotto dall'isolamento sociale. Come atteso (Serra et al., 2000), i figli dei controlli mostrano una riduzione significativa dei livelli plasmatici di AP in seguito a 30 giorni di isolamento, mentre nei figli dei ratti isolati lo stress cronico indotto dall'isolamento sociale determina

una modesta riduzione, non significativa, rispetto ai propri controlli stabulati in gruppo (Figura 31).

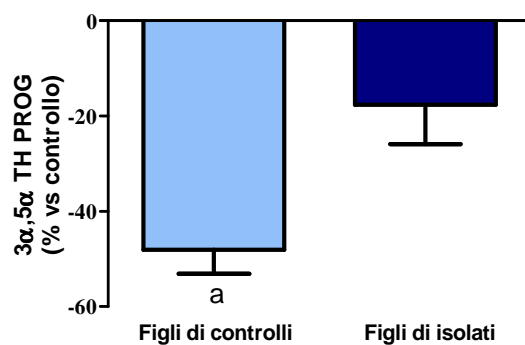


Figura 31 - Effetto dell'isolamento sui livelli plasmatici di AP nei figli maschi di ratti socialmente isolati. I dati sono espressi come percentuale di variazione verso i rispettivi controlli stabulati in gruppo <sup>a</sup>p<0.01 vs i rispettivi controlli. I dati rappresentano la media ± SEM di 15 ratti per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls.

## DISCUSSIONE

Coerentemente a quanto dimostrato da precedenti studi condotti nel ratto maschio (Serra et al., 2000), i dati ottenuti nei miei esperimenti dimostrano che lo stress cronico indotto dall'isolamento sociale è in grado di ridurre significativamente i livelli basali cerebrocorticali e plasmatici di AP e i livelli plasmatici di CTS nel ratto femmina.

Come già detto in precedenza, l'AP è un potente modulatore allosterico positivo del recettore GABA<sub>A</sub> (Majewska, 1992; Lambert et al., 1995) e la sua somministrazione negli animali, sia per via sistemica che per via intracerebroventricolare, induce effetti ansiolitici, sedativo-ipnotici e anticonvulsivanti (Kokate et al., 1994; Bitran et al., 1995; Concas et al., 1996). Questo suggerisce che la riduzione dei livelli di AP nel cervello di ratto femmina sottoposto ad isolamento sociale, possa essere correlata ad una diminuzione della trasmissione GABAergica (Serra et al., 2000) ed ad un aumento dello stato conflittuale. Infatti, le femmine socialmente isolate hanno mostrato un comportamento ansioso nel test dell'elevated plus maze, trascorrendo più tempo nei bracci chiusi, rispetto alle femmine stabulate in gruppo. Coerentemente, anche nel test di Vogel, le femmine isolate hanno mostrato un numero di bevute con punizione significativamente inferiore a quello osservato nei controlli, ad indicare uno stato di conflitto in presenza di uno stimolo stressante. Anche nei ratti maschi isolati, la riduzione dei livelli cerebrocorticali di AP si correlava ad un alterato stato emozionale (Serra et al., 2000). Analogamente alle femmine isolate, i maschi sottoposti ad isolamento sociale, trascorrono più tempo nei bracci chiusi nel test dell'Elevated plus maze, suggerendo un comportamento ansioso, ed effettuano un numero di bevute con punizione ridotto rispetto ai ratti maschi di controllo.

Come dimostrato precedentemente, la riduzione dei livelli di steroidi neuroattivi indotta dall'isolamento sociale è associata ad una modificazione dell'espressione di alcune subunità del recettore GABA<sub>A</sub> che presumibilmente si traduce nella formazione di nuovi recettori

aventi differente conformazione (Serra et al., 2006) e nella riduzione della trasmissione GABAergica (Serra et al., 2000). La correlazione positiva tra livelli cerebrocorticali di AP e stato emozionale sembra essere confermata dall'evidenza che i ratti femmina di entrambi i gruppi, in cui i livelli di AP sono fisiologicamente più elevati, mostrano nel test di Vogel un numero significativamente superiore di bevute con punizione rispetto ai ratti maschi. Tuttavia, in entrambi i sessi la riduzione dei livelli di AP che si ha nei ratti socialmente isolati porta ad uno stato conflittuale e i miei risultati dimostrano, dunque, che non ci sono differenze di genere nell'effetto dell'isolamento sociale.

Come già detto, nel ratto maschio, lo stress acuto induce un aumento della sintesi e secrezione degli steroidi (Purdy et al., 1991; Barbaccia et al., 1996,1997), un effetto potenziato dall'isolamento sociale (Serra et al., 2000, 2003). Coerentemente con il ruolo di modulatore positivo della trasmissione GABAergica, esercitata dall'AP (Majewska, 1992), si ritiene che l'aumento dei suoi livelli, periferici e centrali, indotto dallo stress, abbia il significato di ripristinare la funzione del recettore  $GABA_A$  ridotta in seguito allo stress (Biggio et al., 2001)

I risultati ottenuti dimostrano che, al contrario di quanto osservato nel maschio (Serra et al., 2000), nei ratti femmina sorprendentemente lo stress acuto indotto dal foot shock non ha modificato i livelli basali di AP nel cervello e nel plasma. Infatti, è generalmente accettato che le femmine siano meno sensibili allo stress rispetto ai maschi.

Il mancato aumento dei livelli di AP dopo uno stress, potrebbe sempre attribuirsi al fatto che i livelli circolanti di progesterone e del suo metabolita AP sono fisiologicamente più elevati nella femmina.

In accordo, studi precedenti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che i ratti maschi trattati cronicamente con progesterone, in cui i livelli cerebrocorticali di AP sono

aumentati (Dazzi et al., 2002), mostrano una ridotta risposta allo stress acuto (dati non pubblicati).

Tuttavia, dal momento che questa risposta non è stata osservata nei ratti femmina socialmente isolati, i cui livelli basali di AP sono ridotti, è plausibile ipotizzare differenze di genere nei meccanismi coinvolti nella steroidogenesi. In accordo, è stato dimostrato che l'estradiolo modula l'attività dell'enzima  $3\beta$ -HSD (Pradhan et al., 2010).

Lo stress acuto indotto dal foot shock ha portato invece ad un aumento significativo dei livelli plasmatici di CTS in entrambi i gruppi sperimentali, aumento che però risulta significativamente maggiore nelle femmine isolate rispetto agli animali di controllo.

L'attività basale e l'attivazione dell'asse IIS indotta dallo stress, è modulata dalla secrezione del CRH da parte dell'ipotalamo, che attraverso l'attivazione dei CRH-RI, attiva la secrezione dell'ACTH che a sua volta stimola la secrezione degli ormoni della corticale del surrene. Poiché gli steroidi non si accumulano in modo apprezzabile nella ghiandola, si ipotizza che l'azione dell'ACTH nell'aumentare la produzione degli ormoni steroidei sia prevalentemente mediata a livello della biosintesi ex novo.

Le femmine socialmente isolate non mostrano modificazioni apprezzabili nei livelli ipotalamici di CRH rispetto ai controlli, tuttavia l'espressione del CRH-RI nell'ipofisi delle femmine isolate è significativamente ridotta. Tale riduzione potrebbe tradursi in una riduzione della secrezione di ACTH e dunque essere responsabile della riduzione dei livelli basali di CTS misurata nel plasma delle femmine isolate. In accordo con i bassi livelli circolanti di CTS, l'espressione dei GR ippocampali è più elevata. Questo risultato è in accordo con altri studi che mostrano che lo stress cronico aumenta l'espressione dei GR nella CAI dei ratti femmina (Kitraki et al., 2004). L'espressione dei livelli degli MR nell'ippocampo di questi animali, risulta al contrario, ridotta. Gli MR ippocampali hanno un ruolo importante nel meccanismo cellulare della modulazione del feedback rapido, infatti i

corticosteroidi esercitano un effetto modulatorio positivo sulle sinapsi glutammatergiche eccitatorie, attraverso un'attivazione diretta degli MR presinaptici (Karst et al., 2005). Dal momento che, l'attivazione di questi recettori aumenta l'input glutammatergico sugli interneuroni GABAergici dell'ipotalamo, potenziando così l'inibizione sui neuroni al CRH (Tasker and Herman., 2011), la down-regulation degli MR nell'ippocampo delle femmine socialmente isolate, potrebbe portare, in seguito allo stress acuto, ad una secrezione di CTS prolungata nel tempo. La valutazione di questa ipotesi è attualmente in corso.

Lo stress cronico indotto dall'isolamento sociale non ha modificato il pattern secretorio ormonale durante la gravidanza e il post partum. Tuttavia, in accordo con lo stato emozionale alterato, le femmine isolate mostrano una riduzione dell'arched back nursing, uno dei comportamenti che definiscono l'affettuosità delle madri verso la propria prole. Sorprendentemente, questo si traduce in un effetto positivo sulla prole. I risultati indicano che i figli adulti delle madri isolate mostrano un aumento dei livelli cerebrocorticali di AP rispetto ai figli di ratti di controllo (Pisu et al.2013). Considerando il ruolo di modulatore positivo della trasmissione GABAergica svolto dall'AP, gli aumentati livelli cerebrocorticali di questo steroide suggeriscono che in questi animali lo stato emozionale non sia alterato. In accordo, nel test dell'elevated plus maze, i figli di ratti isolati non mostrano differenze rispetto ai figli di ratti stabulati in gruppo, nel tempo speso nei bracci aperti (Pisu et al., 2013); allo stesso modo, non vi sono differenze significative nel numero di licking periods misurato nel test di Vogel (Pisu et al.2013), dimostrando quindi uno stato emozionale simile tra i due gruppi sperimentali. È dunque ipotizzabile che nei figli degli animali isolati la trasmissione GABAergica non sia alterata.

Coerentemente, i figli di ratti isolati risultano essere meno sensibili allo stress acuto indotto dal foot shock, come dimostrato dalla riduzione della percentuale di incremento dei livelli plasmatici di CTS rispetto ai figli di controlli. Questo risultato suggerisce che i figli degli animali isolati sono più resilienti allo stress.

E' ormai generalmente accettato, che la resilienza sia l'abilità nell'evitare cambiamenti comportamentali deleteri che potrebbero esserci in risposta ad uno stress cronico e questo si raggiunge attraverso adattamenti molecolari che portano verso la normale funzione comportamentale (see for review Russo et al., 2012) In base a questa osservazione e a conferma della nostra ipotesi sulla resilienza allo stress dei figli degli animali isolati è l'evidenza preliminare che questi animali, sottoposti ad uno stress cronico quale quello indotto dall'isolamento sociale, risultano meno sensibili a tale stress, come dimostrato dalla mancata riduzione dei livelli plasmatici di AP evidenziabile invece negli animali di controllo.

## BIBLIOGRAFIA

- Ader R., Friedman S.B. (1964) *Psychol. Rep.* 15: 535-541
- Ahima, R.S., Lawson, A.N., Osei, S.Y., Harlan, R.E., 1992. Sexual dimorphism in regulation of type II corticosteroid receptor immunoreactivity in the rat hippocampus. *Endocrinology* 131, 1409–1416.
- Akana, S.F., Scribner, K.A., Bradbury, M.J., Strack, A.M., Walker, C.-D. and Dallman M.F. (1992) *Endocrinology* 131: 585-594
- Anisman H., Zaharia M.D., Meaney M.J., Merali Z. (1998) *Int. J. Dev Neurosci.* 16: 149-164
- Arling GL, Harlow HF. Effects of social deprivation on maternal behavior of rhesus monkeys. *J Comp Physiol Psychol.* 1967 Dec;64(3):371-7.
- Bagatell, C.J., Heiman, J.R., Rivier, J.E., Bremner, W.J., 1994. Effects of endogenous testosterone and estradiol on sexual behavior in normal young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 711–716.
- Bale TL. Stress sensitivity and the development of affective disorders. *Horm Behav.* 2006 Nov;50(4):529-33.
- Barbaccia M.L., Roscetti G., Trabucchi M., Mostallino M.C., Concas A., Purdy R.H., Biggio G. (1996) *Neuroendocrinology* 63, 166-172
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Concas A, Biggio G. *Br J Pharmacol.* 1997 Apr;120(8):1582-8
- Barha C.K, Brummelte S, Liebich S.E, Liisa A.M. Galea. Chronic restraint stress in adolescence differentially influences hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and adult hippocampal neurogenesis in male and female rats. *Hippocampus* 21:1216-1227 (2011).
- Beato M, Sánchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev.* 1996; 17:587-609.
- Belelli D, Peden DR, Rosahl TW, Wafford KA, Lambert JJ. 2005. Extrasynaptic gabaa receptors of thalamocortical neurons: A molecular target for hypnotics. *J Neurosci* 25: 11513–11520.
- Biggio G, Follesa P, Sanna E, Purdy RH, Concas A. GABAA-receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. *Int Rev Neurobiol.* 2001;46:207-41.
- Bingaman, E.W., Magnuson, D.J., Gray, T.S., Handa, R.J., 1994. Androgen inhibits the increases in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-immunoreactivity following gonadectomy. *Neuroendocrinology* 59, 228–234.
- Bitran D, Shiekh M, McLeod M. (1995) Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors, *J Neuroendocrinol.*; 7(3):171-7.



- Braestrup C., Nielsen M., Nielsen E.B., Lyon M. (1979) *Psychopharmacol.* 65: 273-277
- Burgess, L.H., Handa, R.J., 1992. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 131, 1261–1269.
- Burgin R., Weizman R., Gavish M. (1996) *Neuropsychobiol.* 33: 28-31
- Burleson, M.H., Malarkey, W.B., Cacioppo, J.T., Poehlmann, K.M., Kiecolt-Glaser, J.K., Berntson, G.G., Glaser, R., 1998. Postmenopausal hormone replacement: effects on autonomic, neuroendocrine, and immune reactivity to brief psychological stressors. *Psychosom. Med.* 60, 17–25.
- Caldji C, Diorio J, Anisman H, Meaney MJ. Maternal behavior regulates benzodiazepine / GABAA receptor subunit expression in brain regions associated with fear in BALB / c and C57BL / 6 mice. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1344–1352.
- Caldji C, Diorio J, Meaney MJ. Variations in maternal care alter GABA(A)receptor subunit expression in brain regions associated with fear. *Neuropsychopharmacology.* 2003 Nov; 28(11):1950-9.
- Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology.* 2000 Mar;22(3):219-29.
- Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Francis D., Plotsky P., Meaney M.J.(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5335–40
- Carey, M.P., Deterd, C.H., de Koning, J., Helmerhorst, F., de Kloet, E.R., 1995. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J. Endocrinol.* 144, 311–321.
- Champagne F., Francis D., Mar A., Meaney M. (2003) *Physiol. Behav.* 79:359-371
- Champagne FA, Meaney MJ. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry.* 2006 Jun 15;59(12):1227-35.
- Chowen, J.A., Argente, J., Vician, L., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1990. Pro-opiomelanocortin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52, 581–588.
- Clinton SM, Vázquez DM, Kabbaj M, Kabbaj MH, Watson SJ, Akil H. Individual differences in novelty-seeking and emotional reactivity correlate with variation in maternal behavior. *Horm Behav.* 2007 May;51(5):655-64.
- Collins, A., Frankenhaeuser, M., 1978. Stress responses in male and female engineering students. *J. Hum. Stress* 4, 43–48.

- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27; 95(22):13284-9
- Concas A, Mostallino MC, Perra C, Lener R, Roscetti G, Barbaccia ML, Purdy RH, Biggio G. (1996) Functional correlation between allopregnanolone and [35S]-TBPS binding in the brain of rats exposed to isoniazid, pentylenetetrazol or stress, Br J Pharmacol.; 118(4):839-46.
- Dalrymple-Alford J.C., Benton D. (1984) Quat. J. Experim. Psychol. 36B: 27-38
- Dazzi L, Serra M, Seu E, Cherchi G, Pisu MG, Purdy RH, Biggio G. Progesterone enhances ethanol-induced modulation of mesocortical dopamine neurons: antagonism by finasteride. J Neurochem. 2002 Dec;83(5):1103-9.
- de Kloet ER, Reul JM. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. Psychoneuroendocrinology. 1987; 12:83-105.
- de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. Neurosci Biobehav Rev. 2005; 29:271-281.
- De Kloet R, Wallach G, McEwen BS. Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. Endocrinology. 1975 Mar;96(3):598-609.
- Della Vedova, 1999
- Della Vedova, 2005
- Dienstbier, R.A., 1989. Arousal and physiological toughness: implications for mental and physical health. Psychol. Rev. 96, 84–100.
- Doggrell SA. 2003. Recurrent hope for the treatment of preterm delivery. Expert Opin Pharmacother 4:2363–2366.
- Dominguez R, Micevych P. Estradiol rapidly regulates membrane estrogen receptor alpha levels in hypothalamic neurons. J Neurosci. 2010 Sep 22;30(38):12589-96.
- Duncan, M.R., Duncan, G.R., 1979. An in vivo study of the action of antigluocorticoids on thymus weight ratio, antibody titre and the adrenal-pituitary-hypothalamus axis. J. Steroid Biochem. 10, 245–259.
- Earle, T.L., Linden, W., Weinberg, J., 1999. Differential effects of harassment on cardiovascular and salivary cortisol stress reactivity and recovery in women and men. J. Psychosom. Res. 46, 125–141.
- Einon D, Stewart J, Atkinson S, Morgan M. Effect of isolation on barbiturate anaesthesia in the rat. Psychopharmacology (Berl). 1976 Oct 20;50(1):85-8.
- Einon D., Morgan M.J. (1977) Dev. Psychobiol. 10: 123-132

- El Hani, A., Dalle, M., Delost, P., 1980. Role of testosterone in the sexual dimorphism of adrenal activity at puberty in the guinea-pig. *J. Endocrinol.* 87, 455–461.
- Essman E.J. (1982) *Psychological Rep.* 51.302
- Fairbanks L.A.(1996) *Adv. Study Behav.* 25:579– 611
- Fairbanks LA. (1989) *Dev. Psychobiol.* 22(7):669-81
- Fénelon V.S., Herbison A.E. (1996). *J. Neurosc.* 16, 4872-80
- Finkelstein, J.S., Whitcomb, R.W., O’Dea, L.S., Longcope, C., Schoenfeld, D.A., Crowley, 1991. Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. Part I. Effects of testosterone administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 609–620.
- Follesa P., Floris S., Tuligi G., Mostallino M.C., Concas A., Biggio G. (1998)
- Forsman, L., Lundberg, U., 1982. Consistency in catecholamine and cortisol excretion in males and females. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17, 555–562.
- Francis D.D., Diorio J., Meaney M.J.(1999) *Science* 286:1155– 8
- Frankenhaeuser M, von Wright MR, Collins A, von Wright J, Sedvall G, Swahn CG. Sex differences in psychoneuroendocrine reactions to examination stress. *Psychosom Med.* 1978 Jun;40(4):334-43.
- Frankenhaeuser, M., Lundberg, U., Forsman, L., 1980. Dissociation between sympathetic-adrenal and pituitaryadrenal responses to an achievement situation characterized by high controllability: comparison between type A and type B males and females. *Biol. Psychol.* 10, 79–91.
- Freeman EW, Frye CA, Rickels K, Martin PA, Smith SS. 2002. Allopregnanolone levels and symptom improvement in severe premenstrual syndrome. *J Clin Psychopharmacol* 22: 516–520.
- Friedmann, B., Kindermann, W., 1989. Energy metabolism and regulatory hormones in women and men during endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 59, 1–9.
- Frye C.A., Hirst J.J., Brunton P.J., Roussel J.A.. Neurosteroids for a successful pregnancy. *Stress*, 2011 Jan; 14 (1):1-5.
- Gardner E.B., Boitano J.J., Mancino N.S., D’Amico D.P. (1975) *Physiol. Behav.* 14: 321-327
- Genazzani AR, Petraglia F, Bernardi F, Casarosa E, Salvestroni C, Tonetti A, Nappi RE, Luisi S, Palumbo M, Purdy RH, Luisi M. 1998. Circulating levels of allopregnanolone in humans: Gender, age, and endocrine influences. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2099–2103.

- Gonzalez A, Lovic V, Ward GR, Wainwright PE, Fleming AS. Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Dev Psychobiol.* 2001 Jan;38(1):11-32.
- Gracia CR, Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Sheng L, Frye C. 2003. Allopregnanolone levels before and after selective serotonin reuptake inhibitor treatment of premenstrual symptoms. *J Clin Psychopharmacol* 29:403–405.
- Greenough W.T., Black J.E., Wallace C.S. (1987) *Child Devel.* 58: 539-559
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 [Epub ahead of print]
- Haleem, D.J., Kennett, G., Curzon, G., 1988. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res.* 458, 339–347.
- Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29:273-291.
- Handa, R.J., McGivern, R.F., 1999. Gender and stress. In: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress.* Academic Press, San Diego, pp. 196–204.
- Handa, R.J., Nunley, K.M., Lorens, S.A., Louie, J.P., McGivern, R.F., Bollnow, M.R., 1994. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol. Behav.* 55, 117–124.
- Harrison NL, Majewska MD, Harrington JW, Barker JL. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Apr;241(1):346-53
- Harro J, Kiivet R.A., Lang A., Vasar E. (1990) *Behav. Brain Res.* 39:63-71
- Hatch R.L., Balazs T., Wiberg G.S., Grice H.C. (1963). *Science* 142, 507-508
- Hedegaard M, Henriksen TB, Sabroe S, Secher NJ. 1993. Psychological distress in pregnancy and preterm delivery. *BMJ* 307:234–239.
- Heinsbroek, R.P., Van Haaren, F., Feenstra, M.G., Endert, E., Van de Poll, N.E., 1991. Sex- and time-dependent changes in neurochemical and hormonal variables induced by predictable and unpredictable footshock. *Physiol. Behav.* 49, 1251–1256.
- Hellems K.G.C., Benge L.C., Olmstead M. C. (2004) *Dev. Brain Res.* 150: 103-115
- Herbison AE. 2001. Physiological roles for the neurosteroid allopregnanolone in the modulation of brain function during pregnancy and parturition. *Prog Brain Res* 133:39–47.
- Heritch AJ, Henderson K, Westfall TC *J Psychiatr Res.* 1990;24(3):251-8

- Herman, J.P., Cullinan, W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitaryadrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78–84.
- Herman, J.P., Prewitt, C.M., Cullinan, W.E., 1996. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitaryadrenocortical stress axis. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10, 371–394.
- Holzbauer M. 1975. Physiological variations in the ovarian production of 5alpha-pregnane derivatives with sedative properties in the rat. *J Steroid Biochem* 6:1307–1310.
- Horton W.R., Chapman G., Meldrum B.S. (1979) *J. Neurochem.* 33, 745-749
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites *Nature* 2006 Nov23;444(7118):486-9
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci.* 2008; 31:1-7.
- Jones D, Morris N. *Scand J Psychol.* 1992 Sep;33(3):212-29
- Juraska JM, Greenough WT, Conlee JW. Differential rearing affects responsiveness of rats to depressant and convulsant drugs. *Physiol Behav.* 1983 Nov;31(5):711-5.
- Kajantie E, Phillips DI. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2006 Feb;31(2):151-78. Epub 2005 Sep 1.
- Kant, G.J., Lenox, R.H., Bunnell, B.N., Mougey, E.H., Pennington, L.L., Meyerhoff, J.L., 1983. Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology* 8, 421–428.
- Karim A., Arslan M.I. (2000) *Bang. Med. Res. Counc. Bull.* 26(1): 27-32
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:19204-19207.
- Katz DM, Steinberg H. *Proceedings: Previous environment and responses to morphine.* *Br J Pharmacol.* 1972 Feb;44(2):350P.
- Keirse MJ. 1990. Progestogen administration in pregnancy may prevent preterm delivery. *Br J Obstet Gynaecol* 97:149–154.
- Keller-Wood, M., Silbiger, J., Wood, C.E., 1988. Progesterone attenuates the inhibition of adrenocorticotropin responses by cortisol in nonpregnant ewes. *Endocrinology* 123, 647–651.
- Kikusui T., Isaka Y., Mori Y.(2005) *Behav. Brain. Res.* 162(2):200-6

- Kirschbaum, C., Klauer, T., Filipp, S.H., Hellhammer, D.H., 1995a. Sex-specific effects of social support on cortisol and subjective responses to acute psychological stress. *Psychosom. Med.* 57, 23–31.
- Kirschbaum, C., Pirke, K.M., Hellhammer, D.H., 1995b. Preliminary evidence for reduced cortisol responsivity to psychological stress in women using oral contraceptive medication. *Psychoneuroendocrinology* 20, 509–514.
- Kirschbaum, C., Wu¨st, S., Faig, H.G., Hellhammer, D.H., 1992a. Heritability of cortisol responses to human corticotropin-releasing hormone, ergometry, and psychological stress in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1526–1530.
- Kirschbaum, C., Wu¨st, S., Hellhammer, D., 1992b. Consistent sex differences in cortisol responses to psychological stress. *Psychosom. Med.* 54, 648–657.
- Kishimoto T, Pearse RV 2nd, Lin CR, Rosenfeld MG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 14;92(4):1108-12. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Apr 25;92(9):4074
- Kitay, J.I., 1961. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology* 68, 818–824.
- Kitay, J.I., 1963. Pituitary-adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone replacement. *Endocrinology* 73, 253–260.
- Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis MN, Kittas C. Gender-dependent alterations in corticosteroid receptor status and spatial performance following 21 days of restraint stress. *Neuroscience.* 2004;125(1):47-55.
- Koch M.D., Arnold W. J.J. (1972). *Comp. Physiol. Psychol.* 78: 391-399
- Kokate TG, Svensson BE, Rogawski MA, (1994) Anticonvulsivant activity of neurosteroids: correlation with gamma amino-butyric acid-evoked chloride current potentiation. *J. Pharmacolol Exp Ther;* 270(3):1223-9.
- Kostowski W., Czlonkowski A., Rewerski W., Piechocki T. (1977) *Psychopharmacol.* 53(2): 191-193
- Kraemer, R.R., Blair, S., Kraemer, G.R., Castracane, V.D., 1989. Effects of treadmill running on plasma betaendorphin, corticotropin, and cortisol levels in male and female 10K runners. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 58, 845–851.
- Kudielka, B.M., Buske-Kirschbaum, A., Hellhammer, D.H., Kirschbaum, C., 2004b. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology* 29, 83–98.
- Kudielka, B.M., Hellhammer, J., Hellhammer, D.H., Wolf, O.T., Pirke, K.M., Varadi, E., Pilz, J., Kirschbaum, C., 1998. Sex differences in endocrine and psychological responses to psychosocial stress in healthy elderly subjects and the impact of a 2-week dehydroepiandrosterone treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1756–1761.

- Kudielka, B.M., Kirschbaum, C.. Sex differences in HPA axis responses to stress:a review. *Biol Psychol.* 2005 Apr; 69 (1) :113-32. Epub 2004
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res.* 2000;122:81-103.
- Ladd CO, Owens MJ, Nemeroff CB. Persistent changes in corticotrophin releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology* 1996; 137: 1212–1218.
- Lambert J.J., Belelli D., Hill-Venning C., Peters J.A. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995 Sep; 16 (9): 295-303.
- Lesniewska, B., Miskowiak, B., Nowak, M., Malendowicz, L.K., 1990. Sex differences in adrenocortical structure and function. Part XXVII. The effect of ether stress on ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized, and testosterone- or estradiol-replaced rats. *Res. Exp. Med. (Berl.)* 190, 95–103.
- Linden,W., Earle, T.L., Gerin,W., Christenfeld, N., 1997. Physiological stress reactivity and recovery: conceptual siblings separated at birth? *J. Psychosom. Res.* 42, 117–135.
- Lindheim, S.R., Legro, R.S., Morris, R.S.,Wong, I.L., Tran, D.Q., Vijod, M.A., Stanczyk, F.Z., Lobo, R.A., 1994. The effect of progestins on behavioral stress responses in postmenopausal women. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1, 79–83.
- Linthorst AC, Flachskamm C, Barden N, Holsboer F, Reul JM. Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 2000 Jan;12(1):283-91.
- Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 5–12.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997; 277: 1659–1662.
- Liu XH, Zeng JW, Zhao YD, Chen PH, Xiao Z, Ruan HZ. Rapid inhibition of ATP-induced currents by corticosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *Pharmacology.* 2008; 82:164-170.
- Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB.*Endocrinology.* 1995 Sep;136(9):4139-42.
- Lovic V., Gonzalez A., Fleming A.S.(2001) *Dev. Psychobiol.* 39(1):19-33
- Luisi S, Petraglia F, Benedetto C, Nappi RE, Bernardi F, Fadalti M, Reis FM, Luisi M, Genazzani AR. 2000. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: Changes

- during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2429–2433.
- Lundberg, U., 1983. Sex differences in behaviour pattern and catecholamine and cortisol excretion in 3–6-year old day-care children. *Biol. Psychol.* 16, 109–117.
  - Majewska M.D., Harrison N.L., Schwartz R.D., Barker J.L., Paul S.M. *Science* 1986 May 23; 232 (4753): 1004.
  - Majewska MD, (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance, *Prog.Neurobiol*, 38(4):379-95.
  - Makino S., Smith M.A. e Gold P.W. (1995) *Endocrinol.* 136: 3299-3309
  - Matsumoto K., Uzunova V., Pinna G., Taki K., Uzunov D.P., Watanabe H., Mienville J.M., Guidotti A. e Costa E. (1999). *Neuropsychopharmacol.* 38: 955-963
  - McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol.* 2008; 583:174-185.
  - McEwen, B.S., 1998a. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* 338, 171–179.
  - McEwen, B.S., 1998b. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 33–44.
  - McEwen, B.S., Stellar, E., 1993. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch. Intern. Med.* 153, 2093–2101.
  - Meijer O.C., De Lange E.C.M., Breimer D.D., De Boer A.G., Workel J.O., De Kloet E.R., (1998) *Endocrinology* 139: 1789-1793.
  - Melcangi RC, Panzica G. 2003. Steroids and the nervous system. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 1007:1–5.
  - Miachon S., Manchon M., Fromentin J.R., Buda M. (1990) *Neurosci. Lett.* 111: 246-251
  - Miller A.H., Spencer R.L., Pulera M., Kang S., McEwen B.S. Stein M. (1992) *Biol. Psychiatry* 32: 850-869
  - Mizoguchi K., Yuzurihara M., Ishige A., Sasaki H., Chui D., Tabira T. (2001) *Psychoneuroendocrinol.* 26: 443-459
  - Moore CL, Power KL. Prenatal stress affects mother-infant interaction in Norway rats. *Dev Psychobiol.* 1986 May;19(3):235-45.
  - Moyer K.R., Korn K.H. (1965). *Psycon. Sci.* 3: 503-504
  - Myers, M.M., Brunelli, S.A., Squire, J.M., Shindeldecker, R.D., Hofer, M.A. (1989). *Dev Psychobiol.* 22:29-53.
  - Naftolin, F., 1994. Brain aromatization of androgens. *J. Reprod. Med.* 39, 257–261.



- Nair SM, Karst H, Dumas T, Phillips R, Sapolsky RM, Rumpff-van Essen L, Maslam S, Lucassen PJ, Joëls M. Gene expression profiles associated with survival of individual rat dentate cells after endogenous corticosteroid deprivation. *Eur J Neurosci.* 2004; 20:3233-3243.
- Nguyen PN, Billiards SS, Walker DW, Hirst JJ. 2003. Changes in 5 $\alpha$ -pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep. *Pediatr Res* 53:956–964.
- Nicol MB, Hirst JJ, Walker D, Thorburn GD. 1997. Effect of alteration of maternal plasma progesterone concentrations on fetal behavioural state during late gestation. *J Endocrinol* 152: 379–386.
- Nicolson, N., Storms, C., Ponds, R., Sulon, J., 1997. Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 52, M68–M75.
- Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3:27-41
- Norman, R.L., Smith, C.J., Pappas, J.D., Hall, J., 1992. Exposure to ovarian steroids elicits a female pattern of plasma cortisol levels in castrated male macaques. *Steroids* 57, 37–43.
- O’Leary D.D.M., Borngasser D.J., Fox K., Schlagger B.L. (1995) *CIBA Found. Symp.* 193: 214-230
- Owens M.J., Nemeroff C.B. (1991) *Pharmacol. Rev.* 43 (4), 425-473
- Paarlberg KM, Vingerhoets AJ, Passchier J, Dekker GA, Van Geijn HP. 1995. Psychosocial factors and pregnancy outcome: A review with emphasis on methodological issues. *J Psychosom Res* 39:563–595.
- Paris JJ, Frye CA. 2010. Juvenile offspring of rats exposed to restraint stress in late gestation have impaired cognitive performance and dysregulated progesterone formation. *Stress* 19:23–32.
- Pedersen CA, Ascher JA, Monroe YL, Prange AJ Jr. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. *Science.* 1982 May 7;216(4546):648-50.
- Peiffer, A., Lapointe, B., Barden, N., 1991. Hormonal regulation of type II glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 129, 2166–2174.
- Petrini JR, Dias T, McCormick MC, Massolo ML, Green NS, Escobar GJ. 2009. Increased risk of adverse neurological development for late preterm infants. *J Pediatr* 154:169–176.
- Pisu M.G., Dore R., Mostallino M.C., Loi M., Pibiri F., Mamei R., Cadeddu R., Secci P.P., Serra M. Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. *Behav brain res.* 2011 Sep 12; 222(1):73-80

- Pisu M.G., Garau A., Olla P., Biggio F., Utzeri C., Dore R., Serra M. Altered stress responsiveness and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male rat offspring of socially isolated parents. *J. Neurochem.* 2013 Aug; 126(4):493-502
- Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993 May;18(3):195-200.
- Polefrone, J.M., Manuck, S.B., 1987. Gender differences in cardiovascular and neuroendocrine response to stress. In: Barnett, R.S., Biener, L., Baruch, G.K. (Eds.), *Gender and Stress*. Free Press, New York, pp. 13–37.
- Puia G, Santi MR, Vicini S, Pritchett DB, Purdy RH, Paul SM, Seeburg PH, Costa E. *Neuron.* 1990 May;4(5):759-65
- Purdy RH, Moore PH Jr, Rao PN, Hagino N, Yamaguchi T, Schmidt P, Rubinow DR, Morrow AL, Paul SM. 1990. Radioimmunoassay of 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one in rat and human plasma. *Steroids* 55:290–296.
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 15;88(10):4553-7.
- Redei, E., Li, L., Halasz, I., McGivern, R.F., Aird, F., 1994. Fast glucocorticoid feedback inhibition of ACTH secretion in the ovariectomized rat: effect of chronic estrogen and progesterone. *Neuroendocrinology* 60, 113– 123.
- Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 1985; 117:2505-2511.
- Righetti e Sette, 2000
- Rini CK, Dunkel-Schetter C, Wadhwa PD, Sandman CA. 1999. Psychological adaptation and birth outcomes: The role of personal resources, stress, and sociocultural context in pregnancy. *Health Psychol* 18:333–345.
- Robertson H.A., Martin I.L., Candy G.M. (1978) *Eur. J. Pharmacol.* 50: 455-457
- Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology.* 2004;80(6):387-93.
- Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10:423-433.
- Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Tomkins, G.M., 1972. Glucocorticoid receptors: relations between steroid binding and biological effects. *J. Mol. Biol.* 67, 99–115.
- Russo S. J., Murrough J.W., Han M.H., Charney D.C. and Nestler E.J. (2012) *Neurobiology of resilience.* *Nat. Neurosci.* 15, 1475–1484.
- Sahakian B.J., Robbins T.W., Iversen S.D. (1977) *Anim. Learn. Behav.* 5:193-198

- Sanchez-Ramos L. 2005. Induction of labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 32:181–200, viii.
- Sapolsky RM. Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress*. 1996 Jul;1(1):1-19.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.
- Scaccianoce S., Del Bianco P., Paolone G., Caprioli D., Modafferi A.M., Nencini P., Badiani A., *Behav Res.* 2006 Apr 3;168(2):323-5
- Seay b, Alexander bk, Harlow hf. Maternal behavior of socially deprived rhesus monkeys. *J abnorm psychol.* 1964 oct; 69:345-54.
- Seeburg PH, Wisden W, Verdoorn TA, Pritchett DB, Werner P, Herb A, Lüddens H, Sprengel R, Sakmann B. The GABAA receptor family: molecular and functional diversity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1990;55:29-40
- Seeman, T.E., Robbins, R.J., 1994. Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans. *Endocr. Rev.* 15, 233–260.
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Cara V, Purdy RH, Biggio G. 2003. Social isolation-induced increase in the sensitivity of rats to the steroidogenic effect of ethanol. *J Neurochem* 85:257–263.
- Serra M., Mostallino M.C., Talani G., Pisu M.G., Carta M., Mura M.L., Floris I, Maciocco E., Sanna E., Biggio G. (2006) *J. Neurochem.* 98(1):122-33
- Serra M., Pisu M.G., Floris I., Biggio G. (2005) *Stress.* 8(4):259-64
- Serra M., Pisu M.G., Littera M., Papi G., Sanna E., Tuveri F., Usala L., Purdy R.H., Biggio G. (2000) *J. Neurochem.* 75, 732-740
- Sierra A. (2004) *J. Endocrinol.* 16: 787-793
- Silva-Gomez A.B., Rojas D., Juarez I., Flores G. (2003) *Brain Res.* 983(1-2): 128-136
- Skelton K.H., Nemeroff C.B., Knight D.L., Owens M.J. (2000) *J Neurosci.* 20(3):1240-8
- Smith G.W., Aubry J.M., Dellu F., Contarino A., Bilezikjian L.M., Gold L W., Lee K.F. (1998) *Neuron.* 20: 1093-1102
- Stoney, C.M., Davis, M.C., Matthews, K.A., 1987. Sex differences in physiological responses to stress and in coronary heart disease: a causal link? *Psychophysiology* 24, 127–131.
- Stroud, L.R., Salovey, P., Epel, E.S., 2002. Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress. *Biol. Psychiatry* 52, 318–327.

- Sundström I, Baäckström T, Wang M, Olsson T, Seippel L, Bixo M. 1999. Premenstrual syndrome, neuroactive steroids and the brain. *Gynecol Endocrinol* 13:206–220.
- Sundström I, Baäckström T. 1998a. Patients with premenstrual syndrome have decreased saccadic eye velocity compared to control subjects. *Biol Psychiatry* 44:755–764.
- Sundström I, Baäckström T. 1998b. Citalopram increases pregnanolone sensitivity in patients with premenstrual syndrome: An open trial. *Psychoneuroendocrinology* 23:73–88.
- Svec, F., 1988. Differences in the interaction of RU 486 and ketoconazole with the second binding site of the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 123, 1902–1906.
- Tasker JG, Herman JP. Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*. 2011 Jul;14(4):398-406.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 1992;24:145-9.
- Turner, B.B., 1992. Sex differences in the binding of type I and type II corticosteroid receptors in rat hippocampus. *Brain Res*. 581, 229–236.
- Turner, B.B., Weaver, D.A., 1985. Sexual dimorphism of glucocorticoid binding in rat brain. *Brain Res*. 343, 16–23.
- Vamvakopoulos, N.C., Chrousos, G.P., 1993. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J. Clin. Invest.* 92, 1896–1902.
- Viau V, Bingham B, Davis J, Lee P, Wong M. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology*. 2005 Jan;146(1):137-46.
- Viau, V., Meaney, M.J., 1991. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 129, 2503–2511.
- Viau, V., Meaney, M.J., 1996. The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *J. Neurosci.* 16, 1866–1876.
- Vu TT, Hirst JJ, Stark M, Wright IMR, Palliser HK, Hodyl N, Clifton VL. 2009. Changes in human placental 5alpha-reductase isoenzyme expression with advancing gestation: Effects of fetal sex and glucocorticoid exposure. *Reprod Fertil Dev* 21: 599–607.

- Wadhwa PD, Sandman CA, Porto M, Dunkel-Schetter C, Garite TJ. 1993. The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: A prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol* 169:858–865.
- Wang M, Seippel L, Purdy RH, Bačková T. 1996. Relationship between symptom severity and steroid variation in women with premenstrual syndrome: Study on serum pregnenolone, pregnenolone sulfate, 5 alpha-pregnane-3,20-dione and 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1076–1082.
- Weiss I.C., Feldon J. (2001) *Psychopharmacol.* 156: 305-326
- Weissberger, A.J., Ho, K.K., 1993. Activation of the somatotrophic axis by testosterone in adult males: evidence for the role of aromatization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 1407–1412.
- Westenbroek C., Den Boer J.A., Veenhuis M., Ter Horst G.J. (2004) *Brain Res. Bull.* 64: 303-308
- Wongwitdecha N., Mardsen C.A. (1996) *Behav. Brain Res.* 75: 27-32
- Xiao, E., Xia, L., Shanen, D., Khabele, D., Ferin, M., 1994. Stimulatory effects of interleukin-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis on gonadotropin secretion in ovariectomized monkeys replaced with estradiol. *Endocrinology* 135, 2093–2098.
- Xiong X, Harville EW, Mattison DR, Elkind-Hirsch K, Pridjian G, Buekens P. 2008. Exposure to Hurricane Katrina, posttraumatic stress disorder and birth outcomes. *Am J Med Sci* 336:111–115.
- Yawno T, Yan EB, Hirst JJ, Walker DW. 2010. Neuroactive steroids induce changes in fetal sheep behavior during normoxic and asphyxic states *Stress* 19:13–22.
- Yoshimura, S., Sakamoto, S., Kudo, H., Sassa, S., Kumai, A., Okamoto, R., 2003. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 68, 439–445.
- Young, E.A., 1995a. Glucocorticoid cascade hypothesis revisited: role of gonadal steroids. *Depression* 3, 20–27.
- Young, E.A., 1995b. The role of gonadal steroids in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 371–381.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2010/2013 - XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.I "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali.

Anna Garau gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective I.3, Line of Activity I.3.I.).