



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Ingegneria Biomedica

Ciclo XXVII

TITOLO TESI

Ruolo dei neurosteroidi nella modulazione dopaminergica

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

ING-IND/34

Presentata da:

Romina Pes

Coordinatore Dottorato

prof. Giacomo Cao

Tutor/Relatore

dott.ssa Paola Devoto
prof. Marco Bortolato

Esame finale anno accademico 2013 – 2014



Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



University of Cagliari

DOCTORATE OF PHILOSOPHY (PH.D.)

Biomedical Engineering

Ciclo XXVII

PH.D. THESIS

The role of 5 neurosteroids in dopaminergic modulation

Scientific jurisdiction

ING-IND/34

Presented by:

Romina Pes

Ph.D. Program Co-ordinator
Supervisor

prof. Giacomo Cao
dott.ssa Paola Devoto

prof. Marco Bortolato

Final Exam Academic year 2013 – 2014

Introduzione	5
Dopamina e patologie associate	5
Biologia della dopamina	6
Sistemi dopaminergici nel SNC	8
Gli steroidi neuroattivi nelle patologie neuropsichiatriche	9
Prepulse inhibition del riflesso di Startle	17
Procedure sperimentali	22
Animali e stabulazione.....	22
Apparato sperimentale.....	23
Analisi dei dati	25
Risultati	26
Effetti della somministrazione sistemica e locale di Abiraterone	26
Effetti di indometacina sui parametri di startle e PPI.....	29
Effetti del trilostano sui parametri di startle e PPI	30
Effetti dei ligandi per i recettori agli androgeni sui parametri di startle e PPI.....	32
Discussione	35
Capitolo 2: Ruolo dei neurosteroidi nel gioco d'azzardo patologico	44
Metodi	56
Apparato sperimentale.....	58
Procedure comportamentali	59
Motilita'	63
Risultati	66
Conclusione	72
Ringraziamenti	73
Bibliografia	74

INTRODUZIONE

DOPAMINA E PATOLOGIE ASSOCIATE

Numerose evidenze sperimentali mostrano alterazioni nella neurotrasmissione dopaminergica associate a disturbi neuropsichiatrici e malattie neurodegenerative (Lyons et al. 1998; Wasilow-Mueller & Erickson 2001; Reicher-Rossler & Hafner 2000; Walters et al. 2001). La dopamina gioca un ruolo significativo nella fisiopatologia della depressione, nel meccanismo d'azione degli antidepressivi (D'Aquila et al. 2000; Gershon et al. 2007; Porcelli et al. 2011) e nella risposta allo stress, che determina un incremento dei livelli di dopamina in diverse aree cerebrali (corteccia prefrontale in particolare) (Rodrigues et al. 2011; Cabib & Puglisi-Allegra 2011).

Esiste quindi un forte legame tra malattie di natura sia neurodegenerativa che psichiatrica e le alterazione della neurotrasmissione dopaminergica. Da questo nasce l'importanza degli studi sul ruolo di questo neurotrasmettitore nel comportamento normale, al fine di poter interpretare la psicopatologia delle malattie a partire da eventi neurali.

BIOLOGIA DELLA DOPAMINA

La dopamina (DA) è una catecolamina endogena sintetizzata all'interno delle terminazioni nervose dei neuroni dopaminergici a partire dalla tirosina,

amminoacido trasportato attraverso la barriera ematoencefalica grazie ad un processo attivo. La biosintesi della dopamina avviene per azione sequenziale della tirosina idrossilasi, enzima chiave per la sintesi che converte la L-tirosina nell'intermedio L-diidrossifenilalanina (L-DOPA) e della L-decarbossilasi che converte rapidamente la L-DOPA a DA.

A livello delle terminazioni nervose la DA viene immagazzinata all'interno di vescicole di deposito grazie ad una proteina che funge da trasportatore attivo (questo processo viene inibito dalla reserpina portando alla deplezione di DA). A seguito della depolarizzazione della membrana e all'ingresso di ioni Ca^{2+} , mediante un processo di esocitosi, avviene il rilascio della DA nello spazio intersinaptico. Qui l'azione della DA viene conclusa dalla ricaptazione attraverso un trasportatore di membrana con successivo trasporto nelle vescicole. In alternativa la DA viene degradata dall'azione delle monoammino-ossidasi (MAO) o delle catecol-O-metil transferasi (COMT), portando alla formazione dei due metaboliti, acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) e acido 3-metossi-4-idrossifenilacetico (HVA). Nell'uomo l'HVA è il prodotto primario del metabolismo della DA (Cooper et al. 1996).

Le attività della DA nel cervello sono mediate da una famiglia di proteine recettoriali che hanno in comune caratteristiche strutturali tra cui i sette domini transmembrana con struttura ad α -elica, che le include nella grande famiglia dei

recettori che agiscono attraverso il legame con la proteina G. I recettori dopaminergici sono cinque, e possono essere divisi in due gruppi sulla base delle proprietà strutturali e farmacologiche. I recettori D1 e D5 hanno una lunga catena C-terminale intracellulare e sono membri della classe definita farmacologicamente come D1-like. Essi stimolano la formazione di AMP ciclico e l'idrolisi di fosfatidilinositolo.

I recettori D2, D3 e D4 hanno in comune la terza ansa intracellulare molto lunga e sono membri della classe definita farmacologicamente come D2-like. Essi riducono la formazione di AMP ciclico e modulano correnti di K^+ e Ca^{2+} . Ciascuno dei cinque recettori dopaminergici ha una distribuzione anatomica distinta nel cervello. I recettori D1 e D2 sono abbondantemente espressi nello striato, i recettori D4 e D5 sono in gran parte al di fuori dello striato, mentre l'espressione del recettore D3 è bassa nel caudato e nel putamen e più abbondante nel nucleus accumbens e nel tubercolo olfattorio.

SISTEMI DOPAMINERGICI NEL SNC

I sistemi dopaminergici nel SNC sono rappresentati dal sistema nigro-striatale, sistema meso-limbico, sistema meso-corticale e dal sistema tubercolo-infundibolare.

I neuroni del sistema nigro-striatale hanno sede nella pars compacta della substantia nigra (SNpc) del mesencefalo e proiettano le loro terminazioni nel corpo striato (caudato e putamen) (Fuxe et al., 1985). Il sistema dopaminergico nigro-striatale fa parte del sistema extrapiramidale e tra le sue funzioni vi è quella di controllare il tono muscolare e la coordinazione motoria. Al blocco dei recettori dopaminergici nigro-striatali sono associati gli effetti extrapiramidali degli antipsicotici (Baldessarini & Tarazi 2006).

I neuroni del sistema meso-limbico sono localizzati per la maggior parte nell'area ventro-tegmentale del mesencefalo e in minor misura nella parte mediale della substantia nigra. Le loro fibre vanno ad innervare il nucleus accumbens, il tubercolo olfattorio ed il nucleo interstiziale della stria terminale (Fuxe et al.1985). Questo sistema oltre a partecipare al controllo delle funzioni motorie, fa parte del sistema limbico ed è coinvolto nella regolazione dei comportamenti emotivi. Al blocco dei recettori dopaminergici di questo sistema viene attribuito l'effetto terapeutico degli antipsicotici. Viceversa, ad una sua iperattività si ritiene siano dovuti alcuni sintomi della schizofrenia e della mania, come il delirio e le allucinazioni (Baldessarini & Tarazi 2006).

Il sistema meso-corticale, come quello meso-limbico, origina principalmente nell'area ventro-tegmentale del mesencefalo e in piccola parte nella substantia nigra. I neuroni di questo sistema proiettano le loro fibre nervose al setto, soprattutto nel nucleo laterale, all'amigdala, all'ippocampo, e alla corteccia prefrontale. Si ritiene che questo sistema sia quello maggiormente implicato nel controllo delle funzioni cerebrali superiori e delle emozioni. Al blocco dei recettori dopaminergici di questo sistema viene attribuita l'esacerbazione dei sintomi negativi della schizofrenia (Baldessarini & Tarazi 2006).

I piccoli neuroni del sistema tubero-infundibolare originano nel nucleo arcuato dell'ipotalamo e arrivano all'eminenza mediana, dove liberano DA direttamente nei vasi del sistema portale ipofisario. La DA raggiunge così i recettori presenti nelle cellule mammotrope dell'ipofisi anteriore, inibendo la secrezione di prolattina (Fuxe et al.1985). Il blocco della trasmissione dopaminergica a questo livello è responsabile dell'iperprolattinemia e dei disturbi ad essa associati in corso di terapia con antipsicotici (Baldessarini & Tarazi 2006).

Gli steroidi neuroattivi nelle patologie neuropsichiatriche.

Gli steroidi neuroattivi sono neuromodulatori endogeni prodotti de novo nel cervello e in periferia, attraverso la conversione del precursore colesterolo in

metaboliti attivi, mediante una reazione catalizzata dal complesso enzimatico P450 side-chain cleavage (Schiess and Baulieu, 2001).

La peculiare caratteristica che contraddistingue questi neuromodulatori dai classici ormoni steroidei, è quella di essere in grado di regolare l'eccitabilità neuronale e il rilascio di neurotrasmettitori con una cinetica incompatibile con i tempi di attivazione di un recettore intracellulare. Infatti, questa classe di steroidi agisce attraverso dei segnali di trasduzione rapidi, non genomici, dovuti all'attivazione di recettori associati alla membrana plasmatica

Negli anni passati, diversi studi clinici e preclinici hanno suggerito un ruolo centrale degli steroidi neuroattivi nella fisiopatologia della schizofrenia e in altre patologie neuropsichiatriche correlate a disfunzioni del sistema dopaminergico, come la sindrome di Tourette ed il disturbo bipolare (Morrow et al., 2007). Le osservazioni sperimentali che supportano direttamente questa ipotesi, possono essere raggruppate sulla base di tre importanti evidenze neurochimiche, endocrine e neuropsicofarmacologiche:

- 1) Gli steroidi neuroattivi possiedono un'azione modulatrice sui principali sistemi neurotrasmettitoriali implicati nella patogenesi della schizofrenia, come il sistema dopaminergico, gabaergico e glutammatergico (Blum and Mann, 2002; Seeman and Kapur, 2000, Blum and Mann, 2002; Wassef et al., 2003; Costa et al., 2004).

2) Le alterate fluttuazioni plasmatiche e cerebrali di questi substrati steroidei sono associate ad alcune forme di psicosi (Ritsner 2010; Marx et al., 2006).

3) La fine regolazione nelle concentrazioni di steroidi neuroattivi potrebbe giocare un ruolo importante non solo nella fisiopatologia di alcune patologie psichiatriche, ma anche come coadiuvanti o come terapia alternativa in pazienti resistenti ai comuni farmaci neurolettici (Melcangi, 2010; Shulman and Tibbo, 2005).

Tra gli steroidi neuroattivi, sia gli ormoni sessuali (androgeni, estrogeni e progestinici), che i neurosteroidi allopregnanolone (AP) e tetradeossicorticosterone (THDOC), possono interagire con numerosi circuiti cerebrali e influenzare le più importanti funzioni fisiologiche e comportamentali alla base della natura e sintomatologia psicotica come la sessualità, l'aggressività, le funzioni cognitive e gli stati emozionali (MacKenzie et al., 2007; Fink et al., 1996).

Ad esempio, nei pazienti schizofrenici, la sindrome prodromica compare durante il periodo riproduttivo in più dell'80% dei casi (Stevens, 2002). L'incidenza della schizofrenia è pressoché equivalente in entrambi i sessi, ma nell'uomo il suo decorso è più severo, l'età d'esordio della malattia è più precoce e la risposta ai farmaci antipsicotici è inferiore (Angermeyer 1988, Hafner 1997; Seeman 1983).

In aggiunta, mentre è noto che esposizioni ad alte dosi di steroidi anabolizzanti possano indurre o precipitare tratti simil-psicotici nell'uomo (Trenton and Currier, 2005), studi neuroendocrinologici hanno evidenziato riduzioni significative nei livelli di testosterone ed un miglioramento nella sintomatologia negativa dopo trattamento con testosterone o deidroepiandrosterone (DHEA) (Huber 2005, Taherianfard 2005, Silver 2005, Goyal 2004, Harris 2001, Ritsner 2005).

In linea con questi studi, anche gli estrogeni sembrano possedere un ruolo protettivo nella patogenesi della schizofrenia. Studi clinici evidenziano che nelle donne il primo episodio psicotico si presenta circa 5 anni più tardi rispetto agli uomini e che l'aggiunta di estrogeno o estradiolo alla terapia standard riduce il numero di manifestazioni schizofreniche (Agius et al., 2009; Kulkarni et al., 2009; Kendell, 2003). In aggiunta, le donne sembrano più vulnerabili a incorrere in episodi psicotici nei periodi in cui i livelli di estrogeno si abbassano drasticamente, come dopo la gravidanza (Kendell 1987) o immediatamente dopo la menopausa (Hafner 1997, McKenna 1997). Questi studi clinici sono implementati da numerosi esperimenti condotti su animali di laboratorio che hanno chiaramente indicato un'azione protettiva degli estrogeni in modelli animali di schizofrenia riprodotti sperimentalmente attraverso la somministrazione di agonisti dopaminergici e serotoninergici (Gogos and Van De Buuse, 2004; Van De Buuse and Eikelis 2003).

Oltre agli steroidi sessuali, anche fluttuazioni plasmatiche e cerebrali di derivati del progesterone come allopregnanolone (AP) e tetraidrodeossicorticosterone (THDOC) possono contribuire allo sviluppo di alterazioni comportamentali associate a disturbi neuropsichiatrici. In particolare, in virtù del loro ruolo attivo nei fini meccanismi omeostatici del nostro organismo in risposta allo stress, questi neuromodulatori sembrano maggiormente implicati in quel cluster di patologie psichiatriche associate a traumi di tipo psico-sociale, come una perdita precoce o l'allontanamento protratto da un genitore (Skilbeck et al., 2010; Reddy, 2002).

Inoltre, studi post-mortem hanno evidenziato che i livelli di allopregnanolone sono più elevati in pazienti schizofrenici nella corteccia cingolata anteriore e nella corteccia parietale e il pregnonolone, nella sua forma più stabile, (pregnololone-solfato), sembra essere il più promettente neurosteroido dotato di potenzialità terapeutiche per i deficit cognitivi che accompagnano i sintomi negativi nella schizofrenia (Marx et al., 2009).

Tra le possibili strategie che possono essere utilizzate per intervenire sulla sintesi e trasformazione di questi substrati, gli inibitori degli enzimi coinvolti nella steroidogenesi rappresentano un valido target farmacologico. Tra questi, la Finasteride (Proscar) e l'Abiraterone (Zytiga), sono gli inibitori della 5-alfa reduttasi (5AR) e del Cytochrome P450 17alpha hydroxylase/17,20 lyase

(CYP17), rispettivamente. La 5AR, nota anche come 3-ossio-5alfa-steroide-4-deidrogenasi), è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, ed è responsabile di una delle due maggiori vie biosintetiche che porta alla formazione dei neurosteroidi allopregnanolone e THDOC (Martini et al., 1993, 1996). Il complesso enzimatico CYP17 è invece necessario per la sintesi degli androgeni DHT e 3alpha-diolo (Fig. 1).

Figura 1

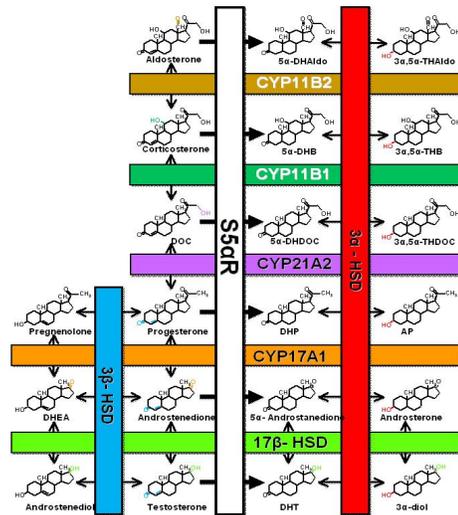


Fig. 1. Neurosteroidogenesi cerebrale con i substrati (sx) e prodotti (dx) della 5AR

Pertanto, il primo enzima è principalmente implicato nei meccanismi di regolazione dello stress, in particolare per la conversione del progesterone in AP in risposta a eventi stressanti, (Khisti et al., 2002; Rupprecht et al., 1999), mentre

il secondo è responsabile delle fluttuazioni androgeniche cerebrali, poiché converte il testosterone (T) in diidrotestosterone (DHT), l'androgeno biologicamente più attivo che stimola l'acquisizione dei tratti sessuali secondari maschili (Breedlove, 1992).

La sintesi di DHT da parte del CYP17 è uno dei più importanti meccanismi di regolazione endocrini che avvengono durante l'adolescenza e la tarda fase puberale, periodi di sviluppo che coincidono con la più alta incidenza di schizofrenia nell'uomo (Goldstein et al., 2006). Inoltre, è ormai noto che gli androgeni ed altri steroidi neuroattivi (tra cui l'AP) possiedono un'azione modulatrice sui sistemi monoaminergici, attraverso un controllo neuroendocrino "top-down" di importanti funzioni comportamentali e cognitive implicate nella schizofrenia (Fabre-Nys, 1998). Ad esempio, è stata ben accertata la regolazione delle funzioni dopaminergiche striatali e corticali da parte degli androgeni e di altri steroidi neuroattivi (Savageau MM e Beatty, 1981 ; Beatty et al., 1992). Allo stesso modo, alcune osservazioni sperimentali indicano che gli androgeni regolano anche gli effetti psicomotori di noradrenalina e serotonina (Gabriel et al., 1988; Handa et al., 1997). Tuttavia, sebbene gli androgeni inducano marcati aumenti di monoamine nel cervello di ratto, l'impatto di questi steroidi sulla liberazione di serotonina potrebbe essere un fenomeno multimodale, dipendente esclusivamente dall'area cerebrale coinvolta (Tamaki et al., 2003). La FDA (Food

and Drug administration) ha approvato nel 2011 l'utilizzo dell'Abiraterone nel trattamento di uomini con carcinoma alla prostata, il principale tumore nella popolazione maschile nei paesi occidentali, e seconda causa di morte per cancro. Attraverso l'inibizione selettiva del DHT, questo farmaco somministrato per via orale, ha ridotto la mortalità nel 25% dei pazienti con carcinoma metastatico alla prostata (Gomez, 2015).

Tra le differenti isoforme appartenenti alla famiglia delle ossido reduttasi, la 5AR1 e la 5AR2 sembrano le più implicate nella produzione dei neurosteroidi e negli androgeni. Nei roditori, la 5AR di tipo 1 è costantemente presente attraverso tutti gli stadi dello sviluppo, mentre l'espressione della 5AR2 nell'adulto è principalmente modulata dal segnale androgenico (Poletti et al., 1998; Torres and Ortega, 2003). Il prototipo degli inibitori della 5AR, la finasteride (FIN), ha ricevuto l'approvazione clinica per il trattamento dell'iperplasia prostatica benigna e per l'alopecia androgenetica (Otberg et al., 2007; Li, 2009). Esiste un'estesa letteratura clinica che dimostra come la FIN sia ben tollerata e induca effetti collaterali limitati (Rogers, 2008). Sebbene nell'uomo la FIN sia più selettiva per la 5AR di tipo 2, nel ratto inibisce entrambe le isoforme (Torres et al., 2003) ed è l'inibitore più utilizzato nella ricerca preclinica per regolare i livelli degli steroidi neuroattivi (Serra et al., 2007). In aggiunta a queste proprietà farmacologiche, il gruppo con cui ho collaborato ha

recentemente scoperto che la FIN ha potenzialità terapeutiche in pazienti affetti da schizofrenia (Koethe et al., 2008) e altri disturbi psichiatrici come la sindrome di Tourette (Bortolato et al., 2007), e il gioco d'azzardo patologico (Bortolato et al., 2012) senza indurre gli effetti extrapiramidali indotti dai farmaci antipsicotici utilizzati correntemente in terapia.

Prepulse inhibition del riflesso di Startle (PPI)

A livello neurofisiologico, l'endofenotipo più rappresentativo e studiato nella schizofrenia e in altre patologie psichiatriche è fornito dalla prepulse inhibition del riflesso di startle (PPI). La PPI è la riduzione della risposta motoria evocata da un forte stimolo sensoriale che si verifica quando quest'ultimo è preceduto da uno stimolo di intensità inferiore (Hoffman and Ison, 1980). Questo riflesso può essere definito come il risultato di una costellazione di risposte a uno stimolo improvviso e relativamente intenso, che si manifesta con una contrazione dei muscoli scheletrici e facciali e che è generalmente classificato come una reazione di difesa. In pratica, il grado con il quale la prepulse inibisce la risposta motoria riflessa al successivo intenso evento sensorio (stimolo di startle) costituisce una tra le più semplici misure operative di inibizione sensori-motoria, o

“sensorimotor gating” (Abruzzese, 2003). Tale forma di inibizione rappresenterebbe il meccanismo attraverso il quale stimoli in eccesso, o privi d’importanza, vengono vagliati o “estromessi” dalla coscienza, affinché il soggetto possa focalizzare l’attenzione sugli aspetti più salienti di cui è caricato lo stimolo. Il debole prestimolo, dunque, attiverebbe una serie di processi centrali che inizialmente incrementano e poi smorzano la responsività agli eventi sensoriali durante una breve finestra temporale successiva. Tale periodo di “gating” è stato empiricamente calcolato pari a 30-500 ms, sia nel ratto che nell’uomo (Kumari e Sharma, 2002). Questo periodo di ridotta responsività potrebbe servire transitoriamente a proteggere l’informazione contenuta nel debole stimolo iniziale affinché possa adeguatamente essere elaborata senza l’interferenza di stimoli successivi più forti.

Il riflesso inibitorio può essere evocato quando la prepulse e lo stimolo di startle sono presentati sia nella stessa che in una diversa modalità sensoriale (acustica, tattile, visiva). Tale fenomeno non costituisce una forma di condizionamento, poiché si manifesta sin dalla prima esposizione agli stimoli, e non presenta assuefazione nel corso di sessioni di test successive. L’informazione contenuta nello stimolo sarebbe elaborata attraverso una sequenza di passaggi o fasi successive (Fig. 2).

Figura 2

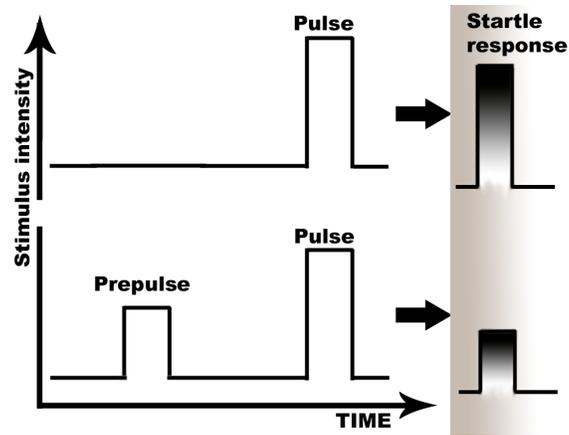


Fig. 2. Rappresentazione grafica di una risposta motoria (startle) a uno stimolo sonoro di forte intensità (pulse). Lo stesso stimolo, se immediatamente preceduto (nell'ordine dei millisecondi) da un prestimolo di intensità inferiore (prepulse), evoca una risposta inferiore.

A livello neurobiologico, l'effetto inibitorio della prepulse alla reazione di startle, avrebbe luogo all'interno del ponte, ma sarebbe regolato da connessioni con le vie limbiche discendenti cortico-striato-pallido-pontina e cortico-striato-pallido-talamica, che ne modulerebbero il tono. Sostanzialmente, l'influenza di tali vie, determinerebbe il grado di inibizione nei confronti della successiva risposta motoria (Swerdlow et al., 2000).

La PPI in definitiva rifletterebbe l'attivazione di processi comportamentali, regolati dai circuiti neuronali del cervello anteriore.

Questo parametro sperimentale è ritenuto il più affidabile indice di controllo quantitativo per la misurazione delle funzioni di gating sensoriale, i cui deficit sono tipicamente osservati nei pazienti affetti da schizofrenia, sindrome di Tourette, disturbo bipolare, autismo ed altre patologie neuropsichiatriche (Braff, 1992).

L'alto valore traslazionale della PPI è garantito dalla possibilità di misurare questo indice neurofisiologico sia nell'uomo che nell'animale di laboratorio e lo sviluppo di un paradigma che possa essere applicato a specie diverse è un requisito fondamentale per l'identificazione di ogni endofenotipo. Inoltre, in linea con le caratteristiche genetiche che lo contraddistinguono, i deficit di questa misura operativa non si presentano solo nei pazienti con disturbi psichiatrici, ma anche da membri della famiglia non affetti da alcuna patologia (Braff et al., 2001).

Nell'uomo, il riflesso di startle è misurato con un esame elettromiografico dei muscoli orbicolari dell'occhio (eye blink), mentre nei roditori si utilizza una camera stabilimetrica per misurare le sollecitazioni indotte dallo stimolo di startle (fig. 3).

Figura 3

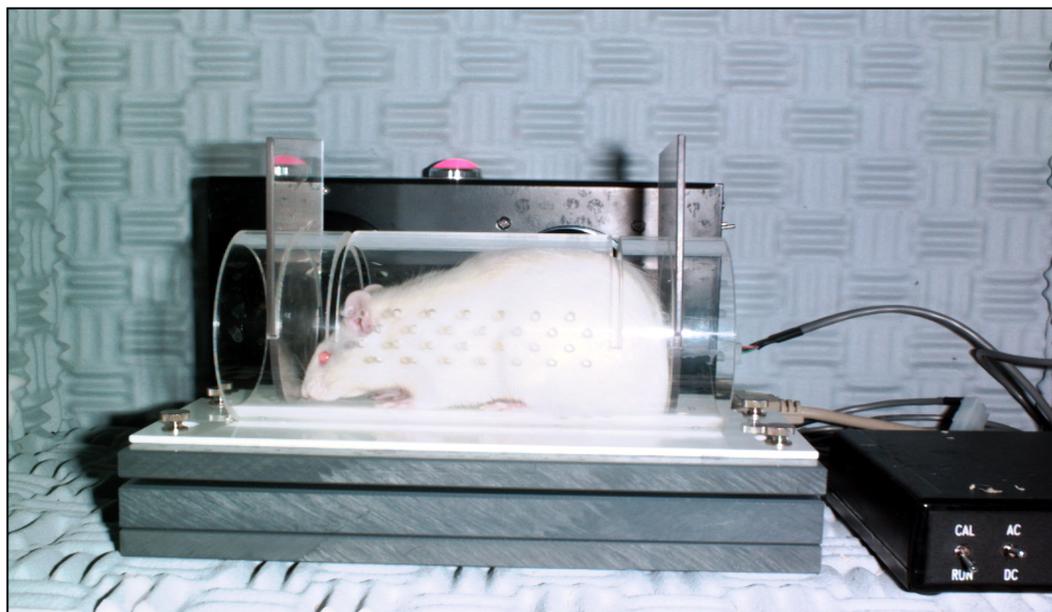


Fig. 3 Camera stabilimetrica della prepulse inhibition del riflesso di startle

L'interesse nella PPI come misura di sensorimotor gating è stimolato dall'osservazione che disfunzioni nei substrati cerebrali che regolano la PPI sono accompagnati in modo evidente da una menomazione della sfera cognitiva o percettivo-sensoriale (Phillips, 2003). In pratica, dalla patologica interruzione nella finestra di gating, ci si deve attendere un deterioramento dell'elaborazione ordinata e strutturalmente gerarchizzata dell'informazione sensoriale.

Nella prima parte dei miei studi ho indagato se si potesse correggere il deficit di PPI indotto dall'agonista dopaminergico apomorfina (APO) inibendo altri enzimi implicati nella sintesi dei neurosteroidi, cioè la 17α -idrossilasi/C17,20 liasi

(CYP17A1), la 3 α - e la 3 β -idrossi-steroido-deidrogenasi (HSD), oppure i recettori degli androgeni (AR).

PROCEDURE SPERIMENTALI

Animali e stabulazione

Tutti i protocolli sperimentali sono stati approvati dal comitato etico dell'Università degli Studi di Cagliari ed eseguiti in stretto accordo con le direttive di legge in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.

Nei nostri studi sono stati utilizzati ratti maschi di ceppo Sprague-Dawley del peso compreso tra i 250 e 320 g (Harlan Italia). Gli animali sono stati stabulati in gruppi di 4 per gabbia e mantenuti in condizioni ambientali controllate (temperatura 22 \pm 2°C; umidità 60-65%; ciclo luce/buio di 12h, buio dalle 7am alle 7pm). Per tutta la durata dello studio, i ratti hanno ricevuto una dieta standard e acqua ad libitum. Gli animali cui sono state impiantate le cannule cerebrali sono stati sottoposti alle sessioni comportamentali dopo almeno due

settimane dall'operazione chirurgica per permettere il pieno recupero fisiologico prima delle sessioni di test.

Per questi esperimenti sono stati usati in totale 303 ratti. Sono stati usati i seguenti farmaci: ABI (10-25-50 mg/kg, IP), FIN (100 mg/kg, IP), trilostano (TRI, 15-30-60 mg/kg IP), indometacina (INDO, 5 mg/kg, IP) e APO (0.25 mg/kg IP), flutamide (FLU, 10 mg/kg, IP). Per le somministrazioni sistemiche ABI, FIN, T, DHT, FLU, TRI e INDO sono stati sospesi in un veicolo (VEH) contenente Tween80 al 5% in soluzione fisiologica. Per le infusioni intraventricoli cerebrali, ABI è stato disciolto in una soluzione di Ringer contenente idrossipropil- β -ciclodestrine (CDX/R). L'apomorfina (APO) (Sigma Aldrich) è stata sciolta in una soluzione salina 0.9% con l'aggiunta di 0.1 mg/ml di acido ascorbico per prevenire i processi ossidativi. Tutte le soluzioni sono state preparate fresche il giorno dell'esperimento e somministrate SC o IP in un volume di 1 o 2 ml/kg, rispettivamente.

Apparato sperimentale

Acoustic Startle Reflex System. L'apparecchio per la rilevazione del riflesso di startle consiste in quattro gabbie standard localizzate in camere insonorizzate con ventilatore interno. La gabbia è costituita da un cilindro di plexiglass di 9 cm di

diametro con due porte a ghigliottina, montata su una piattaforma piezoelettrica accelerometrica connessa ad un convertitore analogico-digitale. Dentro ad ogni camera, sono alloggiati due altoparlanti separati che generano un rumore di fondo e dei bursts acustici e sono distanziati dalla gabbia di startle in modo da mantenere una variazione del suono entro un 1 dB attraverso essa. Sia gli altoparlanti che le gabbie sono connessi ad un PC principale, che riceve, registra e analizza tutti i dati ricevuti dalle diverse camere attraverso uno specifico programma. Gli stimoli acustici sono controllati e bilanciati prima di ogni sessione di test mediante un rilevatore di suoni digitale; utilizzando uno spinner calibratore a 10 Hz, invece, la risposta meccanica di ogni gabbia è regolata e bilanciata in tutte le camere.

Tre giorni prima dell'esperimento, tutti i ratti effettuano una sessione di baseline, al fine di poter valutare i valori medi di risposta agli stimoli acustici degli animali che saranno sottoposti al test sperimentale. Durante tale sessione, i ratti sono esposti a un rumore di fondo di 70 dB per un periodo di ambientamento di 5 minuti, trascorso il quale, sono sottoposti ad una sequenza randomizzata di 12 "bursts" o "pulse" di 115 dB della durata di 40 msec ciascuno. All'interno di tale sequenza sono distribuiti 3 trials nei quali un pre-stimolo ("prepulse") di 82 dB precede di 100 msec una pulse. Successivamente vengono definiti i gruppi di trattamento, in modo che la risposta media di startle e di PPI per ogni gruppo sia

equivalente in tutti i gruppi. Il giorno del test, tutti i ratti, volta per volta, sono posti in una gabbia ed esposti per i primi 5 minuti di ambientamento al solo rumore di fondo di 70 dB, che continuerà ad essere erogato anche durante l'intera sessione rimanente. Il protocollo sperimentale è suddiviso in tre blocchi consecutivi di trials. A differenza del primo e del terzo blocco, durante i quali gli animali sono esposti solo a 5 pulse singole di 115 dB, il secondo blocco mostra una sequenza pseudo-random di 52 trials, che include 12 pulse singole, 30 trials di pulse precedute da prepulse di 73, 76, o 82 dB (10 per ogni livello di prepulse sonora) e 8 trials "no stimulus" in cui viene erogato il solo rumore di fondo. Gli intervalli fra i trials (ITI) sono stati randomizzati in un range compreso tra i 10 e i 15 secondi. Alla fine di ogni sessione sperimentale, i ratti sono stati sistemati nelle gabbie di appartenenza e le camere della PPI sono state lavate e asciugate per eliminare eventuali odori nella successiva sessione di test.

Analisi dei dati

Tutti gli esperimenti sono stati analizzati con disegni statistici between-subjects. I risultati sono stati espressi come media \pm SEM di n esperimenti. La significatività tra i gruppi sperimentali è stata determinata con analisi della varianza (ANOVA) ad una, due o più vie, a seconda del disegno sperimentale, seguita dal post-hoc test di Tukey. L'alfa è stato fissato a 0.5. La %PPI è stata calcolata utilizzando la seguente formula: $100 - [(media\ ampiezza\ startle\ per\ i\ prepulse + pulse\ trials /$

media ampiezza startle per i single pulse trials) x 100]. Le analisi sono state effettuate usando il software Statistica (Statsoft, Tulsa, USA).

RISULTATI

Effetti della somministrazione sistemica e locale di Abiraterone

Con questi esperimenti abbiamo valutato l'impatto dell'ABI, inibitore selettivo del CYP17A1, alle dosi di 10-50 mg/kg IP, sugli effetti indotti dall'APO (25 mg/kg IP) sulla startle o sulla PPI, confrontati con l'effetto della FIN (100 mg/kg, IP) (Fig. 4). Né il pre-trattamento con ABI [$F(3,67)=1,20$, NS] né il trattamento con APO [$F(1,67)=0,16$] hanno avuto un effetto significativo sulla startle (Fig. 4A). Inoltre, l'ANOVA non ha indicato alcuna interazione ABIxAPO [$F(3,67)=0,61$, NS]. A differenza dall'abiraterone, la FIN ha ridotto significativamente l'ampiezza della startle di base [effetto del pretrattamento: $F(1,35)=32,85$, $P < 0,001$]. Tuttavia la combinazione di FIN + APO non ha prodotto effetti significativi sul parametro di startle [interazione pretrattamento x trattamento: $F(1,35) = 1,03$, NS]. L'analisi della PPI rivelato una significativa interazione pretrattamento \times trattamento, evidenziando che la dose di 25 mg / kg di ABI ha ridotto significativamente le proprietà anti-PPI di APO {[$F(3,67) = 3,16$, $P < 0,05$]; $P < 0,05$ per il confronto VEH + APO vs ABI 25 + APO; test di Tukey}, anche se solo parzialmente ($P_s < 0,01$ per tutti i confronti tra controlli e ratti trattati con APO) (Fig. 4B). In linea con i risultati precedenti, la FIN ha

contrastato in maniera significativa il deficit di PPI mediato da APO [F (1,35) = 4.33, p <0.05] (Fig. 4B)

Figura 4

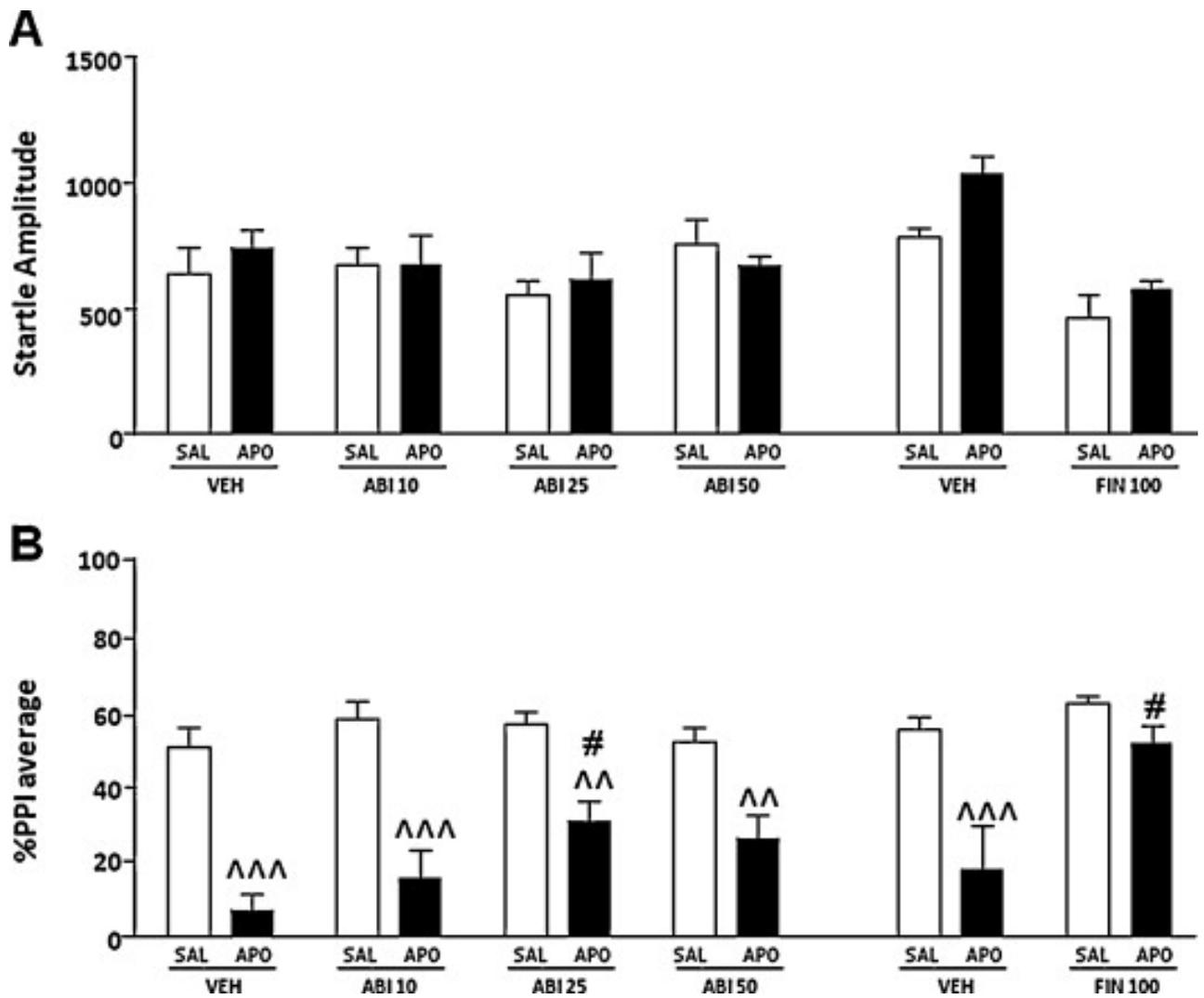


Figura 4. Effetti di finasteride sistemica (FIN, 100 mg / kg, IP) e abiraterone (ABI, 10-50 mg / kg, IP) su riflessi di startle (A) e % PPI (B) in relazione ai deficit gating indotte da

apomorfina sistemica (APO, 0,25 mg / kg, SC). FIN e ABI dosi sono indicati in mg / kg. VEH, veicolo della FIN e ABI; SAL, salina. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. N = 8-14 / gruppo. ^^ P <0,01; ^^^ P <0,001 vs ratti trattati con lo stesso pretrattamento e SAL (interazione pretrattamento \times trattamento); #P <0.05 vs ratti trattati con VEH e APO (interazione pretrattamento \times trattamento). Gli effetti principali non sono indicati; per maggiori dettagli, si veda il testo.

Per verificare il coinvolgimento delle strutture cerebrali nelle proprietà migliorative della PPI dell'ABI sistemico, abbiamo studiato gli effetti di iniezioni ICV di questo composto (1 mg/1 ml) su parametri del riflesso di startle e di PPI (Fig. 5). L'analisi della startle non ha rivelato significativi effetti principali di ABI [F (1,30) = 3.80, NS] o APO [F (1,30) = 0,46, NS]. L'interazione tra i due trattamenti non ha influenzato l'ampiezza della startle [F (1,30) = 0,41, NS] (Fig. 5A). Inoltre, abbiamo riscontrato una significativa interazione pretrattamento \times trattamento rispetto ai valori PPI, che indica che l'infusione ICV ABI ha migliorato significativamente i deficit PPI indotti da APO [F (1,30) = 3.63, p <0.05] (Fig. 5B).

Figura 5

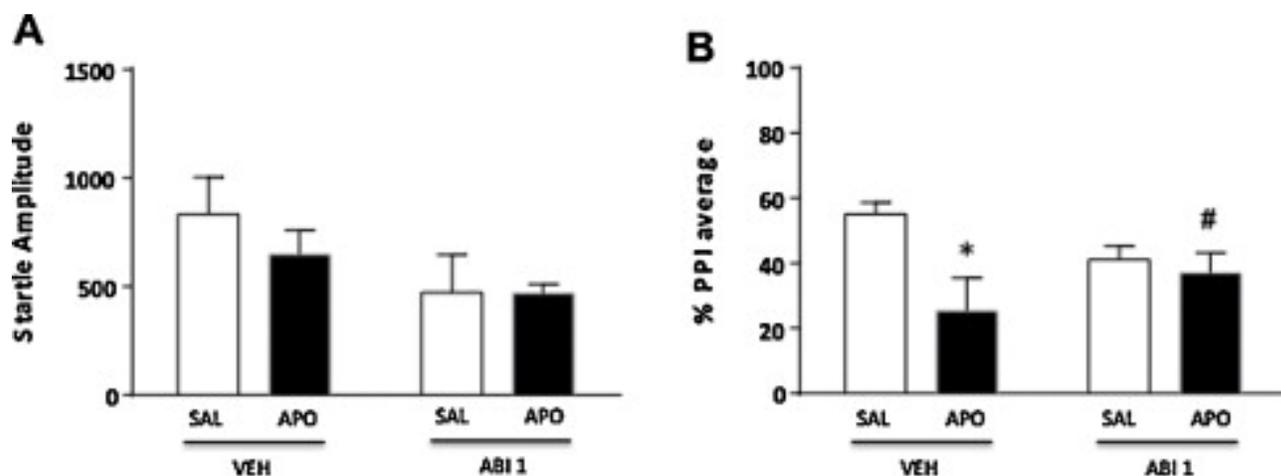


Figura 5. Effetti della somministrazione intracerebroventricolare di abiraterone (ABI, 1 mg / ml) sulla startle (A) e sulla PPI % (B) in relazione ai deficit gating indotti da apomorfina sistemica (APO, 0,25 mg / kg, SC). Le dosi ABI sono indicati in mg (in 1 ml di soluzione). VEH, veicolo di ABI (soluzione Ringer / β -ciclodestrina idrossipropile, 20% p / v). I valori sono espressi come media \pm S.E.M. N = 8-9 / gruppo. * P < 0,05 vs ratti trattati con VEH e soluzione salina (interazione pretrattamento \times trattamento); #P < 0.05 vs ratti trattati con VEH e APO.

Effetti di indometacina sui parametri di startle e PPI

In questi esperimenti, abbiamo testato gli effetti dell'inibitore della 3 α -HSD indometacina (INDO) (5 mg/kg, IP), sul deficit di PPI mediato da apomorfina (APO, 0,25 mg / kg, SC). L'analisi della startle ha rivelato una significativa

interazione tra pretrattamento e trattamento [$F(1,31) = 5,47, P < 0,05$] (Fig. 6A). I confronti post hoc hanno rivelato che questo effetto riflette una tendenza statistica per una differenza tra INDO + SAL vs INDO + APO ($P < 0,10$; test di Tukey).

L'analisi della PPI ha evidenziato un significativo effetto principale del trattamento con APO [$F(1,31) = 37,52, p < 0,001$], ma non con INDO [$F(1,31) = 0,53, NS$]. Infine, non è stata trovata alcuna significativa interazione fra pretrattamento x trattamento [$F(1,31) = 0,31, NS$], indicando che INDO non è stata in grado di contrastare il deficit di PPI mediato da APO (Fig. 6B).

Effetti del trilostano sui parametri di startle e PPI

Per studiare il ruolo della 3β -HSD nella regolazione DAergica della PPI, abbiamo poi misurato l'impatto di diverse dosi di trilostano (TRI, 15-60 mg/kg, IP), l'inibitore selettivo di questo enzima, in associazione con APO (0.25 mg / kg, SC). L'analisi della startle ha rilevato una significativa interazione pretrattamento x trattamento [$F(3,72) = 4,56, P < 0,01$] (Fig. 6C). L'analisi post hoc ha evidenziato che la combinazione di APO con la dose maggiore di TRI ha diminuito significativamente l'ampiezza della startle in confronto con l'associazione di VEH e SAL ($P < 0,05$, Tukey). L'analisi della PPI non ha rivelato un significativo

effetto principale del pretrattamento [$F(3,72) = 0,19$, NS]. Come previsto, però, APO ha prodotto un deficit marcato della PPI [effetto del trattamento principale $F(1,72) = 109,2$, $p < 0,001$], che non è stato invertito dal pretrattamento con TRI [interazione pretrattamento \times trattamento: $F(3,72) = 0,64$, NS] (Fig. 6D).

Figura 6

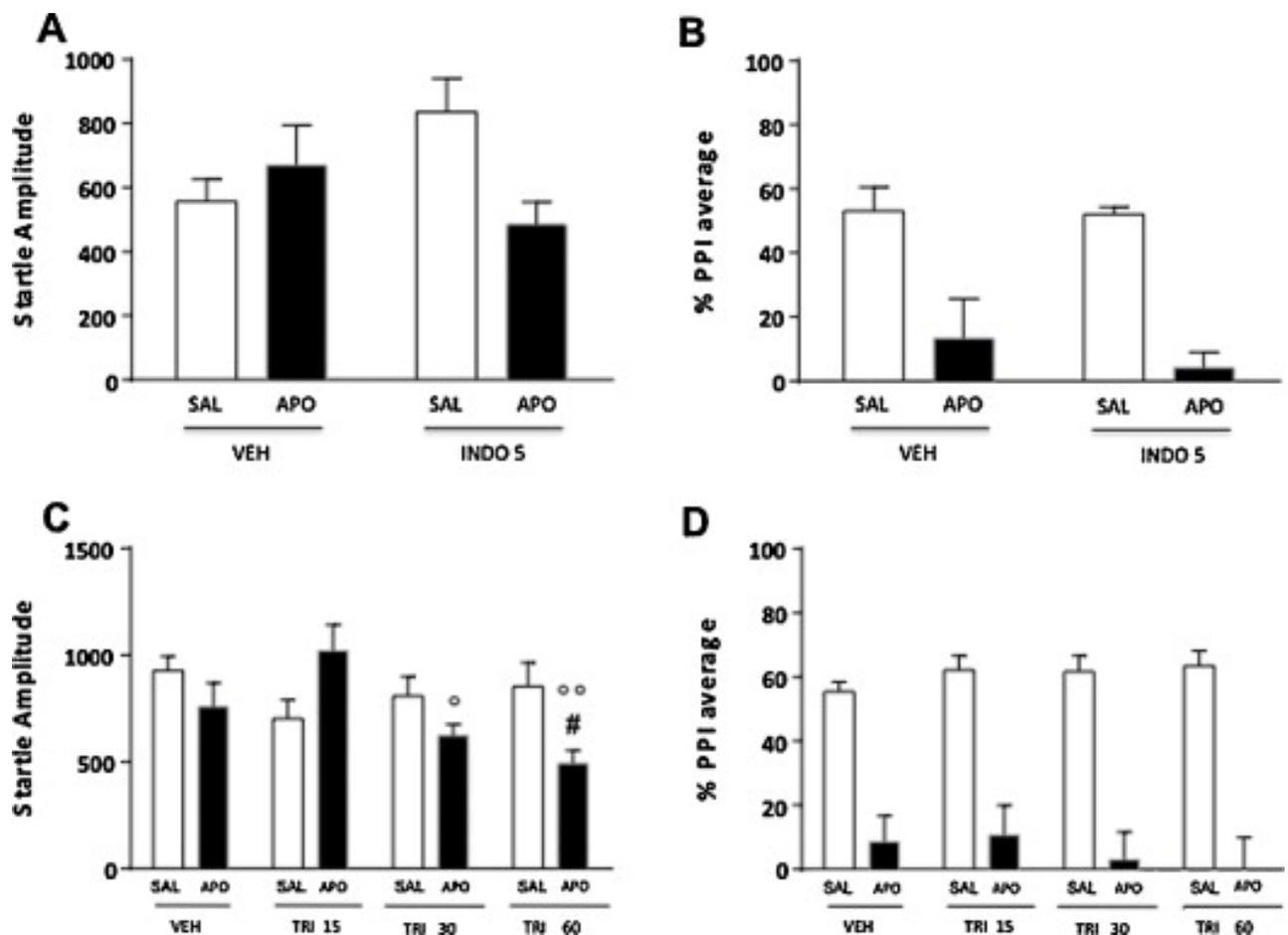


Fig. 6. Effetti della somministrazione sistemica di indometacina (INDO, 5 mg / kg, IP) e trilostano (TRI, 15-60 mg / kg, IP) su riflessi di startle (A-C) e % PPI (B-D) in relazione ai deficit di gating indotti da apomorfina sistemica (APO, 0,25 mg / kg, SC). Le dosi di

INDO e TRI sono indicate in mg/kg. VEH, veicolo di TRI e INDO; SAL, salina. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. N = 7-17 / gruppo. #P <0,05 vs ratti trattati con VEH e APO; ° P <0.05, °° P <0,01 vs ratti trattati con TRI 15 e APO (interazione pretrattamento \times trattamento). Gli effetti principali non sono indicati.

Effetti dei ligandi per i recettori agli androgeni sui parametri di startle e PPI

Per la valutazione del ruolo dei recettori agli androgeni (AR) sulle funzioni di startle e gating, abbiamo studiato l'effetto dei suoi ligandi naturali testosterone (T) e di-idrotestosterone (DHT; 100 mg / kg, IP) e dell'antagonista flutamide (FLU, 10 mg / kg, IP). Come mostrato in Fig. 7A, l'ampiezza della startle non è stata modificata dal pretrattamento con T [F (1,22) = 0,81, NS] o dal trattamento con APO [F (1,22) = 0.04, NS]. E' stata identificata una tendenza statistica per l'interazione pretrattamento \times trattamento [F (1,22) = 3.34; P = 0.07]. L'analisi della PPI (Fig. 7B) ha rivelato che il T non ha modificato la PPI, mentre l'APO ha significativamente ridotto il gating [F (1,22) = 26.08, p <0.001], anche se questo effetto non è stato impedito dal pretrattamento con T [F (1, 22) = 0.01, NS].

Gli effetti sistemici del DHT (Fig. 7C e D) sono stati simili a quelli osservati dopo l'iniezione di T, senza effetti complessivi sull'ampiezza della startle [F (1,27) = 0.05, NS]. Inoltre, è stata trovata una tendenza statistica per l'effetto principale

di APO [F (1,27) = 3.38, P = 0.07] e per l'interazione pretrattamento × trattamento [F (1,27) = 3.87, p = 0.06]. Inoltre, il DHT non ha influenzato significativamente la PPI [F (1,27) = 0.05, NS], mentre APO ha ridotto significativamente il parametro [F (1,27) = 36.33, p <0.001]. Infine, la somministrazione di DHT non è stata in grado di invertire il deficit di PPI indotto da APO [F (1,27) = 2.46, NS].

Figura 7

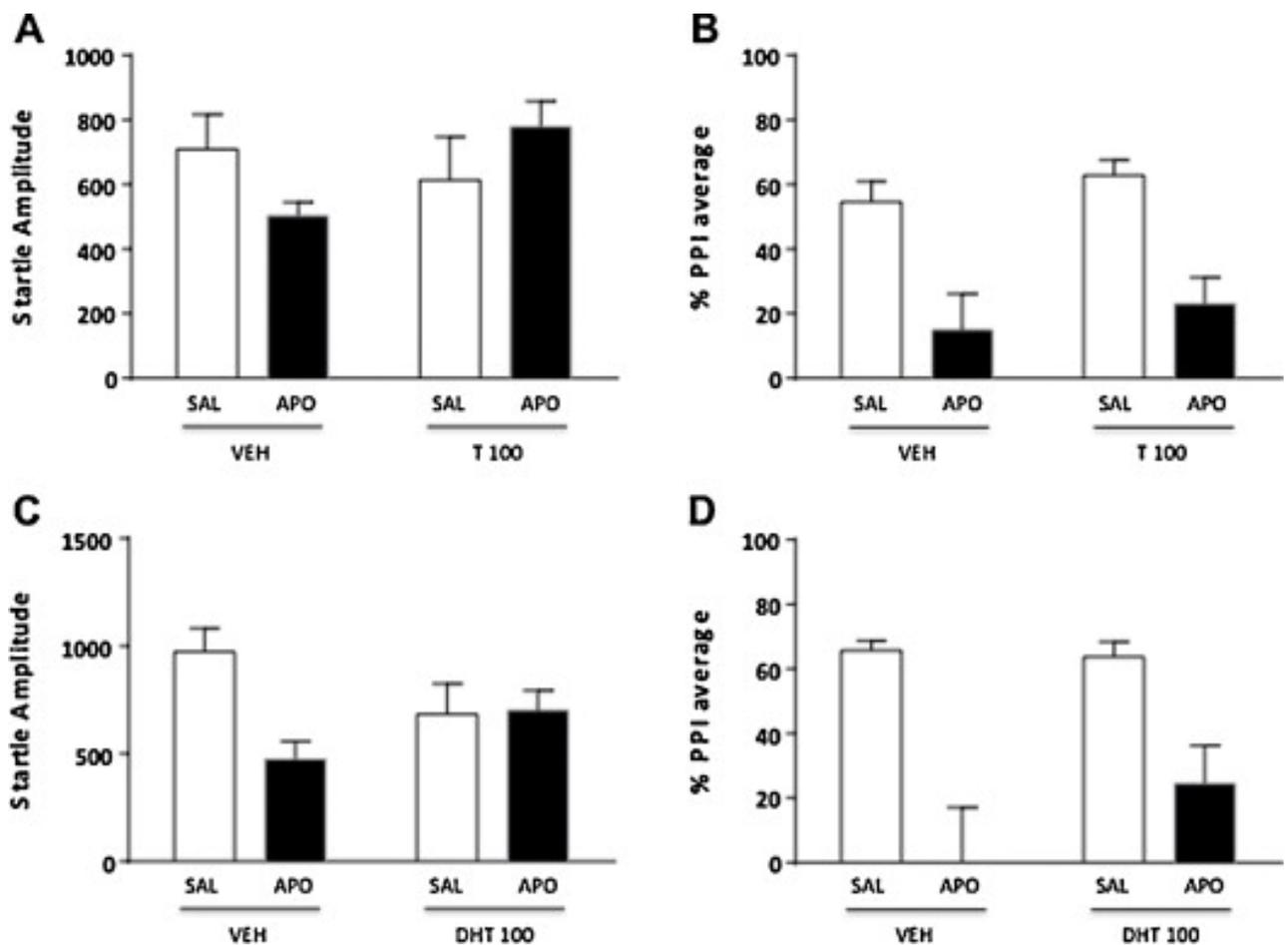


Figura 7. Effetti della somministrazione sistemica di testosterone (T, 100 mg/kg, IP) e diidrotosterone (DHT, 100 mg / kg, IP) sul riflesso di startle (A-C) e sulla PPI (B-D) in relazione ai deficit di gating indotti da apomorfina sistemica (APO, 0,25 mg / kg, SC). VEH, veicolo di T e DHT; SAL, salina. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. N = 6-10/gruppo. Gli effetti principali non sono indicati.

L'ultima serie di esperimenti ha studiato gli effetti del blocco degli AR tramite iniezione sistemica di flutamide (FLU), sui parametri di startle e PPI. L'ANOVA ha rilevato una significativa interazione pretrattamento x trattamento sull'ampiezza di startle [$F(1,28) = 30.82, p < 0.001$] (Fig. 8A). L'analisi post hoc condotta con il test di Tukey ha rivelato differenze significative tra VEH + SAL e FLU + SAL ($p < 0.001$), VEH + APO e FLU + SAL, ($p < 0.01$), VEH + APO e FLU + APO ($P < 0.05$), FLU + SAL e FLU + APO ($P < 0.001$). Infine, l'analisi della PPI ha rilevato un significativo effetto principale del trattamento con APO [$F(1,28) = 31.30, p < 0.001$], ma non per il pretrattamento con FLU [$F(1,28) = 0.20, NS$]. Non è stata trovata alcuna interazione pretrattamento \times trattamento [$F(1,28) = 0.72, NS$] (Fig. 8B).

.....

Figura 8

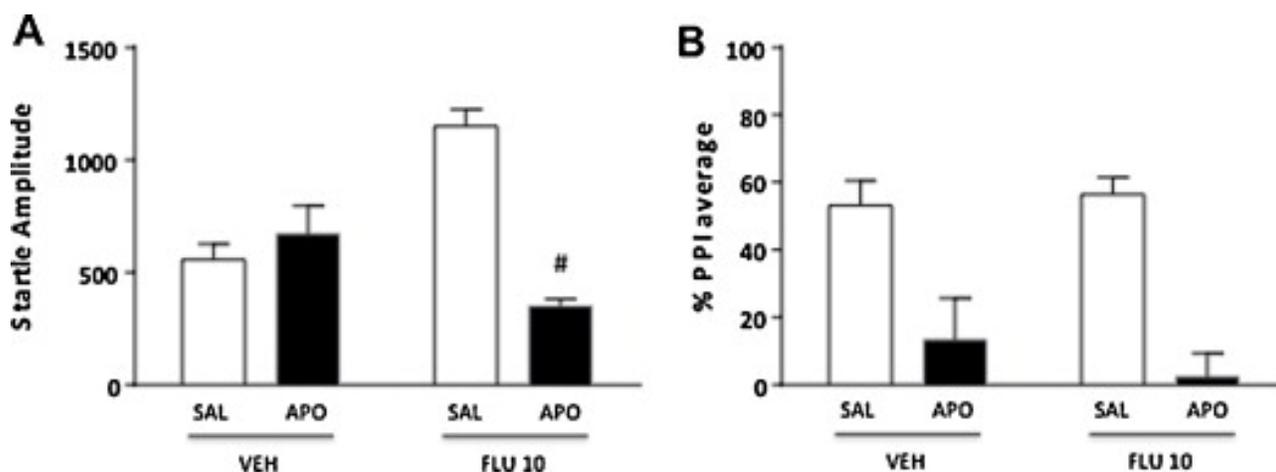


Figura 8. Effetti della somministrazione sistemica di flutamide (FLU, 10 mg / kg, IP) sul riflesso di startle (A) e sulla PPI (B) in relazione ai deficit di gating indotti da apomorfina sistemica (APO, 0,25 mg / kg, SC). VEH, veicolo della FLU; SAL, salina. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. N = 8/gruppo. [#]P <0.05 vs ratti trattati con VEH e APO. Gli effetti principali non sono indicati. Effetti di flutamide sistemica (FLU, 10 mg / kg, IP) su riflessi di startle (A) e % PPI (B) in relazione ai deficit gating indotte da apomorfina sistemica (APO, 0,25 mg / kg, SC). VEH, veicolo della FLU; SAL, salino. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. N = 8 / gruppo. [#]P <0.05 vs ratti trattati con VEH e APO. Effetti principali non sono indicati

Discussione

Il principale risultato di questo studio è che l'ABI, selettivo inibitore del CYP17A1, ha portato ad una inversione dose-dipendente dei deficit di PPI indotti dall'agonista diretto della DA APO. In particolare, questi effetti sono stati osservati dopo iniezioni sia sistemica che ICV, e non sono stati accompagnati da variazioni della startle. Il CYP17A1 è un membro della famiglia del citocromo P450, responsabile per la biosintesi degli androgeni dagli steroidi C21 (quali il progesterone e pregnenolone, Fig. 1). L'enzima catalizza due reazioni separate, consistenti nella idrossilazione del terminale 17 α (17 α -idrossilasi) e nella rottura del legame tra gli atomi di carbonio in posizione 17 e 20 (C17,20 liasi), rispettivamente, (per una maggiori informazioni sull'enzima, vedere Porubek, 2013). In particolare, questo enzima è responsabile della sintesi di steroidi androgeni; di conseguenza, i maschi con una selettiva carenza di C17,20 liasi mostrano ridotti livelli di ormoni sessuali e grave de-mascolinizzazione (Miller, 2012). Queste premesse, insieme con i nostri precedenti risultati sulle azioni antipsicotico-simili degli inibitori della 5 α R (Bortolato et al., 2008 e Devoto et al., 2012), indicano l'implicazione della sintesi degli androgeni nella modulazione del controllo DAergico dell'elaborazione delle informazioni. Inoltre, questi dati possono dar conto per la predominanza maschile della schizofrenia, della sindrome di Tourette e di altri disturbi neuropsichiatrici caratterizzati da deficit del gating e perturbazioni DAergiche.

.....

Gli effetti della infusione ICV di ABI sono stati paragonabili a quelli conseguenti il trattamento sistemico, suggerendo il coinvolgimento del CYP17A1 cerebrale negli effetti antipsicotico-simili dello ABI. Anche se l'espressione di CYP17A1 è più abbondante nella corteccia surrenale, l'immunoreattività per questo enzima è stata anche ritrovata in diverse regioni del cervello, come ippocampo, ipotalamo, tronco cerebrale e cervelletto (Strömstedt e Waterman, 1995 Yamada et al., 1997, Kohchi et al., 1998 e Hojo et al., 2004). Inoltre, studi di ibridizzazione in situ hanno documentato la presenza dello mRNA del CYP17A1 in regioni chiave per la regolazione DAergica della PPI, come la corteccia, lo striato e l'ippocampo (Allen Atlas; <http://mouse.brain-map.org/gene/mostra/12855>; Swerdlow et al., 2001). Mentre i nostri esperimenti non consentono una caratterizzazione delle specifiche regioni cerebrali coinvolte negli effetti anti-DAergici di ABI, è opportuno notare che i deficit di PPI indotti da APO sono supportati da più zone del circuito CSTC, compreso il nucleo accumbens core, la corteccia prefrontale mediale e il subiculum ventrale (Hart et al., 1998 e Swerdlow et al., 2001)

I nostri risultati hanno dimostrato che l'ABI e la FIN hanno suscitato effetti analoghi sulla regolazione PPI, anche se gli effetti di quest'ultimo farmaco sono stati più marcati. E' possibile che le proprietà antipsicotico-simili di questi agenti possano essere parzialmente supportate dagli stessi substrati. Rispetto a questa

ipotesi, vale la pena notare che gli effetti sistemici della FIN sono stati riprodotti da iniezioni locali nella shell e nel core del nucleo accumbens, ma non in altre regioni del cervello (Devoto et al., 2012). Questi risultati suggeriscono che il nucleo accumbens possa essere implicato nel contributo dei neurosteroidi sulla modulazione del gating sensorimotorio, e indica il coinvolgimento di questa regione cerebrale nelle proprietà antipsicotico-simili dello ABI.

La possibilità che ABI e FIN inducano effetti simili è particolarmente interessante, in considerazione del potenziale traslazionale dei nostri risultati. Infatti, i nostri risultati preclinici sulle proprietà antipsicotico-simili di FIN (Bortolato et al., 2008) sono stati riprodotti dagli effetti terapeutici di questo agente nei pazienti affetti da sindrome di Tourette (Bortolato et al., 2007 e Muroi et al., 2011) così come schizofrenia (Koethe et al., 2008) e altri disturbi (PABA et al., 2011). In particolare, l'ABI è già stato approvato per uso clinico come agente chemioterapico per il trattamento del cancro alla prostata resistente alla castrazione (Attard et al., 2009 e de Bono et al., 2011).

Le inibizioni della 5α R e del CYP17A1 condividono una serie di risultati simili per quanto riguarda la neurosteroidogenesi. Infatti, entrambi gli enzimi portano a una riduzione significativa dei derivati androstanici 5α -ridotti, come androsterone e 5α -androstanedione. E' importante sottolineare che quest'ultimo

composto è il prodotto metabolico delle azioni enzimatiche combinate di 5 α R e CYP17A1 sul progesterone, e può quindi essere direttamente implicato negli effetti anti-DAergici di FIN e ABI. Inoltre, il maggiore effetto antipsicotico-simile di FIN rispetto ad ABI suggerisce che il sensorimotor gating può essere parzialmente regolato da neurosteroidi non androgenici (non direttamente interessati da ABI), come l'allopregnanolone. In accordo con questa ipotesi, studi recenti suggeriscono l'implicazione di questo composto nella modulazione della PPI (Darbra e Pallarès 2010, Darbra et al., 2012 e Darbra et al., 2013). Tuttavia, la mancanza di una analisi neurochimica nel presente studio non permette di escludere completamente che gli effetti anti-DAergici di questi farmaci antiandrogeni possono essere supportati da basi differenti; infatti, solo la FIN ha prodotto una significativa riduzione della startle, riflettendo probabilmente meccanismi parzialmente divergenti fra i due farmaci sulla reattività comportamentale.

Questo studio ha evidenziato che l'inibizione di 3 α -HSD e 3 β -HSD per tramite di INDO e TRI, rispettivamente, non ha suscitare effetti significativi sul gating sensomotorio. Entrambi gli enzimi sono stati descritti nel cervello dell'uomo e dei roditori (Dupont et al., 1994 Khanna et al., 1995a, Khanna et al., 1995b e Yu et al., 2002), dove sono posti a svolgere ruoli chiave nella biosintesi dei

neurosteroidi, catalizzando la conversione dei $\Delta 5$ -idrossisteroidi in $\Delta 4$ -chetosteroidi. Tuttavia, va notato che la mancanza di effetti può significare che INDO e TRI sono inibitori competitivi e la loro attività può quindi essere limitata da un accumulo di substrato. Così, una valutazione conclusiva del ruolo di 3α -HSD e 3β -HSD nella regolazione della PPI attende lo sviluppo di nuovi inibitori non competitivi altamente selettivi per questi enzimi.

La mancanza di effetti da parte della FLU suggerisce che gli effetti degli androgeni in PPI potrebbero non essere mediati dagli AR. L'esistenza di recettori di membrana è stata ipotizzata da diversi autori, in base alla capacità degli androgeni di modulare rapidamente l'attività dei canali ionici e i livelli intracellulari di calcio (Heinlein e Chang, 2002). Gli effetti non genomici sono probabilmente mediati attraverso i recettori di membrana degli androgeni. È interessante notare che è stato clonato un recettore di membrana umano per il progesterone (Gerdes et al., 1998 e Bernauer et al., 2001). Inoltre, sono stati recentemente identificati nuovi recettori di membrana per gli altri ormoni steroidei (Fernández-Pérez et al., 2008).

.....

In particolare, la FLU è stata utilizzata come potenziale terapia per la sindrome di Tourette (Peterson et al., 1998), producendo effetti molto limitati e di breve durata. Così, mentre sia la FIN che la FLU sono generalmente etichettati come farmaci "anti-androgenici", il contrasto negli effetti tra questi due agenti può rivelare una maggiore implicazione della 5AR nella fisiopatologia della sindrome di Tourette. Futuri studi clinici in doppio cieco su FLU, controllati con placebo, aiuteranno a risolvere questo interessante problema.

La somministrazione sistemica di T e DHT non ha svelato alcun effetto intrinseco sulla PPI, a ulteriore sostegno dell'ipotesi che questi potenti attivatori dei recettori per gli androgeni possono non essere direttamente responsabili degli effetti di FIN e ABI sulle risposte DAergiche. È interessante notare che i nostri dati completano i risultati precedenti di Van den Buuse e Eikelis (2001), che hanno documentato che, nei ratti femmina, T e estradiolo, ma non DHT, hanno migliorato la PPI. Questi effetti divergenti suggeriscono l'esistenza di differenze sesso-specifiche nel destino metabolico del T, che possono scaturire in diversi ruoli di questo steroide per quanto riguarda la regolamentazione della PPI. Inoltre, i nostri risultati non escludono la possibilità che, nei maschi, T possa ancora giocare un ruolo facilitatorio per le dis-regolazioni DAergiche. E' stato segnalato che la somministrazione acuta di T aumenta i livelli di DA in neostriato

e nel nucleo accumbens (de Souza Silva et al., 2009), mentre il T cronico può aumentare metabolismo e turn-over della DA, ma non i suoi livelli cerebrali (Thiblin et al., 1999). Inoltre, recenti scoperte indicano che T e DHT aumentano l'espressione degli enzimi biosintetici e metabolici della DA nella substantia nigra di ratti maschi (Purves-Tyson et al., 2012). Sono necessari ulteriori studi per analizzare se la combinazione di questi steroidi con dosi sub-soglia di liberatori della DA (come la d-amfetamina), possa causare disturbi della PPI.

Anche se l'incapacità di T, DHT e FLU di incidere sul deficit di PPI APO-indotto può sembrare apparentemente in contraddizione con i nostri risultati sulle proprietà anti-DAergiche di ABI e FIN, si deve rilevare che, a differenza T e DHT, la maggior parte dei neurosteroidi androgeni 5α ridotti non esercitano le loro proprietà neuroattive tramite gli AR. Ad esempio, il 3β , 5α -androstanediolo ha dimostrato di essere un potente agonista dei β -recettori degli estrogeni (Kuiper et al., 1997), mentre il 3α , 5α -androstanediolo è un modulatore positivo dei recettori GABA-A (Reddy e Jian, 2011). Inoltre, l'androsterone ha dimostrato di attivare i recettori farnesoidi (Wang et al., 2006). L'implicazione di questi recettori nei meccanismi di elaborazione dell'informazione richiede ulteriori indagini.

.....

Questo studio deve tenere conto di alcune limitazioni. In primo luogo, le nostre analisi sono state limitate ai maschi, circoscrivendo in tal modo la nostra capacità di prevedere se gli effetti antipsicotico-simili osservati con l'inibizione del CYP17A1 possono essere applicabili alle femmine. In secondo luogo, un altro importante caveat del nostro studio sta nella mancanza di selettivi inibitori per 3 α - e 3 β -HSD. Infatti, sia INDO e TRI sono noti per esercitare le loro azioni anche attraverso altri meccanismi, ossia l'inibizione della sintesi delle prostaglandine e l'attivazione dei recettori β -estrogeni, rispettivamente (Vane e Botting, 1998 e Espallergues et al., 2011). In terzo luogo, le conclusioni che INDO e FLU non proteggono dai deficit PPI APO-indotti, sono limitate dalla mancanza di curve dose-risposta; sebbene le dosi per entrambi i composti siano state selezionate sulla base di una attenta ricerca bibliografica, non possiamo escludere completamente che concentrazioni più elevate (o trattamenti cronici) possano suscitare effetti migliorativi sul gating sensomotorio. In quarto luogo, la nostra interpretazione degli effetti riportati degli inibitori neurosteroidogenici su riflesso di startle e PPI è limitata dalla mancanza delle misure dei loro effetti sul profilo degli steroidi; tuttavia, occorre chiarire che tale limitazione non può essere facilmente superata attualmente, poiché il livello della maggior parte dei neurosteroidi (in particolare i derivati 3 α , 5 α - e 3 β , 5 α -androstanici) non può essere rilevato con precisione nelle aree cerebrali di ratto, a causa del loro contenuto relativamente basso.

Indipendentemente dagli specifici meccanismi d'azione, i risultati indicano il CYP17A1 come un potenziale bersaglio per alcuni disturbi comportamentali caratterizzati da deficit del gating, come la schizofrenia e la sindrome di Tourette. In particolare, dopo la scoperta dell'effetto antipsicotico-simile degli inibitori della 5 α R utilizzando il modello della perturbazione della PPI APO-indotta nel ratto, abbiamo perseguito la possibilità che gli inibitori 5 α R possano avere un'efficacia terapeutica di queste condizioni (Bortolato et al., 2007, Koethe et al., 2008 e Muroi et al., 2011). In conseguenza di ciò, è possibile che gli inibitori del CYP17A1 possano indicare nuove prospettive terapeutiche per i disturbi mentali caratterizzati da alterazioni del gating sensomotorio. In particolare, questa possibilità è evidenziata dal recente sviluppo di farmaci che inibiscono più specificamente la C17,20 liasi e risparmiano la 17 α -idrossilasi, come l'orterone (TAK-700; Hara et al, 2013). Questi farmaci di nuova generazione, che inducono un minor numero di effetti collaterali a causa della mancanza di effetti sulla sintesi dei glucocorticoidi, possono avere importanti implicazioni nella terapia di disturbi psichiatrici.

.....

Capitolo 2

Ruolo dei neurosteroidi nel gioco d'azzardo patologico

L'obiettivo della seconda parte della mia ricerca è stato la caratterizzazione dei meccanismi neurochimici che determinano gli effetti terapeutici degli inibitori della 5 α -reduttasi (5AR) nei disturbi del controllo degli impulsi, in particolare quelli correlati ad alterazioni della funzionalità del sistema dopaminergico.

I disturbi del controllo degli impulsi (ICD) - come il gioco d'azzardo patologico, l'aggressività patologica o la piromania - hanno un impatto devastante sulla società e sulla salute pubblica. Recenti dati epidemiologici stimano che gli ICD possono affliggere il 24,8% della popolazione generale, con la prevalenza del 15% circa per l'aggressività patologica (nelle tre varianti nosografiche di disturbo esplosivo intermittente, disturbo antisociale di personalità e disturbo della condotta) (Nock et al 2006) e 2-5,5% per il gioco d'azzardo patologico (Petry et al 2005). In aggiunta, in una vasta gamma di disturbi neuropsichiatrici, che comprendono il disturbo ossessivo-compulsivo (OCD), la sindrome di Tourette, la schizofrenia, il disturbo bipolare, disturbi correlati all'abuso di sostanze, ecc., sono presenti delle alterazioni nel controllo degli impulsi, come aggressività, impulsività, compulsività, personalità sensation-seeking e capacità decisionale

ridotta. Lo scarso controllo degli impulsi è uno dei fattori che più complicano la gestione dei pazienti psichiatrici, e pone una serie di sfide sostanziali al personale sanitario. Ad esempio, l'aggressività e l'impulsività ostacolano notevolmente la prestazione delle cure sanitarie di alta qualità nella diagnosi e nel trattamento dei disturbi mentali (Harris e Lurigio 2007), nonché la compliance dei pazienti agli interventi psico- e farmaco-terapeutici.

L'attuale armamentario farmacologico per la terapia dei disturbi del controllo degli impulsi è estremamente limitato, e consiste principalmente di alcuni farmaci antipsicotici e antidepressivi. Tuttavia, l'efficacia clinica di questi farmaci è altamente insoddisfacente, e spesso complicata da gravi effetti collaterali. Ad esempio, anche se gli antipsicotici sono considerati i farmaci più efficaci per ridurre l'aggressività e la compulsività, essi inducono sedazione, appiattimento affettivo ed effetti extrapiramidali, e hanno un tasso estremamente basso di compliance terapeutica.

Questo scenario evidenzia l'urgente necessità di trovare nuove strategie terapeutiche per la cura degli ICD. Nella ricerca condotta per questa tesi di dottorato ho preso in esame in particolare questa esigenza, individuando nuovi bersagli terapeutici per i disturbi del controllo degli impulsi. Uno dei problemi chiave nell'identificare nuove terapie per i disturbi del controllo

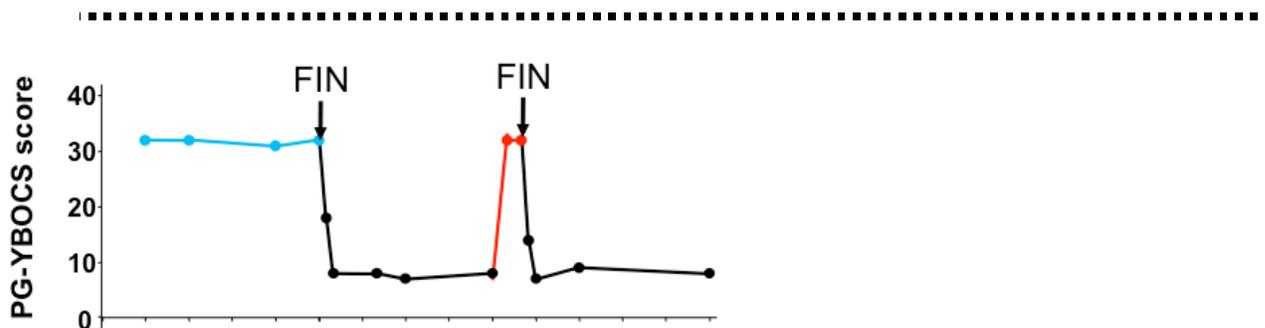
degli impulsi è che la loro fisiopatologia è ancora in gran parte poco chiara. La maggior parte degli studi ha dimostrato che la regolazione neurochimica del controllo degli impulsi è orchestrata dai sistemi monoaminergici, e in particolare da quelli della serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) e della dopamina (DA). Tuttavia, altri fattori biologici intervengono nella modulazione del controllo degli impulsi. In particolare, evidenze convergenti indicano che gli androgeni e i neurosteroidi possono mediare un ruolo chiave nella fisiopatologia di ICD, aggressività e disturbi correlati: a) i disturbi del controllo degli impulsi come piromania e gioco d'azzardo patologico sono più prevalenti o hanno un decorso più insidioso nei maschi (Associazione 2006; Ellenbogen et al 2007), e l'aggressività patologica si verifica molto più spesso nei maschi rispetto alle femmine (DSM IV-TR 2006). Inoltre, anche se OCD, disturbi psicotici e mania sono ugualmente prevalenti nei due sessi, il loro decorso è in genere più grave negli uomini, con esordio più precoce ed esito clinico peggiore (Akhondzadeh et al 2006; DSM-IV TR 2006; Leung e Chue 2000); b) gli androgeni inducono o aggravano i sintomi impulsivi e aggressivi (Hermans et al 2008); c) altri neurosteroidi, come l'allopregnanolone (AP) sono stati implicati nella fisiopatologia di molti disturbi emotivi oltre che dell'aggressività (Pibiri et al 2006). Anche se il ruolo degli steroidi nella regolazione del controllo degli impulsi è indicato da numerosi studi, i meccanismi neurobiologici che ne stanno alla base sono poco conosciuti.

Le indagini sugli effetti degli steroidi nel cervello sono limitate da diverse barriere concettuali e tecniche, tra cui: l'estrema complessità dell'apparato enzimatico per la steroidogenesi e la sua variabilità tra i diversi tipi di cellule e regioni del cervello (Ishii et al 2007; Mellon et al 2001; Micevych e Sinchak 2008); l'elevato numero di metaboliti steroidei; i numerosi meccanismi molecolari che mediano l'azione degli androgeni e altri steroidi (Mostaghel et al, 2007), come recettori-canale, quelli accoppiati a proteine G, proteina chinasi e canali ionici.

La strategia più praticabile per studiare gli steroidi è la manipolazione degli enzimi che catalizzano la loro sintesi e metabolismo. Con questo approccio, è stato recentemente scoperto che il blocco di 5- α -reduttasi (5AR), il principale enzima limitante la sintesi dei neurosteroidi, suscita profondi effetti terapeutici nei pazienti affetti da disturbi neuropsichiatrici caratterizzati da scarso controllo degli impulsi, come il gioco d'azzardo patologico, la schizofrenia, la sindrome di Tourette e l'aggressività patologica (disturbo antisociale di personalità e disturbo intermittente esplosivo). In particolare, l'inibitore della 5AR finasteride è stato efficace in tre pazienti con malattia di Parkinson complicata da gioco d'azzardo patologico iatrogeno indotto da L-dopa (Bortolato et al., 2012). Infatti, le terapie sostitutive della dopamina sono strumenti affidabili per attenuare le difficoltà

motorie e la bradifrenia dei pazienti con malattia di Parkinson (PD); in individui predisposti, tuttavia, questi farmaci possono provocare ICD, come gioco d'azzardo patologico (pathologic gambling, PG), ipersessualità e shopping compulsivo. Nei tre casi clinici considerati, la finasteride ha prodotto una drastica riduzione dei comportamenti correlati al gioco d'azzardo e al rischio entro quattro settimane dall'inizio del trattamento, come misurato dal South-Oaks Gambling Screen, il test di riferimento per valutare il gioco d'azzardo patologico (Lesieur e Blume 1987). Inoltre, i pazienti hanno migliorato i loro punteggi netti allo Iowa Gambling Task, che misura le competenze decisionali e la capacità di perseguire le strategie più vantaggiose (Bechara et al 1997) (Fig. 9). Non è stato riscontrato alcun effetto collaterale significativo. Basandoci su questa importante scoperta, abbiamo studiato l'impatto di androgeni e steroidi neuroattivi nella regolazione dell'impulsività.

Figura 9



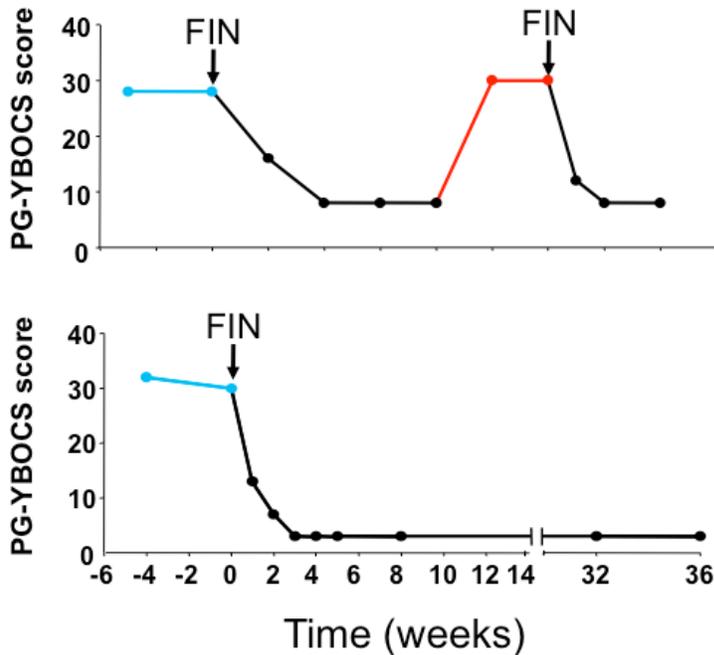


Fig. 9. In tre pazienti parkinsoniani la finasteride ha ridotto il gioco d'azzardo patologico (GAP) indotto dal trattamento con pramipexolo e/o cabergolina. Sono rappresentati gli effetti nel tempo di FIN (5 mg / die) sulla gravità del GAP. La linea rossa indica la sospensione della terapia con FIN. Il punteggio (PG-YBOCS) indica il livello di propensione al gioco patologico valutato con la Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale.

Il gioco d'azzardo patologico ha un impatto devastante sulle attività sociali, professionali e finanziarie degli individui affetti. L'attuale mancanza di trattamenti farmacologici efficaci e ben tollerati per il gioco d'azzardo patologico sottolinea l'urgente necessità di nuove strategie terapeutiche; di conseguenza, l'obiettivo a lungo termine della nostra ricerca è quello di individuare nuove terapie per il gioco d'azzardo patologico, che abbiano buona efficacia e tollerabilità. Un

ostacolo fondamentale al perseguimento di questo obiettivo è la nostra comprensione limitata della fisiopatologia del gioco d'azzardo patologico, in particolare in relazione ai suoi fattori precipitanti, come lo stress. Prove emergenti suggeriscono che un precoce stress psicosociale cronico può predisporre al gioco d'azzardo patologico (e, forse, alla depressione come comorbidità) attraverso alterazioni di molteplici aspetti del processo decisionale e di controllo degli impulsi; specificamente, si ritiene che la vulnerabilità al gioco d'azzardo patologico possa riflettere bassa “probability discounting” (ossia, la propensione alla scelta di gratificazioni o premi più grandi ma incerti invece di più piccoli e certi) ed elevato “delay discounting” (cioè, la preferenza per ricompense più piccoli ma immediate rispetto a ricompense grandi ma ritardate). A queste alterazioni di probability e delay discounting verosimilmente contribuiscono alterazioni funzionali dei recettori D2 e D3 della dopamina; infatti, recentemente è stato dimostrato che il pramipexolo, un potente agonista del recettore D2/D3 della dopamina, facilita lo sviluppo di gioco d'azzardo patologico e di altri problemi di controllo degli impulsi in soggetti vulnerabili. Tuttavia, i meccanismi biologici con cui lo stress psicosociale colpisce i recettori D2 e D3 e i loro ruoli funzionali nel controllo degli impulsi e del processo decisionale rimangono elusivi. Una delle classi di sostanze più promettenti come mediatori molecolari per questo collegamento è rappresentata dai neurosteroidi (cioè, gli steroidi sintetizzati nel cervello), che agiscono come regolatori chiave nella reattività allo

stress e nella neurotrasmissione dopaminergica. Questo concetto è sostenuto dalla scoperta che la finasteride ha esercitato un robusto effetto terapeutico in casi di gioco d'azzardo patologico indotto da agonisti dopaminergici (Bortolato et al., 2012).

I farmaci dopaminergici (levodopa, agonisti della dopamina e inibitori enzimatici del metabolismo della dopamina) sono utilizzati per sopperire alla perdita di dopamina conseguente alla degenerazione della substantia nigra che si verifica nella malattia di Parkinson (MP).

La malattia di Parkinson è associata a deplezione dei neuroni dopaminergici striatali e, in modo meno importante, mesocorticolimbici. Queste ultime aree possono essere sovrastimolate dai farmaci dopaminergici, portando ad alterazioni neuropsicologiche e a disfunzioni comportamentali. Più specificamente, i farmaci dopaminergici migliorerebbero il funzionamento dei sistemi neurali con bassi livelli basali di dopamina, mentre porterebbero a un dannoso sovradosaggio in altri sistemi dove i livelli di dopamina sono già ottimali. La disfunzione dei circuiti dopaminergici mesocorticolimbici è considerata una caratteristica distintiva di tutte le dipendenze da sostanze, in analogia è stato suggerito che l'abuso di farmaci dopaminergici in pazienti neurologici possa iper-stimolare le vie mesolimbiche, portando ad un disturbo simile a quello associato con la dipendenza da sostanze. Effettivamente, in un sottogruppo di pazienti affetti da

malattia di Parkinson, i farmaci dopaminergici presentano l'insidiosa potenzialità di essere usati compulsivamente. Questi pazienti richiedono e si auto-somministrano dosi aggiuntive di farmaco, a dispetto dell'apparenza di essere ben compensati farmacologicamente. Questa modalità di autotrattamento può predisporre a una vera e propria sindrome di dipendenza da dopamina, e porta a comportamenti sociali inadeguati. Il sovradosaggio ha effetti positivi immediati, in quanto produce una maggiore disponibilità di energia, maggiore produttività e attenuazione dei sintomi motori, e dal punto di vista emotivo, uno stato euforico ipomaniacale. Nel lungo periodo, tuttavia si manifestano, da un punto di vista motorio, movimenti involontari disabilitanti (discinesie) o ripetitivi e, da un punto di vista emotivo e comportamentale, atti impulsivi e compulsivi. Un ampio numero di dipendenze comportamentali possono essere associate a questa sindrome, come gioco d'azzardo patologico, shopping compulsive e ipersessualità.

Questa sindrome, conseguente l'uso compulsivo dei farmaci dopaminergici, è stata inizialmente chiamata con il nome di "disregolazione edonistica omeostatica" e viene attualmente identificata con il nome di Sindrome da Disregolazione della Dopamina (SDD). È importante sottolineare che molti di questi individui soddisfano i criteri per il disturbo da dipendenza da sostanze, così come viene classificato nel Manuale Diagnostico Statistico per i disturbi mentali (DSM-IV), in primo luogo a causa degli effetti negativi che questo uso compulsivo esercita sul

funzionamento sociale, psicologico e fisico. In alcuni casi, inoltre, i pazienti adottano strategie per poter avere accesso a maggiori quantità di farmaco. Tra queste si possono segnalare simulazioni di acinesie o tremori, posture distoniche o addirittura comportamenti aggressivi.

Questo uso compulsivo del farmaco è più comune negli uomini con un'insorgenza precoce della MP, con tratti di *novelty seeking* o con storia personale o familiare di dipendenza da alcool. Non sono ancora stati individuati chiari fattori di vulnerabilità e sono necessari studi epidemiologici su larga scala per esaminare meglio questa associazione.

Le proiezioni dopaminergiche dirette al nucleo accumbens sono implicate in comportamenti orientati alla gratificazione, sia direttamente come per rinforzi primari quali cibo, sesso (implicati per alimentazione incontrollata, ipersessualità), sia indirettamente come per i rinforzi secondari come soldi e *status symbol* (implicati per GAP e shopping compulsivo), sia in relazione alle proprietà gratificanti delle sostanze (come nel caso dell'abuso di farmaci dopaminergici e nell'abuso di sostanze).

Nei pazienti parkinsoniani è stata riscontrata una dissociazione fra piacere e desiderio che correla con l'attività dopaminergica. Numerosi lavori si stanno recentemente concentrando sul concetto di dipendenza comportamentale. Reuter et al. hanno osservato attraverso studi di *neuroimaging* che l'alterazione sottostante

il gioco d'azzardo patologico sia da imputarsi, in analogia con quanto riscontrato per la dipendenza da sostanze, ad una riduzione della sensibilità del sistema delle ricompense. In condizioni in cui il sistema striato ventrale sia scarsamente attivato (come nel caso del GAP, della dipendenza da sostanze e – da ultimo – della malattia di Parkinson), i rinforzi naturali non sono in grado di stimolare sufficientemente il sistema dopaminergico. Di conseguenza, gli individui possono cercare rinforzi ulteriori e molto più forti, come sostanze psicostimolanti, gioco d'azzardo, o altro per compensare la mancanza di attivazione. In sostanza, la denervazione dopaminergica striatale, e le alterazioni nei processi decisionali corticalmente mediate, che si osservano in pazienti con MP, possono interagire nel mantenere una maggiore sensibilizzazione nei confronti della terapia dopaminergica.

L'impulsività di scelta ulteriore è quella utilizzata riadattando il paradigma del “Delay Discounting” nei roditori. La capacità decisionale degli animali viene testata sulla base della scelta fra un rinforzo piccolo e immediato e uno grande ma rilasciato con ritardo. Normalmente l'animale predilige il rinforzo maggiore ma quando esso è associato ad un crescente ritardo sposta la sua preferenza verso il rinforzo minore ma immediato. Il soggetto impulsivo, intollerante al ritardo, sceglie l'opzione rinforzo piccolo e immediato più rapidamente di un soggetto non impulsivo. I modelli animali di “Delay Discounting” possono variare per le

differenti attrezzature (camera operante vs labirinto a T) e per le diverse metodologie utilizzate (ritardo tra le varie sessione vs entro una stessa sessione, rapporto tra ricompensa grande vs piccola, segnalazione del rinforzo vs non segnalazione ecc.). Il “Delay Discounting” analizza il processo decisionale tra due risultati prevedibili. Comunque, crescente interesse è stato attribuito al processo decisionale in condizioni di incertezza o di rischio. Il modello di “Probability Discounting”, da noi investigata, riflette l’impulsività associata al prendere decisioni in condizioni di rischio. In questo paradigma, gli animali vengono allenati a preferire una ricompensa grande ma incerta rispetto ad una piccola ma certa. Successivamente, però, la probabilità che venga rilasciata la ricompensa grande diminuisce progressivamente, fino a raggiungere livelli molto bassi, tali che questa scelta diventa matematicamente svantaggiosa in termini di ricompensa totale. La scelta impulsiva è quella che comporta una preferenza verso l’opzione più sicura. Il paradigma del “Probability Discounting” non riflette tanto il comportamento impulsivo quanto piuttosto un comportamento di scelta caratteristico del vero e proprio gioco d’azzardo. Infatti, il comportamento di rischio che viene determinato dal “Probability Discounting” potrebbe essere dovuto ad una mancanza di auto-controllo verso l’attrazione impulsiva per le grandi ricompense, piuttosto che dovuto ad una scelta impulsiva di per sé.

Di fronte a una scelta intertemporale, un organismo che sceglie un premio "minore-immediato" rispetto a un premio "maggiore-ritardato", si dice di avere un comportamento impulsivo.

Le differenze individuali nella scelta intertemporale sono effettivamente rappresentate da equazioni matematiche che incorporano parametri relativi a processi comportamentali come la sensibilità al "rinforzo", ovvero il premio, immediato o ritardato. Simulando dei cambiamenti in tali processi e individuando le condizioni in base alle quali è possibile provocare una scelta impulsiva, siamo in grado di prevedere e valutare i potenziali meccanismi comportamentali che stanno alla base dei casi clinici di impulsività. Il pramipexolo, un farmaco agonista dopaminergico, viene spesso associato ai comportamenti impulsivi dei soggetti a cui viene prescritto. La presente serie di esperimenti è stata progettata al fine di (a) replicare sistematicamente le condizioni in cui il pramipexolo induce una scelta di carattere impulsivo in ratti reserpinizzati per simulare una condizione "parkinson-like", e (b) per chiarire i meccanismi comportamentali a livello neurobiologico.

METODI

Per questo studio abbiamo messo a punto un nuovo modello animale di gioco d'azzardo patologico (GAP), che utilizza un paradigma di probability-discounting.

Nei nostri studi sono stati utilizzati ratti naive di ceppo Long Evans del peso compreso tra i 200 e 320 g, stabulati in condizioni di temperatura di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e di umidità del 60%. Acqua e cibo sono stati resi disponibili ad libitum e gli animali sono stati tenuti a cicli di 12/12-h di luce/buio, con la fase di buio dalle 7:00 di mattina fino alle 7:00 di sera. Al fine di ridurre lo stress durante gli esperimenti, ogni animale è stato abituato alla manipolazione per 5 minuti ogni giorno per 7 giorni, prima di ogni test comportamentale.

Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato etico locale ed eseguite in stretto accordo con le direttive per la cura degli animali da esperimento.

Apparati strumentali

Le sessioni sono state condotte in camere operanti (30.5x 24x 21 cm) alloggiare all'interno di camere insonorizzate dotate di un ventilatore interno (Med Associates Inc., St. Albans, VT) (Fig. 10).

Figura 10

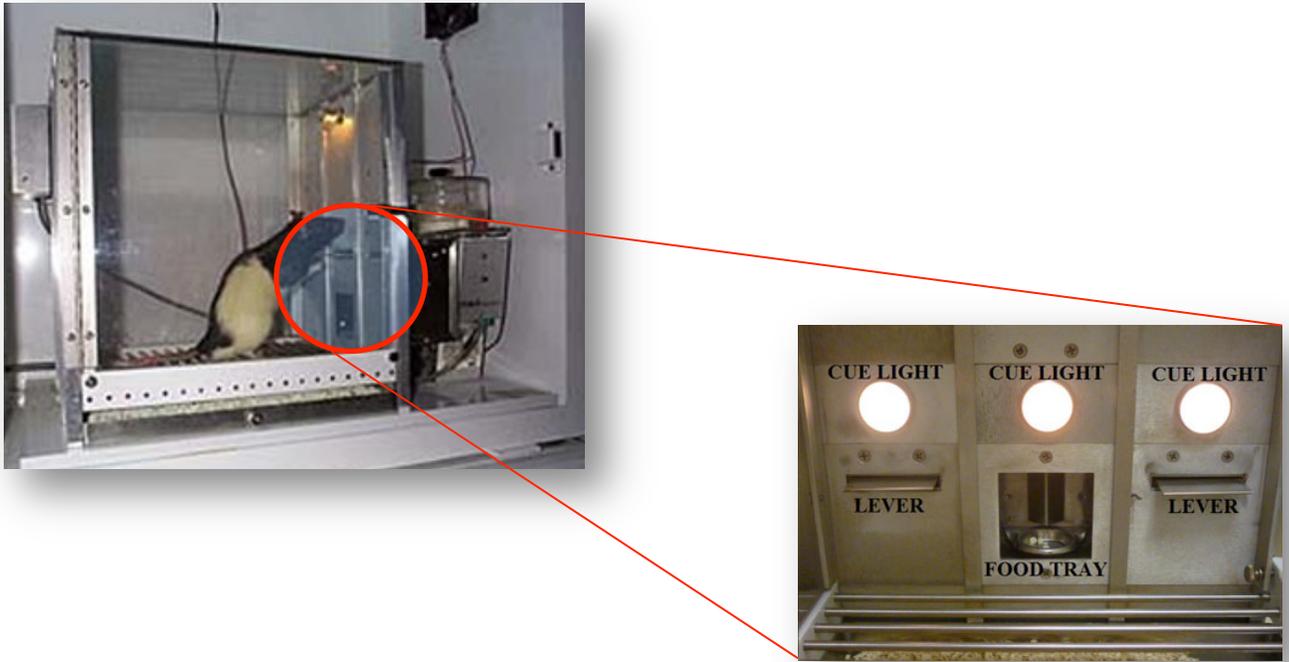


Fig. 10. I ratti sono addestrati a premere le leve in risposta a stimoli luminosi, per ricevere nel vassoio la ricompensa costituita da pellet alimentari.

Al centro della parete frontale della camera operante si trova posizionata una leva non retrattile. Da entrambi i lati, equidistante dalla leva centrale, si trovano invece delle leve laterali retrattili equipaggiate con lampade pre-stimolo posizionate sopra ciascuna leva. Direttamente sotto la leva centrale è collocato un ricettacolo di cibo dove un distributore di pellet consegna 45 mg di pellet zuccherini per roditori (Bio-Serv, Frenchtown, NJ). Una lampadina fornisce l'illuminazione generale (100 mA), tranne che durante gli intervalli interni ad ogni

sessione (inter-trial interval, ITI). Le camere sono dotate anche di un altoparlante che genera un rumore bianco o di fondo. Tutti gli eventi sperimentali sono stati coordinati e registrati tramite un PC.

Procedure comportamentali

Lever Press Training

I nostri protocolli sono stati adattati da quelli di Cardinale et al (2000). Un giorno prima dell'esposizione alla camera operante, i ratti sono stati introdotti, per l'ambientamento, all'interno della camera senza la presenza delle leve retrattili. I ratti successivamente sono stati addestrati con un determinato programma che prevedeva circa 60 pressioni in 30 min, prima per una leva e poi per l'altra (controbilanciato tra i soggetti verso sinistra / destra). Queste sessioni di prova hanno avuto inizio con le leve retratte e al buio. Ogni 40 s, un trial è stato avviato con l'illuminazione della "house light" e l'inserimento di una delle due leve nella camera. Se il ratto ometteva di premere sulla leva entro 10 s, la leva veniva retratta, la camera oscurata e il trial veniva segnato come un'omissione. Se il ratto aveva invece risposto entro 10 s, la leva si retraeva e un unico pellet veniva consegnato con una probabilità di vincita pari al 50%. Questa procedura è stata

usata per far familiarizzare i ratti alla natura probabilistica del test comportamentale.

Ogni sessione è composta da 40 trials separati in quattro blocchi da 10 prove ciascuna. All'interno di ogni blocco, le prime quattro prove sono state seguite da sei trial di scelta libera /scelta forzata, ovvero durante le prove a scelta forzata, una sola leva è stata resa disponibile per assicurare che il rinforzo SS (1 pellet di cibo) e LL (2 pellet) fosse disponibile. Durante le prove di scelta libera, le leve associate al rinforzo SS e LL erano entrambe messe a disposizione, permettendo la scelta tra le due opzioni. Una volta che i ratti hanno imparato a discriminare correttamente le funzioni delle leve, essi erano pronti per iniziare un periodo di training con l'esposizione di entrambe le leve. Infatti, durante tale periodo, se essi selezionavano la leva associata ad una ricompensa SS, entrambe le leve venivano retratte, le luci di stimolo si spegnevano, e 1 pellet veniva consegnato dal dispenser dopo 0,01 secondi (la minima risoluzione temporale). Se invece veniva scelta la leva associata ad una ricompensa di tipo LL, la sequenza procedurale veniva ripetuta con l'eccezione di 2 pellets consegnati dal dispenser. Se i ratti non premevano invece nessuna leva, sia quella centrale che quella laterale, entro 30 s, si considerava conclusa la prova che era valutata come un'omissione.

Una variabile ITI (inter trial interval) serve invece per garantire che le prove possano iniziare ogni 100 secondi. All'inizio di ogni sessione (cioè, il blocco della

prima prova), i rinforzi SS e LL sono entrambi disponibili da subito (0,01 s). Dal blocco successivo, c'è un ritardo per il rinforzo LL che viene aumentato di 10 s, in modo tale da produrre proporzionalmente ritardi di 10, 20 e 30 s e quindi incrementare una “risky choice” non più conveniente. Per separare invece i diversi blocchi, è stato introdotto un blackout di 180 s.

Risk assessment task

Il protocollo è stato modificato dalle procedure descritte da Cardinale e Howes (2005). I ratti sono stati sottoposti a sessioni giornaliere composte da 72 prove, separate in quattro blocchi di 18 trials. L'intera sessione ha la durata complessiva di 30 min, e gli animali sono stati addestrati 6-7 giorni alla settimana. Ogni sessione è iniziata al buio, con entrambe le leve retrate. Il trial ha inizio con 40 s di illuminazione proveniente dalla “house light” e con l'inserimento di una o entrambe le leve nella camera. Una leva è stata associata alla scelta rischiosa (LL) mentre l'altra leva ad una scelta certa (SS); tale disposizione è mantenuta costante per tutta la prova (controbilanciata sinistra / destra). Se il ratto non rispondeva entro 10 s dalla presentazione della leva, la camera veniva resettata e la prova considerata come omissione. Quando invece veniva scelta una leva, entrambe le leve venivano retrate e il pellet rilasciato dal dispenser. La scelta della leva associata alla SS forniva sempre un pellet, con la probabilità del 100%; la scelta della leva associate alla LL forniva invece 2 pellets ma con una particolare

probabilità di vincita. Una volta effettuata la pressione sulla leva e la consegna del cibo, la “house light” rimaneva accesa per altri 4 s, successivamente la camera ritornava allo stato iniziale pronta per iniziare un nuovo trial.

I 4 blocchi sono composti da otto prove di scelta forzata dove solo una leva viene presentata (quattro prove per ogni leva, randomizzato in coppia) per permettere agli animali di imparare le quantità di cibo associate ad ogni pressione della leva e la rispettiva probabilità di ricevere il rinforzo su ogni blocco. Questa era seguita da 10 prove di libera scelta, dove sono presentate entrambe le leve e l'animale doveva scegliere se premere la leva associata alla LL o SS. La probabilità di ottenere 2 pellets dopo aver premuto la leva LL variava tra i quattro blocchi: inizialmente 100%, poi 50, 25, e 12,5%, rispettivamente. I ratti sono stati addestrati in modo tale che essi (1) potevano scegliere la leva LL durante il primo blocco di prova (probabilità 100%) su almeno l'80% delle sperimentazioni di successo e (2) finchè dimostravano livelli basali di scelta stabili. I dati provenienti da tre sessioni consecutive sono state analizzati con ANOVA a due vie per misure ripetute tra i soggetti (giorno e il blocco di prova). Se si raggiungeva una significatività inferiore a p 0.05, gli animali venivano giudicati pronti e si poteva costruire una linea di base stabile. Tramite questo modello abbiamo testato l'effetto del trattamento con FIN in ratti resi parkinsoniani.

A questo scopo, in seguito all'acquisizione del condizionamento operante, i ratti sono stati trattati con reserpina, che, mediante deplezione delle vescicole sinaptiche, riduce i livelli di DA e quindi induce uno stato Parkinson-simile. Questa riduzione di DA probabilmente si traduce per compensazione in una ipersensibilità / up-regulation dei recettori D2/D3 post-sinaptici. In questa condizione la somministrazione di pramipexolo può produrre un eccesso di stimolazione dei recettori D2 / D3, che portano a un aumento della selezione della scelta rischiosa. Abbiamo valutato l'ipotesi che la FIN riduca la selezione della scelta rischiosa, attenuando l'attivazione dei recettori DAergici. Tre giorni dopo il trattamento con reserpina i ratti sono stati trattati con pramipexolo (0.3 mg/kg), che ha aumentato la selezione della scelta "a rischio". La FIN (25 mg/kg/die) ha invertito questo effetto e ripristinato un livello di selezione della scelta a rischio equivalente alla linea di base. Nei ratti trattati con pramipexolo, il tasso di gioco d'azzardo è aumentato a 0,5 probabilità di azzardo, che indica che questi animali non distinguono la differenza tra scelta "sicura" e scelta "a rischio". Invece, sembra che la FIN abbia ristabilito il contrasto tra la scelta selezionata e le dimensioni della ricompensa.

Motilità

L'attività motoria degli animali è stata valutata tramite actometro. Questo strumento, che è costituito fondamentalmente da una "force-plate", è stato progettato per lo studio efficiente ed accurato di soggetti in vivo (ad esempio, ratti e topi) che si trovano sotto l'effetto di farmaci o altri stimoli, consentendo in tali soggetti la determinazione simultanea di un elevato numero di parametri del movimento. L'apparecchiatura comprende una force-plate, diversi trasduttori che fungono da supporto della piastra, ed un computer interfacciato alle uscite dei trasduttori; inoltre, per confinare i soggetti in una zona predeterminata, l'actometro si avvale di una camera di plexiglass posizionata sopra la piastra. Esistono differenti software quali 4PLATES.PAS e OFFLINP.PAS necessari per il calcolo e la registrazione dei movimenti degli animali, derivanti sia dalla variazione nel tempo della posizione che dalla grandezza della forza esercitata sulla piastra. Tali parametri possono comprendere la posizione del soggetto sulla force-plate, la distanza percorsa in un periodo di tempo definito, l'angolo e la direzione di rotazione del movimento, la statistica spaziale, le stereotipie, il tremore e i comportamenti ritmici. Nell'actometro sono presenti quattro trasduttori di forza e pressione, con attività ergometriche (ovvero adatti alla misurazione ergometrica della spesa energetica). Inoltre, per poter quantificare le stereotipie ed eventuali altri movimenti indotti da farmaci o lesioni nell'animale

Grazie alla presenza della force-plate, è possibile determinare, in tempo reale, la variazione della posizione e / o la grandezza della forza esercitata dal soggetto sulla piastra. A questo punto, è possibile, attraverso l'uso di un adeguato software, determinare e / o quantificare diversi parametri relativi al movimento dell'animale, quali: la posizione del soggetto sul force-plate, la distanza percorsa dal soggetto per un periodo di tempo definito, l'angolo e la direzione di rotazione del movimento, una statistica spaziale del movimento del soggetto, stereotipie, tremori, sniffing. L'intero strumento è contenuto in una camera di plexiglass (quadrata o circolare) montata rigidamente in modo tale da confinare il soggetto in una regione predefinita della force-plate. Come precedentemente descritto, l'actometro force-plate è in grado di eseguire i calcoli in tempo reale. I risultati sono memorizzati e possono essere utilizzati anche successivamente per lo studio dell'attività locomotoria e / o relative informazioni sul movimento dell'animale. Nel corso del test, il processore esegue ripetutamente una prima serie di calcoli, con un intervallo di tempo di 0,01-0,1 secondi.

Oltre ai movimenti menzionati in precedenza, il dispositivo è in grado di quantificare anche l'intensità dei salti verticali e la posizione spaziale di tali salti; è in grado di misurare il consumo totale di energia causato dai movimenti; può essere adattato alla PPI e può essere incorporato nel pavimento di una camera

operante per fornire descrizioni del comportamento mentre l'animale preme la leva o meno.

Risultati

La distribuzione dei gruppi sperimentali prima dei trattamenti è mostrata nella figura 12.

Figura 12

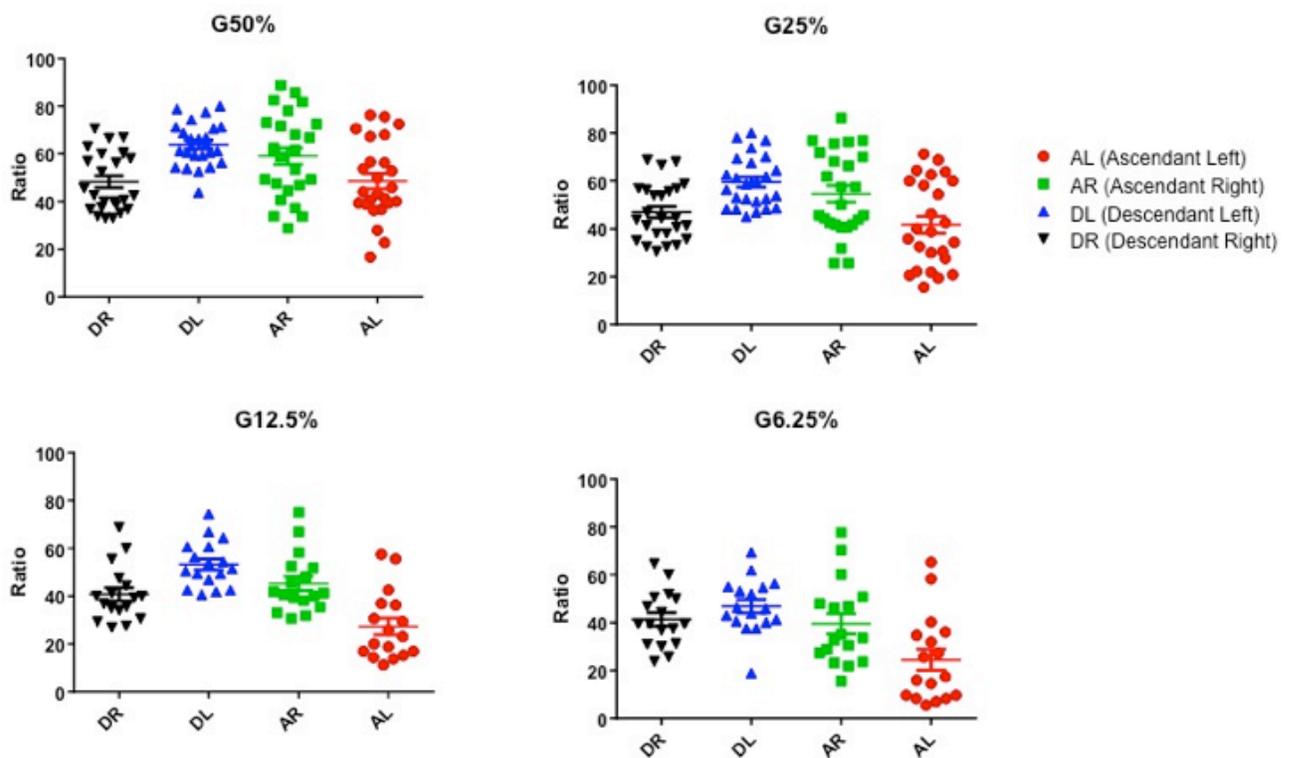


Fig. 12. Distribuzione dei gruppi sperimentali in base sia alle modalità di vincita (pressione sulla leva di destra o sinistra) che alle probabilità di vincita (ascendente/discendente). A)

Probabilità di vincita pari al 50% (condizione nettamente vantaggiosa); B) Probabilità di vincita pari al 25%; C) Probabilità di vincita pari al 12,5%; D) Probabilità di vincita pari al 6,25% (condizione nettamente svantaggiosa).

Il trattamento quotidiano con pramipexolo (PPX) alle dosi di 0.1 e 0.3 mg/kg, non ha influenzato il comportamento di scelta negli animali di controllo, non resepinizzati (fig. 13)

Figura 13

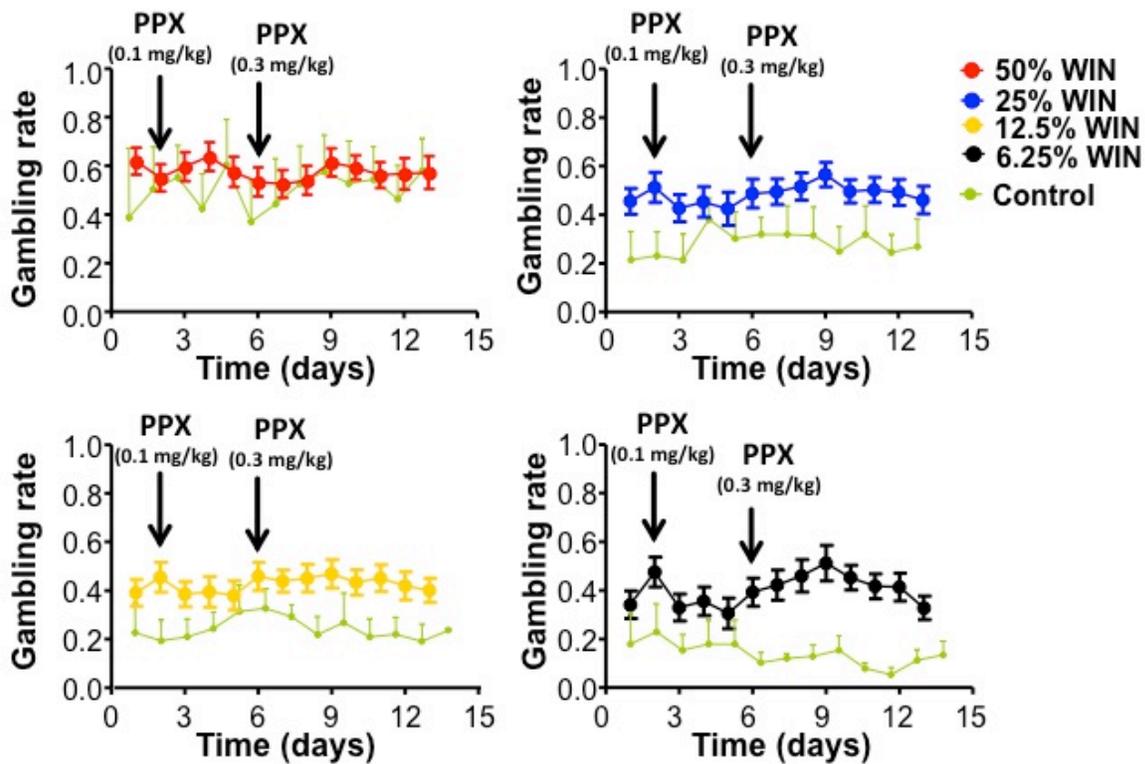


Fig. 13. Il pramipexolo (PPX, 0.1- 0.3 mg/ kg/ ml) in ratti non reserpiniizzati non ha indotto preferenze significative verso scelte di vincite svantaggiose. Il grafico mostra l'andamento nel tempo del gambling rate (punteggio medio +/- SEM).

Invece, in ratti resi parkinsoniani tramite trattamento con reserpina, il PPX ha indotto una chiara propensione alla scelta più rischiosa (Fig. 13), evidente soprattutto alle basse probabilità di vincita. Questo comportamento è stato efficacemente contrastato dalla somministrazione giornaliera di FIN (25 mg/kg), e l'effetto della FIN si è mantenuto per almeno 4 giorni dopo l'interruzione del trattamento (Fig. 14).

Figura 14

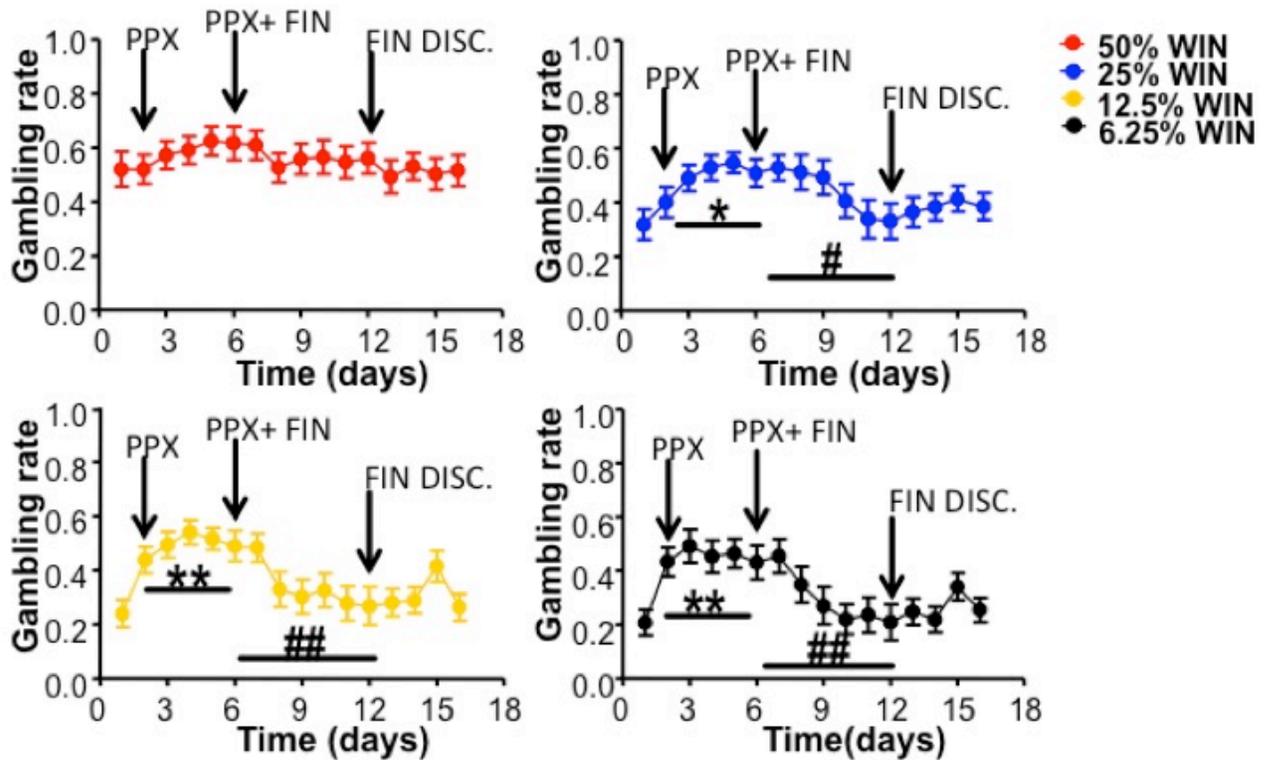


Fig. 14. L'inibitore della 5AR finasteride (FIN) ha bloccato, in ratti reserpinizati, la propensione verso la scelta rischiosa. Gli effetti dei trattamenti con PPX e PPX+FIN sono più marcati quando le probabilità di vincita sono basse. La sola reserpina (1 mg/kg, s.c.) non influenza invece il gambling rate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ rispetto al trattamento con la reserpina. # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ rispetto al trattamento con il pramipexolo. PPX, pramipexolo (0,3 mg/kg, s.c.); FIN, finasteride (25 mg/kg, i.p.); DISC, discontinuo.

Abbiamo quindi valutato, tramite analisi all'Actometro, gli effetti dei trattamenti sulla motilità dei ratti. E' stata valutata la distanza percorsa dai ratti in 15 minuti di tempo. Il pramipexolo ha indotto un significativo aumento della distanza

media percorsa, in modo dose-dipendente, sia negli animali di controllo che in quelli trattati con reserpina (Fig. 15).

Figura 15

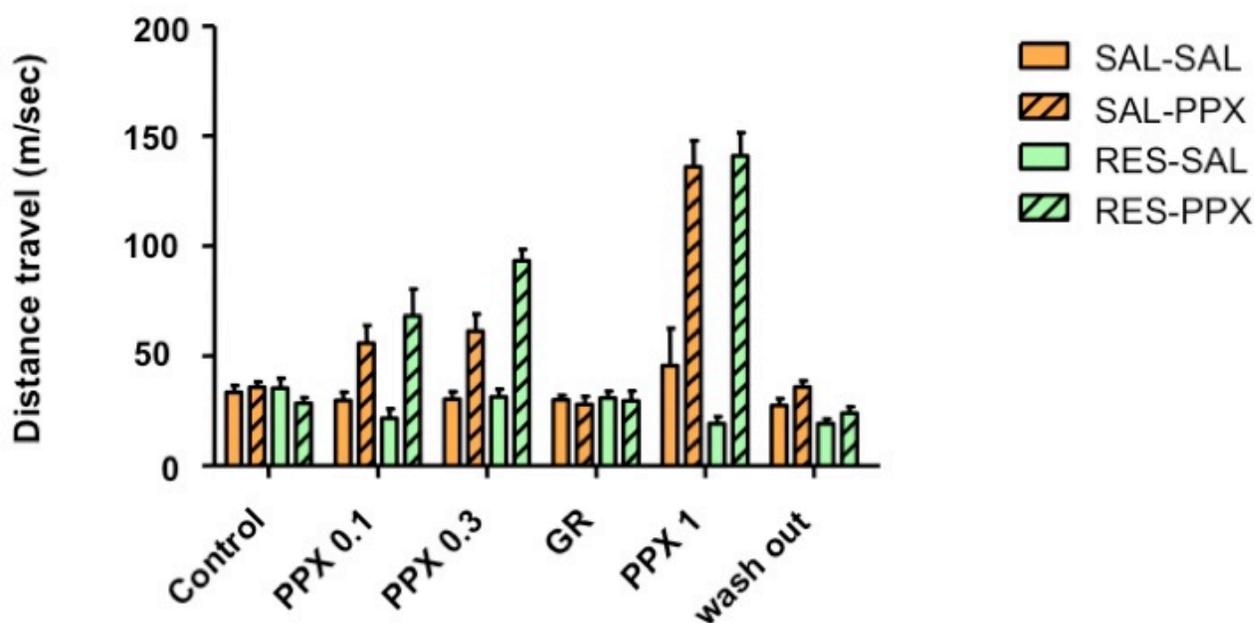


Fig. 15. Media della distanza percorsa (+/- SEM) dai ratti in seguito al trattamento con salina (+/- pramipexolo) o reserpina (+/- pramipexolo). I dati sono stati registrati grazie ad una camera dotata di una particolare griglia in grado di captare movimenti muscolari involontari, rilevati da una "force-plate", situata 1cm al di sotto della griglia.

Abbiamo quindi esaminato se anche questo parametro fosse influenzato dalla regolazione dei recettori dopaminergici operata dai neurosteroidi. La figura 16

mostra che l'aumento di motilità indotto dal pramipexolo alla dose di 0.3 mg/kg, è stato efficacemente contrastato dalla somministrazione di FIN (25 mg/kg, IP).

Figura 16

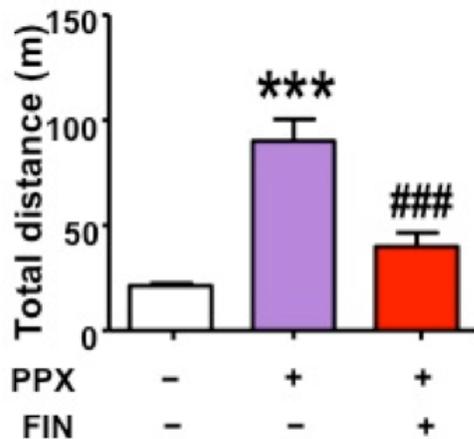


Fig. 16. Analisi della motilità tramite Actometro in ratti trattati con PPX e FIN.

*** $P < 0,001$ e ### $P < 0,01$ rispetto al trattamento con finasteride.

Per valutare se il trattamento con reserpina avesse indotto una ipersensibilità o una up-regulation dei recettori dopaminergici post-sinaptici, abbiamo effettuato uno studio di binding tramite il ligando D3 selettivo 7-OH-DPAT e il D2 selettivo Spiroperidol. L'analisi ha evidenziato un aumento del numero dei recettori D3 (Fig. 17)

Figura 17

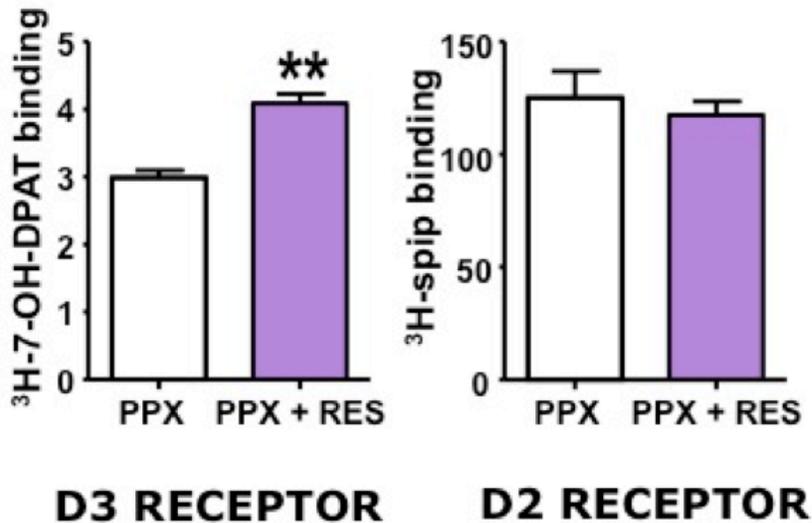


Fig. 17. Studio dei legami recettoriali dopaminergici D2 e D3 in seguito ai trattamenti farmacologici con il pramipexolo (0,3 mg/kg, s.c.) e pramipexolo+ reserpina (1 mg/kg, s.c.)

Il coinvolgimento della sottoclasse recettoriale D3 nella manifestazione del comportamento impulsivo tramite scelte rischiose è stato confermato tramite la somministrazione del selettivo antagonista dopaminergico D3 GR 103691. Questo farmaco, iniettato S.C. alla dose di 0.5 mg/kg, ha efficacemente contrastato gli effetti del pramipexolo (0.3 mg/kg), suggerendo che la sottoclasse recettoriale D3 sia almeno parzialmente responsabile di questo comportamento (Fig. 18).

Figura 18

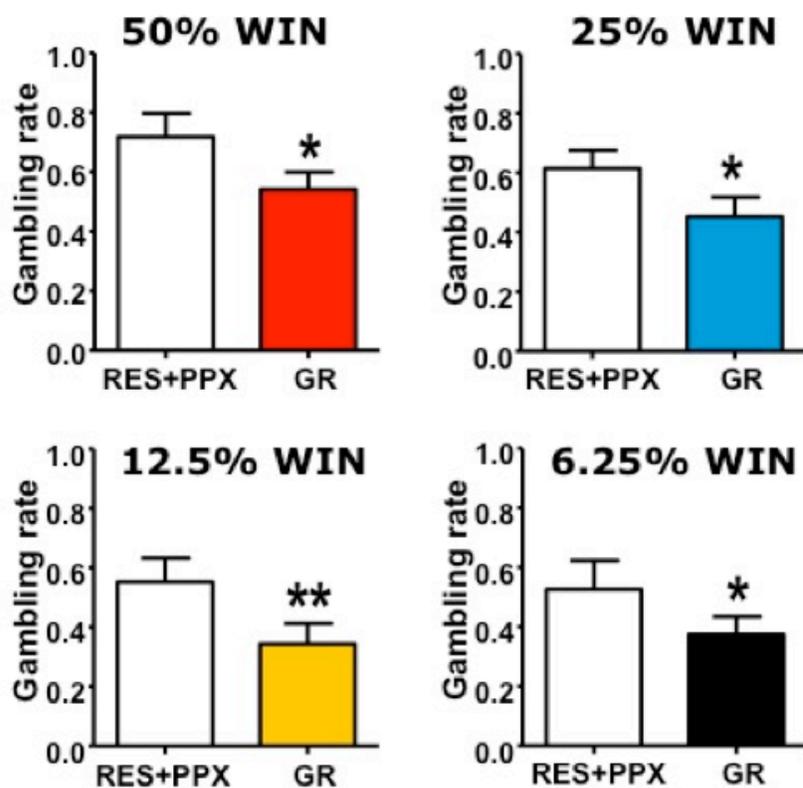


Fig. 18. L'antagonista del recettore dopaminergico D3 GR 103691 (GR, 0.5 mg/kg SC), in ratti reserpinizati, blocca l'impulsività nell'attitudine per le scelte rischiose indotta dal pramipexolo. Gli effetti dei trattamenti con GR e PPX+GR sono più marcati quando le probabilità di vincita sono basse. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ rispetto al trattamento con il GR 103691. PPX, pramipexolo (0,3 mg/kg, s.c.); GR, GR 103691 (0,5 mg/kg, s.c.).

CONCLUSIONI

Complessivamente, questi dati dimostrano che sia nell'uomo che nell'animale da esperimento la diminuzione dell'attività dopaminergica conseguente al morbo di Parkinson porta a una ipersensibilità dei recettori dopaminergici post-sinaptici, verosimilmente appartenenti alla sottoclasse D3, che rende questi soggetti particolarmente sensibili all'azione degli agonisti dopaminergici. Una delle peculiari manifestazioni di tale ipersensibilità è costituita dai comportamenti impulsivi, come la propensione alle scelte più rischiose e, nell'uomo, al gioco d'azzardo patologico (GAP). Questa condizione patologica può essere corretta tramite l'attività modulatoria esercitata dai neurosteroidi sull'attività del sistema dopaminergico, come si evince dall'attività terapeutica della finasteride nei pazienti parkinsoniani affetti da GAP e nei ratti reserpinizzati trattati con pramipexolo. Sebbene già sulla base dei risultati preliminari sia possibile ipotizzare e programmare studi clinici più ampi di quello finora condotto, sono necessari ulteriori studi preclinici per identificare i neurosteroidi più coinvolti in questo effetto terapeutico.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Ingegneria Biomedica dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

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

Bibliografia

1. Abbruzzese G, Berardelli A (2003) Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord* 18(3):231-40.
2. Agius M, Hockings H, Wilson C, Lane D (2009) Is oestrogen neuroprotective? *Psychiatr Danub* 21 Suppl 1:120-7.
3. Akhondzadeh S, Rezaei F, Larijani B, Nejastisafa AA, Kashani L, Abbasi SH (2006) Correlation between testosterone gonadotropins and prolactin and severity of negative symptoms in male patients with chronic schizophrenia. *Schizop Res* 84(2-3):405-10.
4. Angermeyer MC, Kühn L (1988) Gender differences in age at onset of schizophrenia. An overview. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 237(6):351-64.
5. Attard G, Reid AH, Olmos D, de Bono JS. Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. *Cancer Res*. 2009;69:4937–40.
6. Bechara A, Damasio H, Tranel D, Damasio AR (1997) Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. *Science* 275(5304):1293-5.
7. Bernauer S, Wehling M, Gerdes D, Falkenstein E. The human membrane progesterone receptor gene: genomic structure and promoter analysis. *DNA Seq*. 2001;12:13–25.
8. Blum BP, Mann JJ (2002) The GABAergic system in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 5(2):159-79.
9. Bortolato M, Cannas A, Solla P, Bini V, Puligheddu M, Marrosu F (2012) Finasteride attenuates pathological gambling in patients with Parkinson disease. *J Clin Psychopharmacol* 32(3):424-5.

10. Bortolato M, Frau R, Aru GN, Orru M, Gessa GL. Baclofen reverses the reduction in prepulse inhibition of the acoustic startle response induced by dizocilpine, but not by apomorphine. *Psychopharmacology*. 2004;171:322–330.
11. Bortolato M, Frau R, Orru M, Bourov Y, Marrosu F, Mereu G, Devoto P, Gessa GL. Antipsychotic-like properties of 5-alpha-reductase inhibitors. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:3146–3156.
12. Bortolato M, Muroi A, Marrosu F (2007) Treatment of Tourette's syndrome with finasteride. *Am J Psychiatry* 164(12):1914-5.
13. Bortolato M, Muroi A, Marrosu F. Treatment of Tourette's syndrome with finasteride. *Am J Psychiatry*. 2007;164:1914–1915.
14. Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR (2001) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49(1-2):171-8.
15. Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*. 2001;156:234–258.
16. Braff DL, Geyer MA. Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;47:181–188.
17. Braff DL, Grillon C, Geyer MA (1992) Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 49(3):206-15.
18. Chen L, Jiang X, Huang L, Lan K, Wang H, Hu L, Ren J, Li X, Zou Q (2009) Bioequivalence of a single 10-mg dose of finasteride 5-mg oral disintegrating tablets and standard tablets in healthy adult male Han Chinese volunteers: a randomized sequence, open-label, two-way crossover study. *Clin Ther* 31(10):2242-8.
19. Costa E, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Guidotti A, Tremolizzo L, Veldic M (2004) A GABAergic cortical deficit dominates schizophrenia pathophysiology. *Crit Rev Neurobiol* 16(1-2):1-23.
20. Darbra S, Mòdol L, Pallarès M. Allopregnanolone infused into the dorsal (CA1) hippocampus increases prepulse inhibition of startle response in Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:581–585.

21. Darbra S, Mòdol L, Vallée M, Pallarès M. Neonatal neurosteroid levels are determinant in shaping adult prepulse inhibition response to hippocampal allopregnanolone in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38:1397–1406.
22. Darbra S, Pallarès M. Alterations in neonatal neurosteroids affect exploration during adolescence and prepulse inhibition in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35:525–535.
23. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB, Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Fléchon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med*. 2011;364:1995–2005.
24. de Souza Silva MA, Mattern C, Topic B, Buddenberg TE, Huston JP. Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009;19:53–63.
25. Devoto P, Frau R, Bini V, Pillolla G, Saba P, Flore G, Corona M, Marrosu F, Bortolato M. Inhibition of 5alpha-reductase in the nucleus accumbens counters sensorimotor gating deficits induced by dopaminergic activation. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:1630–164
26. Dupont E, Simard J, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G. Localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain as studied by in situ hybridization. *Mol Cell Neurosci*. 1994;5:119–123.
27. Ellenbogen S, Derevensky J, Gupta R (2007) Gender differences among adolescents with gambling-related problems. *J Gambling Stud* 23(2):133-43.
28. Espallergues J, Tamsamani J, Laruelle C, Urani A, Maurice T. The antidepressant-like effect of the 3β-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane involves a regulation of β-type estrogen receptors. *Psychopharmacology*. 2011;214:455–63.
29. Fernández-Pérez L, Flores-Morales A, Chirino-Godoy R, Díaz-Chico JC, Díaz-Chico BN. Steroid binding sites in liver membranes: interplay between glucocorticoids, sex steroids, and pituitary hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2008;109:336–43.
30. Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O, Quinn JP (1996) Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cell Mol Neurobiol* 16(3):325-44.

31. Frau R1, Bini V, Pes R, (2014). Inhibition of 17 α -hydroxylase/C17,20 lyase reduces gating deficits consequent to dopaminergic activation. *Psychoneuroendocrinology*;39:204-13. (“Il presente articolo ecc. è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Ingegneria Biomedica dell’Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.)
32. Gerdes D, Wehling M, Leube B, Falkenstein E. Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol Chem.* 1998;379:907–911.
33. Goyal RO, Sagar R, Ammini AC, Khurana ML, Alias AG (2004) Negative correlation between negative symptoms of schizophrenia and testosterone levels. *Ann N Y Acad Sci* 1032:291-4.
34. Häfner H (1997) Late-onset schizophrenia and the delusional disorders in old age. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 247(4):173-5.
35. Hara T, Kouno J, Kaku T, Takeuchi T, Kusaka M, Tasaka A, Yamaoka M. Effect of a novel 17,20-lyase inhibitor, orteronel (TAK-700), on androgen synthesis in male rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013;134:80–91.
36. Harris A, Luirgio AJ (2007) Mental illness and violence: a brief review of research and assessment strategies. *Aggression and violent behavior* 12(5):542-551.
37. Harris DS, Wolkowitz OM, Reus VI (2001) Movement disorder, memory, psychiatric symptoms and serum DHEA levels in schizophrenic and schizoaffective patients. *World J Biol Psychiatry* 2(2):99-102.
38. Hart S, Zreik M, Carper R, Swerdlow NR. Localizing haloperidol effects on sensorimotor gating in a predictive model of antipsychotic potency. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998;61:113–119.
39. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol.* 2002;16:2181–2187.
40. Hermans EJ, Ramsey NF, van Honk J (2008) Exogenous testosterone enhances responsiveness to social threat in the neural circuitry of social aggression in humans. *Biol Psychiatry* 63(3):263-70.

41. Hoffman HS, Ison JR (1980) Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 87(2):175-89.
42. Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004;101:865–870.
43. Kendell R, Jablensky A (2003) Distinguishing between the validity and utility of psychiatric diagnoses. *Am J Psychiatry* 160(1):4-12.
44. Kendell RE, Chalmers JC, Platz C (1987) Epidemiology of puerperal psychoses. *Br J Psychiatry* 150:662-73.
45. Khanna M, Qin KN, Cheng KC. Distribution of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and molecular cloning of multiple cDNAs encoding structurally related proteins in humans. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995a;53:41–46.
46. Khanna M, Qin KN, Wang RW, Cheng KC. Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 1995b;270:20162–20168.
47. Koethe D, Bortolato M, Piomelli D, Leweke FM (2008) Improvement of general symptoms in a chronic psychotic patient treated with finasteride: case report. *Pharmacopsychiatry* 44(4):163.
48. Koethe D, Bortolato M, Piomelli D, Leweke FM (2008) Improvement of general symptoms in a chronic psychotic patient treated with finasteride: case report. *Pharmacopsychiatry* 41(3):115-6.
49. Koethe D, Bortolato M, Piomelli D, Leweke FM. Improvement of general symptoms in a chronic psychotic patient treated with finasteride: case report. *Pharmacopsychiatry.* 2008;41:115–116.
50. Kohchi C, Ukena K, Tsutsui K. Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes p450scc, P450c17 and 3beta-HSD in the postnatal rat brain. *Brain Res.* 1998;801:233–238.
51. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138:863–870.

52. Kulkarni J (2009) Oestrogen--a new treatment approach for schizophrenia? *Med J Aust* 190(4 Suppl):S37-8.
53. Kumari V, Aasen I, Sharma T. Sex differences in prepulse inhibition deficits in chronic schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2004;69:219–235.
54. Kumari V, Soni W, Sharma T (2002) Prepulse inhibition of the startle response in risperidone-treated patients: comparison with typical antipsychotics. *Schizophr Res* 55(1-2):139-46.
55. Lesieur HR, Blume SB (1987) The South Oaks Gambling Screen (SOGS): a new instrument for the identification of pathological gamblers. *Am J Psychiatry* 144(9):1184-8.
56. Leungh A, Chue P (2000) Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 401:3-38.
57. MacKenzie EM, Odontiadis J, Le Mellédo JM, Prior TI, Baker GB (2007) The relevance of neuroactive steroids in schizophrenia, depression, and anxiety disorders. *Cell Mol Neurobiol* 27(5):541-74.
58. Martini L, Celotti F, Melcangi RC Testosterone and progesterone metabolism in the central nervous system: cellular localization and mechanism of control of the enzymes involved. *Cell Mol Neurobiol* 16(3):271-282.
59. Martini L, Melcangi RC, Maggi R (1993) Androgen and progesterone metabolism in the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47(1-6):195-205.
60. Marx CE, Keefe RS, Buchanan RW, Hamer RM, Kilts JD, Bradford DW, Strauss JL, Naylor JC, Payne VM, Lieberman JA, Savitz AJ, Leimone LA, Dunn L, Porcu P, Morrow AL, Shampine LJ (2009) Proof-of-concept trial with the neurosteroid pregnenolone targeting cognitive and negative symptoms in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34(8):1885-903.
61. Marx CE, Trost WT, Shampine LJ, Stevens RD, Hulette CM, Steffens DC, Ervin JF, Butterfield MI, Blazer DG, Massing MW, Lieberman JA (2006) The neurosteroid allopregnanolone is reduced in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 60(12):1287-94.
62. Melcangi RC, Poletti A, Cavarretta I, Celotti F, Colciago A, Magnaghi V, Motta M, Negri-Cesi P, Martini L (1998) The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6):295-9.

63. Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA (2001) Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):3-12.
64. Micevych P, Sinchak K (2008) Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Mol Cell Endocrinol* 290(1-2):44-50.
65. Miller WL. P450 oxidoreductase deficiency: a disorder of steroidogenesis with multiple clinical manifestations. *Sci. Signal.* 2012;5:11.
66. Morrow AL (2007) Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacol Ther* 116(1):1-6.
67. Mostaghel EA, Page ST, Lin DW, Fazli L, Coleman IM, True LD, Knudsen B, Hess DL, Nelson CC, Matsumoto AM, Bremner WJ, Gleave ME, Nelson PS (2007) Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 67(10):5033-41.
68. Muroi A, Paba S, Puligheddu M, Marrosu F, Bortolato M (2011) A preliminary study of finasteride in Tourette syndrome. *Mov Disord* 26(11):2146-7.
69. Nock MK, Kazdin AE, Hiripi E, Kessler RC (2006) Prevalence, subtypes, and correlates of DSM-IV conduct disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Psychol Med* 36(5):699-710.
70. Otberg N, Finner AM, Shapiro J (2007) Androgenetic alopecia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36(2):379-98.
71. Paba S, Frau R, Godar SC, Devoto P, Marrosu F, Bortolato M. Steroid 5alpha-reductase as a novel therapeutic target for schizophrenia and other neuropsychiatric disorders. *Curr Pharm Des.* 2011;17:151-167.
72. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; New York: 1998.
73. Peterson BS, Zhang H, Anderson GM, Leckman JF. A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of an antiandrogen in the treatment of Tourette's syndrome. *J Clin Psychopharmacol.* 1998;18:324-331.

74. Petry NM (2005) Gamblers anonymous and cognitive-behavioral therapies for pathological gamblers. *J Gambl Stud* 21(1):27-33
75. Pibiri F, Nelson M, Carboni G, Pinna G (2006) Neurosteroids regulate mouse aggression induced by anabolic androgenic steroids. *Neuroreport* 17(14):1537-41.
76. Plassart-Schiess E, Baulieu EE. (2001) Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):133-40.
77. Porubek D. CYP17A1: A Biochemistry, Chemistry, and Clinical Review. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013;13:1364–1384.
78. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Jan;39:204-13. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.09.014. Epub 2013 Sep 21.
79. Purves-Tyson TD, Handelsman DJ, Double KL, Owens SJ, Bustamante S, Weickert CS. Testosterone regulation of sex steroid-related mRNAs and dopamine-related mRNAs in adolescent male rat substantia nigra. *BMC Neurosci*. 2012 doi: 10.1186/1471-2202-13-95.
80. Reddy DS (2002) The clinical potentials of endogenous neurosteroids. *Drugs Today (Barc)* 38(7):465-85.
81. Reddy DS, Jian K. The testosterone-derived neurosteroid androstanediol is a positive allosteric modulator of GABAA receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011;334:1031–41.
82. Ritsner M, Gibel A, Ram E, Maayan R, Weizman A (2006) Alterations in DHEA metabolism in schizophrenia: two-month case-control study. *Eur Neuropsychopharmacol* 16(2):137-46.
83. Ritsner MS (2010) Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and schizophrenia: alterations and clinical trials. *CNS Neurosci Ther* 16(1):32-44.
84. Rogers NE, Avram MR (2008) Medical treatments for male and female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 59(4):547-66
85. Seeman MV (1983) Schizophrenia and family studies. *Psychiatr J Univ* 8(2):38-43.
86. Seeman P, Kapur S (2000) Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14):7673-5.

87. Serra M, Sanna E, Mostallino MC, Biggio G (2007) Social isolation stress and neuroactive steroids. *Eur Neuropsychopharmacol* 17(1):1-11
88. Shulman Y, Tibbo PG (2005) Neuroactive steroids in schizophrenia. *Can J Psychiatry* 50(11):695-702.
89. Silver H, Knoll G, Isakov V, Goodman C, Finkelstein Y (2005) Blood DHEAS concentrations correlate with cognitive function in chronic schizophrenia patients: a pilot study. *J Psychiatr Res* 39(6):569-75.
90. Skilbeck KJ, Johnston GA, Hinton T (2010) Stress and GABA receptors. *J Neurochem* 112(5):1115-30
91. Stevens JR (2002) Schizophrenia: reproductive hormones and the brain. *Am J Psychiatry* 159(5):713-9.
92. Strömstedt M, Waterman MR. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res. Mol.* 1995;34:75–88.
93. Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11(3-4):185-204.
94. Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology.* 2001;156:194–215.
95. Taherianfard M, Rajaian H, Bahaoddini A, Dabbaghotfi A (2005) CNS alpha 1 receptor in tonic pain during estrous cycle in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 49(1):77-82.
96. Thiblin I, Finn A, Ross SB, Stenfors C. Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *Brit J Pharmacol.* 1999;126:1301–1306.
97. Torres JM, Ortega E (2003) Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J* 17(11):1428-33.
98. Torres JM, Ruiz E, Ortega E (2003) Development of a quantitative RT-PCR method to study 5alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate* 56(1):74-9.

99. Trenton AJ, Currier GW (2005) Behavioural manifestations of anabolic steroid use. *CNS Drugs* 19(7):571-95.
100. Van den Buuse M, Eikelis N. Estrogen increases prepulse inhibition of acoustic startle in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;425:33–41.
101. Van den Buuse M, Garner B, Koch M (2003) Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Curr Mol Med* 3(5):459-71.
102. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 1998;104:2–8.
103. Wang S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB, Evans MJ. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology.* 2006;147:4025–4033.
104. Wassef A, Baker J, Kochan LD GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* 23(6):601-40.
105. Yamada H, Kominami S, Takemori S, Kitawaki J, Kataoka Y. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 enzymes in the rat brain, considering the steroid-synthesis in the neurons. *Acta Histochem Cytochem.* 1997;30:609–616.
106. Yu L, Romero DG, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP. Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;190:9–17.