



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Neuroscienze**

Ciclo XXIV

**TITOLO TESI**

**Il trattamento cronico con etinilestradiolo e levonorgestrel  
modifica i livelli cerebrali dei neurosteroidi e il  
comportamento nel ratto**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

**BIO/14 – FARMACOLOGIA**

<b>Presentata da:</b>	<b>Dott.ssa Francesca Santoru</b>
<b>Coordinatore Dottorato</b>	<b>Prof. ssa Alessandra Concas</b>
<b>Relatore</b>	<b>Prof.ssa Alessandra Concas</b>

**Esame finale anno accademico 2010 – 2011**

## INDICE

### INTRODUZIONE

- *Contraccettivi orali* Pag. 2
- *Il ciclo ovarico* Pag. 6
- *Il ciclo estrale* Pag. 9
- *Ormoni steroidei* Pag. 12
- *Meccanismo d'azione dei contraccettivi orali* Pag. 15
- *Contraccettivi e sistema nervoso centrale* Pag. 16
- *Steroidi neuroattivi* Pag. 18
- *Obiettivo* Pag. 23

### MATERIALI E METODI

- *Animali* Pag. 25
- *Trattamento farmacologico* Pag. 26
- *Estrazione e misurazione degli steroidi cerebrali e plasmatici mediante dosaggio radioimmunologico (RIA)* Pag. 27
- *Studi comportamentali* Pag. 28
- *Analisi statistica* Pag. 41

### RISULTATI

- *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sulle concentrazioni cerebrocorticali degli steroidi neuroattivi* Pag. 42
- *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test dell'elevated plus maze* Pag. 43
- *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test di Porsolt* Pag. 44
- *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test di preferenza al saccarosio* Pag. 45
- *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del Morris water maze* Pag. 46
- *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del resident-intruder* Pag. 48
- *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento sessuale dei ratti* Pag. 52
- *Effetto della somministrazione di progesterone e finasteride sulle concentrazioni degli steroidi neuroattivi nella corteccia cerebrale dei ratti trattati con EE-LNG* Pag. 56

### DISCUSSIONE

Pag. 58

### BIBLIOGRAFIA

Pag. 75

## **INTRODUZIONE**

I contraccettivi orali sono farmaci che offrono una regolazione della fertilità efficace e reversibile, e vengono ad oggi utilizzati da circa 100 milioni di donne dall'approvazione della prima pillola contraccettiva, avvenuta negli anni '60. Numerose evidenze documentano i benefici non contraccettivi di questi farmaci, quali un effetto protettivo contro il carcinoma ovarico ed endometriale, e, in misura minore, contro il cancro al colon. La pillola riduce anche l'incidenza di patologie benigne alla mammella, di cisti ovariche funzionali, della patologia infiammatoria pelvica, della gravidanza ectopica e dell'anemia sideropenica. I contraccettivi orali vengono prescritti non solo per uno scopo contraccettivo, ma anche per il trattamento di diversi disturbi ginecologici, come la dismenorrea, mestruazioni irregolari o menorragia, acne, irsutismo, endometriosi e la sindrome premestruale (Dhont, 2010).

Circa la metà delle donne che utilizzano i contraccettivi orali interrompe il loro utilizzo entro un anno dalla prescrizione, la maggior parte delle volte a causa degli effetti collaterali o dei dubbi circa gli effetti negativi sulla salute determinati da questi farmaci, quali un aumento dell'insorgenza del carcinoma della mammella, ma soprattutto del rischio di tromboembolia venosa e di malattie cardiovascolari, specialmente in donne di età superiore ai 35 anni e fumatrici (Herzberg et al., 1971). Inoltre, occasionalmente possono manifestarsi tensione mammaria, disturbi gastrici e

visivi, nausea, cefalea, emicrania, alterazioni del peso e della libido, modificazioni in senso depressivo dell'umore, nervosismo, perdite ematiche intermestruali. Altri effetti collaterali, da associare però all'impiego prolungato, sono amenorrea, ittero, ritenzione idrica, eruzioni cutanee, prurito, soppressione o riduzione della lattazione (Williams e Stancel, 1997). Tali effetti collaterali devono essere considerati con particolare riguardo, dato che i contraccettivi orali vengono largamente impiegati da parte di una popolazione femminile relativamente giovane e sana.

I contraccettivi orali solitamente si trovano in commercio sottoforma di preparazioni estro-progestiniche, e si dividono in monofasiche, difasiche e trifasiche. Esistono, inoltre, delle pillole a base di solo progestinico (mini-pillola). L'estrogeno utilizzato in tutte le preparazioni è l'etinilestradiolo (EE), in combinazione con vari progestinici tutti sintetici. Entrambi gli steroidi sessuali danno degli effetti collaterali dose dipendenti, pertanto dall'introduzione del primo contraccettivo ormonale combinato si è cercato di svilupparne degli altri con l'obiettivo di minimizzare gli effetti collaterali senza comprometterne l'efficacia.

I progestinici possono essere classificati in base alla loro struttura oppure in base al tempo della loro introduzione nel mercato. Tutti i progestinici contraccettivi hanno uno scheletro simile con 4 anelli e possono essere classificati secondo tre strutture tetracicliche in pregnani (derivati dalla molecola del progesterone), estrani e gonani (derivati dal 19-nortestosterone). Gli estrani rappresentano i progestinici di

prima generazione che hanno una qualche seppur modesta attività androgenica, e sono noretisterone (NE), noretindrone (NE), etinodiolo diacetato, linestrenolo (LYN), noretinodrel e dienogest, che deriva dal NE ed è caratterizzato dalla mancanza di attività androgenica. I gonani sono biologicamente più potenti degli estrani e possono essere divisi in progestinici di seconda generazione, come levonorgestrel (LNG) e norgestrel (NG), e di terza generazione, caratterizzati da un'ulteriore riduzione dell'attività androgenica, come desogestrel (DSG), gestodene (GSD) e norgestimato (NGM). Il gestodene è un progestinico attivo, mentre desogestrel e norgestimato sono pro-farmaci. Attualmente il LNG è probabilmente il progestinico maggiormente utilizzato, in combinazione con l'EE. I pregnani si caratterizzano per gli scarsi effetti androgenici e per una bassissima interferenza con gli estrogeni a livello delle sintesi epatiche, alcuni loro metaboliti hanno effetti ipnotici e partecipano alle modificazioni dell'umore. Fra questi quelli utilizzati nei contraccettivi orali sono il ciproterone acetato (CPA), il clormadinone acetato e il nomegestrolo.

Ci sono anche alcuni progestinici che non rientrano in nessuna classificazione, quali il drospirenone (DRSP), un derivato del  $17\alpha$ -spironolattone che potrebbe possedere attività antimineralcorticoide e antiandrogenica.

Le preparazioni estroprogestiniche che attualmente sono in commercio con i suddetti progestinici sono elencate in tabella 1.

**Tabella 1. Preparazioni contraccettive estroprogestiniche attualmente in commercio elencate in base al dosaggio di etinilestradiolo**

<b>Etinilestradiolo (µg)</b>	<b>Progestinico (mg)</b>	<b>Nome del preparato</b>
15	Gestodene 0,06	Arianna
		Minesse
20	Desogestrel 0,15	Mercilon
		Securgin
20	Gestodene 0,075	Fedra
		Harmonet
		Estinette
20	Levonorgestrel 0,1	Loette
		Miranova
30	Ciproterone acetato 2	Diane
30	Desogestrel 0,15	Planum
		Practil 21
30	Gestodene 0,075	Ginoden
		Minulet
30	Levonorgestrel 0,15	Egogyn 30
		Ovranet
30	Drospirenone 3	Yasmin
40/30	Desogestrel 0,25/0,125	Dueva
		Gracial
30/40/30	Levonorgestrel 0,05/0,075/0,125	Tryginon
		Trinordiol
30/40/30	Gestodene 0,05/0,07/0,01	Milvane
		Triminulet
35/30/30	Desogestrel 0,05/0,1/0,15	Lucille
35	Noretisterone 0,5/0,75/1	Trinovum
50	Norgestrel 0,5	Eugynon
50	Levonorgestrel 0,125	Mycrogynon
50	Levonorgestrel 0,25	Evanor D
		Novogyn 21

### *Il ciclo ovarico*

Gli estrogeni e i progestinici rappresentano le due più importanti classi di ormoni sessuali femminili, dotati di numerose azioni fisiologiche e vengono prodotti principalmente dalle ovaie attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. Il generatore d'impulsi ipotalamico determina delle scariche neuronali che si traducono nel rilascio pulsatile e periodico dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH). Il GnRH interagendo col suo recettore provoca la liberazione, da parte dell'ipofisi, dell'ormone luteinizzante (LH) e di quello follicolo-stimolante (FSH), ovvero le gonadotropine responsabili della produzione di estrogeno e progesterone. Gli ormoni endogeni esercitano un feedback regolatorio; in particolare, gli estrogeni a livello dell'ipofisi regolano la secrezione delle gonadotropine, il progesterone sull'ipotalamo e sull'ipofisi controlla la produzione del GnRH, del LH e dell'FSH (Williams e Stancel, 1997) (Fig. 1).

Il meccanismo fisiologico sopra descritto si attua all'inizio della pubertà determinando il ciclo mestruale. Il ciclo dura circa 28 giorni e si divide in fase follicolare e fase luteinica. Nella prima fase si ha la maturazione del follicolo di Graaf la cui rottura intorno al 14° giorno (giorno dell'ovulazione) porta alla fuoriuscita dell'ovulo. Causa di ciò è un'iniziale moderata liberazione di estrogeno, i cui effetti sull'ipofisi sono inibitori, seguita a metà del ciclo da un aumento nella produzione di

estrogeno che esercita un feedback positivo sulla secrezione di gonadotropine il cui picco è responsabile dell'ovulazione.

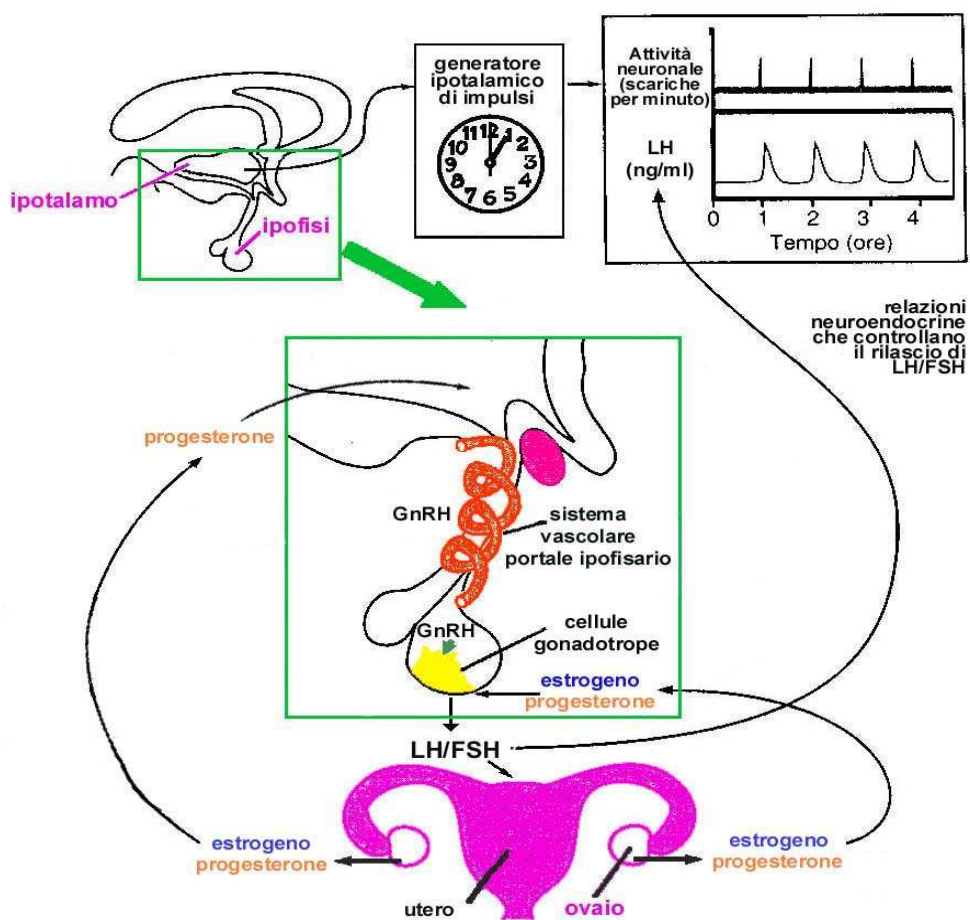


Figura 1. Controllo neuroendocrino della secrezione di gonadotropine nella donna.



Nella fase luteinica il follicolo si sviluppa nel corpo luteo il quale produce un'elevata quantità di progesterone, restando comunque alti i livelli di estrogeno. Entrambi gli ormoni esercitano un feedback negativo sulla sintesi di LH e di FSH. In caso di mancata gravidanza il corpo luteo cessa di funzionare, al 28° giorno i livelli degli steroidi si riducono e avviene la mestruazione (Fig. 2).

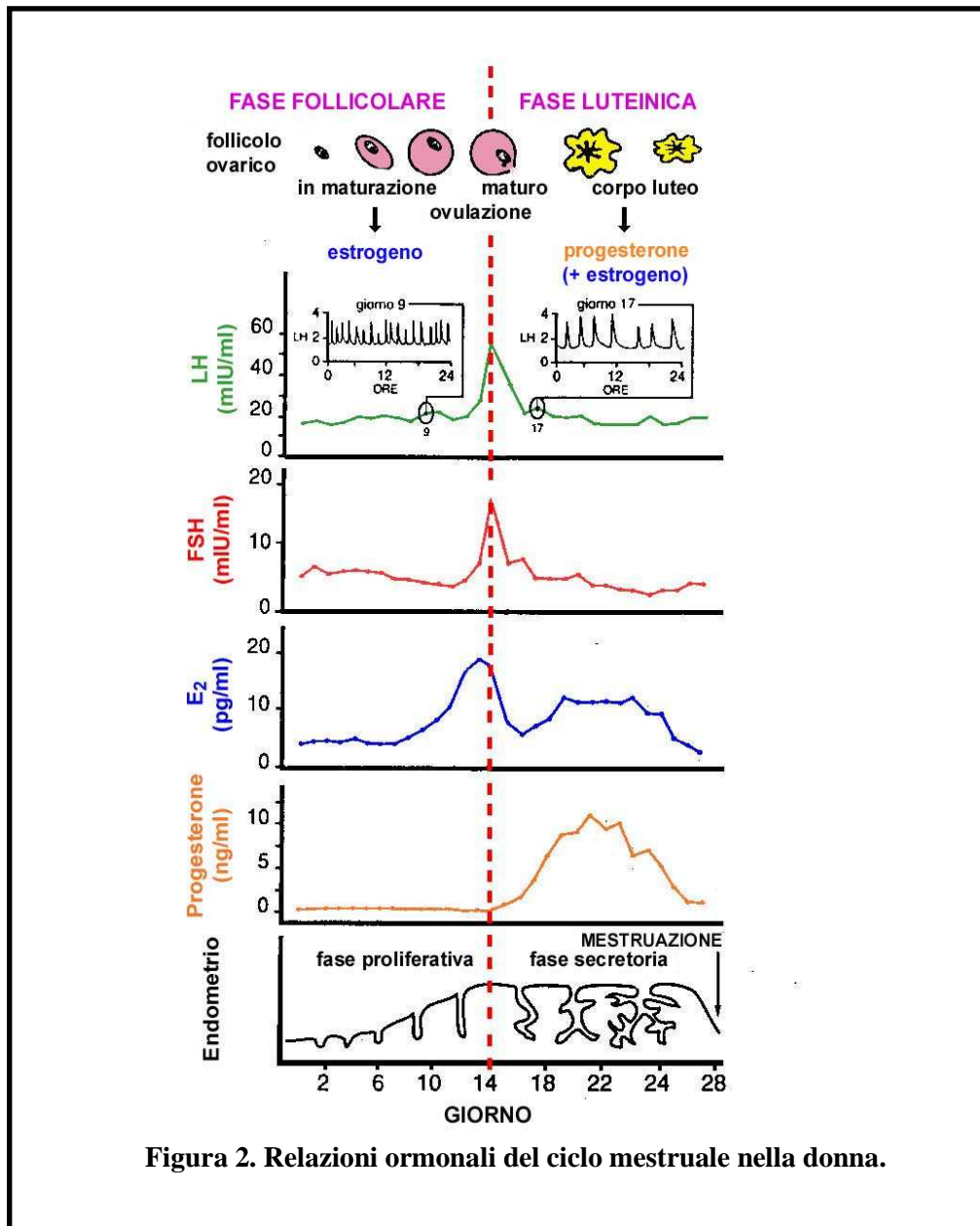


Figura 2. Relazioni ormonali del ciclo mestruale nella donna.

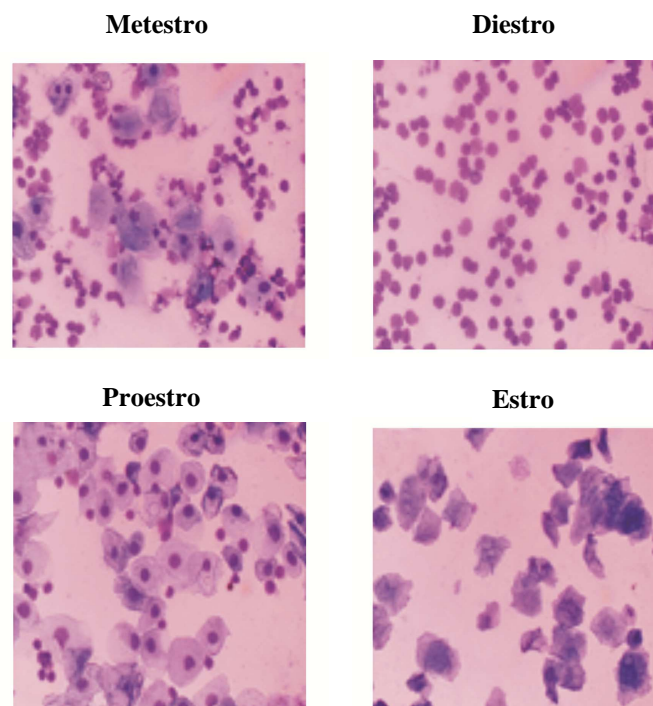
### *Il ciclo estrale*

Il ciclo estrale nel ratto ha inizio immediatamente dopo l'apertura vaginale, che avviene tra il giorno 32 e il giorno 36 dalla nascita; in un primo momento, si può manifestare un'irregolarità di tale ciclo (Goldman et al., 2007) il quale, una volta stabilizzatosi, ha una durata di 4-5 giorni. Tuttavia, si possono presentare irregolarità, causate dall'influenza di fattori ambientali, una continua illuminazione, per esempio, può indurre un'estro persistente (Schwartz, 1982).

Nel ciclo estrale sono evidenti 4 distinte fasi, denominate: proestro, estro, metestro o diestro 1 e diestro 2 (Fig. 3); tali fasi possono essere contraddistinte in base alla predominanza di differenti tipi cellulari, che riflettono lo stato della mucosa vaginale, dell'utero, delle ovaie e dipendono da alterazioni nella concentrazione degli ormoni sessuali e delle gonadotropine.

Il proestro è caratterizzato dalla presenza di cellule epiteliali nucleate, che mostrano un aspetto granulare al microscopio o occasionalmente possono disporsi in modo tale da formare caratteristiche file cellulari; a questa fase, della durata di 1 giorno, segue l'estro vaginale, identificabile per la presenza di abbondanti cellule cornificate o cheratinizzate, che possono presentarsi per 1 giorno, in un ciclo di 4 giorni, alternativamente, per 2 giorni consecutivi, in un ciclo di 5 giorni. Cellule epiteliali non cornificate possono essere presenti nella fase che precede l'infiltrazione

dei leucociti. Il metestro è una fase transitoria, che rappresenta il primo giorno di diestro (diestro 1), caratterizzata dalla combinazione di cellule epiteliali rotondeggianti, cellule cornificate e leucociti; le cellule epiteliali rotondeggianti talvolta persistono anche durante il secondo giorno di diestro (diestro 2); la concentrazione dei leucociti può anche essere l'unico tipo cellulare presente, in particolare durante il secondo giorno di diestro (diestro 2); tale fase può presentare, inoltre, poche cellule epiteliali nucleate, che saranno abbondanti il giorno successivo, durante il proestro.



**Figura 3** Citologia del ciclo estrale nel ratto.

La cheratinizzazione delle cellule epiteliali che caratterizza la fase dell'estro rappresenta una risposta all'aumento dei livelli di estradiolo, che comincia il secondo giorno del diestro e raggiunge il picco massimo durante il proestro (Pawluski et al., 2009; Fig. 4). Tale aumento è regolato a livello ipotalamico, e amplifica il rilascio pulsatile dell'ormone di rilascio delle gonadotropine nell'ipofisi anteriore che, a sua volta, regola i livelli di estradiolo, con conseguente rilascio di LH. Questi meccanismi portano alla maturazione dei follicoli a livello ovarico, cui seguirà la sua rottura, che nel ratto avviene dopo 10-12 ore dal picco di LH.

Per definizione, il termine "estro" fa riferimento al periodo durante il quale si manifestano i caratteristici comportamenti recettivi: le femmine, infatti, si mostrano sessualmente recettive nel momento in cui una bassa concentrazione di cellule cornificate comincia ad apparire (Rodgers, 1970; Hardy, 1972), situazione che si verifica nella seconda parte del proestro.

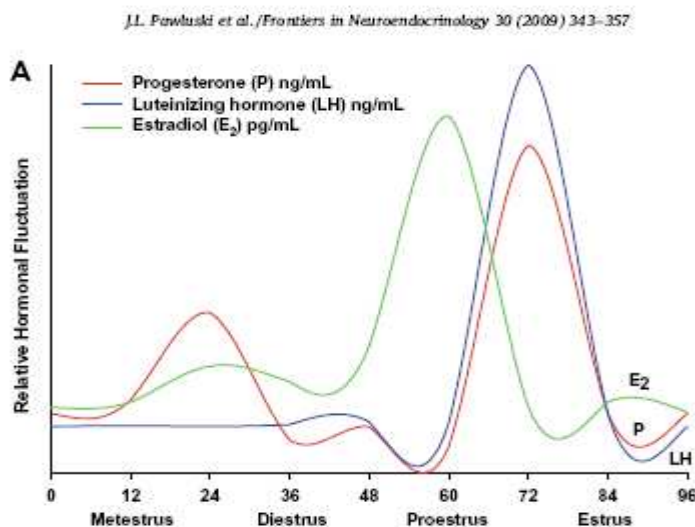
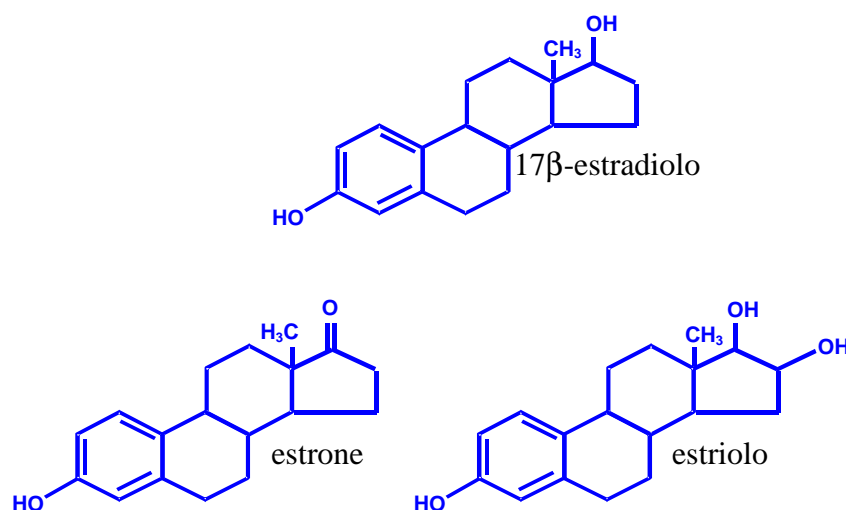


Figura 4. Relazioni ormonali del ciclo estrale nel ratto.

## Ormoni steroidei

### Estrogeni

Gli estrogeni sono gli ormoni sessuali femminili a struttura steroidea, derivati dal nucleo di base del colesterolo, sintetizzati principalmente dalle ovaie, e in misura minore dal surrene. Tra i vari tipi di estrogeni prodotti dall'organismo, i principali per quantità e attività biologica sono il  $17\beta$ -estradiolo, prodotto durante l'età feconda della donna; l'estrone, caratteristico della menopausa, e l'estriolo, sintetizzato in grandi quantità dalla placenta durante la gravidanza (Fig. 5). Il meccanismo d'azione degli estrogeni è quello tipico degli steroidi, con azione diretta sul DNA.



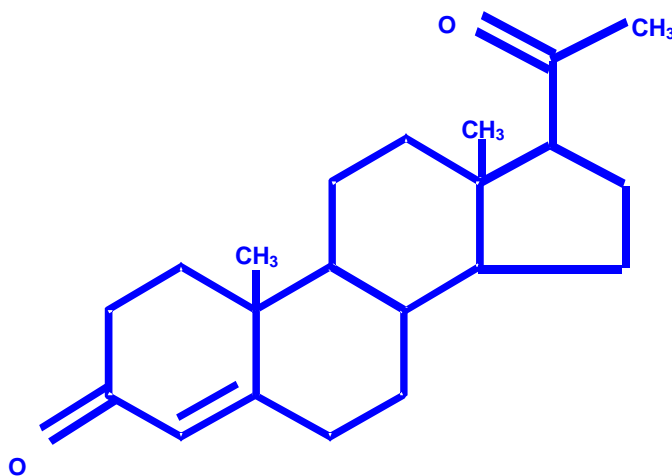
**Figura 5. Struttura molecolare degli estrogeni.**

Gli effetti degli estrogeni sono diversi e, oltre ad influenzare il ciclo ovarico, sono implicati in molti altri processi fisiologici. Nella pubertà stimolano lo sviluppo dei caratteri sessuali primari (vagina, utero e delle trombe di Falloppio) e secondari (sviluppo dei genitali esterni, crescita dei peli ascellari e pubici); inoltre stimolano la crescita delle ossa lunghe e la fusione delle epifisi con conseguente interruzione del loro allungamento; proteggono dalla demineralizzazione delle ossa favorendo il deposito di calcio. A livello del metabolismo lipidico promuovono un aumento delle HDL e una diminuzione delle LDL che si traduce in una riduzione del colesterolo plasmatico: è questo il motivo per cui nelle donne in età feconda l'incidenza delle malattie cardiovascolari è molto più bassa rispetto all'uomo, mentre sale bruscamente durante la menopausa. A livello del sistema nervoso centrale regolano l'eccitabilità neuronale, inducono modificazioni del tono dell'umore e delle emozioni, modulano le funzioni cognitive, hanno effetti neuroprotettivi, modulano le percezioni dolorifiche e regolano il coordinamento motorio.

### Progestinici

L'ormone progestinico naturale è il progesterone, ormone steroideo prodotto dal corpo luteo nella seconda metà del ciclo ovarico (Fig. 6). Piccole quantità di progesterone vengono prodotte anche dal surrene mentre la placenta ne secreta grandi quantità. In generale il progesterone è l'ormone della gravidanza, assente durante la

fase follicolare del ciclo, appare immediatamente prima dell'ovulazione e aumenta durante la fase luteinica. La sua funzione principale consiste nella preparazione dell'utero (favorisce l'irrorazione dell'endometrio) all'impianto dell'embrione e del suo mantenimento, mediante soppressione della mestruazione e della contrattilità uterina. Ha un'azione ipnotica sul sistema nervoso centrale con comparsa di sonnolenza. Ad elevate concentrazioni agisce sull'ipofisi provocando il blocco dell'ovulazione (impiego anticoncezionale).



**Figura 6** Struttura molecolare del Progesterone

### ***Meccanismo d'azione dei contraccettivi orali***

Il principale meccanismo d'azione dei contraccettivi orali è quello di prevenire l'ovulazione inibendo la secrezione di gonadotropine a livello dell'asse ipotalamico-ipofisario. Possono essere operativi anche altri meccanismi periferici. Sono sicuramente coinvolti i cambiamenti dell'attività delle ghiandole endocervicali che producono, sotto l'influenza dei progestinici, un muco cervicale scarso e viscoso, impenetrabile allo sperma. Inoltre viene anche alterata dai progestinici la recettività endometriale necessaria per l'impianto e probabilmente anche la motilità e la funzionalità tubarica. Questi effetti possono contribuire all'efficacia globale dei contraccettivi, particolarmente quando la soppressione ovarica non è completa, come può verificarsi con le formulazioni a basse dosi. È proprio la molteplicità delle loro azioni che rende questi farmaci così efficaci. Si pensa che la componente estrogenica inibisca principalmente la secrezione di FSH e quindi il reclutamento dei follicoli, la loro maturazione e selezione, mentre i progestinici inibiscono principalmente la secrezione di LH e quindi il meccanismo ovulatorio.

L'azione degli steroidi a livello ipotalamico gioca un ruolo importante; l'effetto chiave dei progestinici è quello di diminuire la frequenza dell'oscillatore ipotalamico che controlla i picchi secretivi di GnRH, meccanismo essenziale per la progressione del ciclo mestruale. Gli effetti degli estrogeni da soli sul generatore



d'impulsi sono meno vistosi, ma è noto che potenziano l'azione del progesterone, probabilmente mediante induzione della sintesi dei recettori ipotalamici del progesterone stesso. Diversi effetti dei contraccettivi vengono esercitati anche a livello dell'ipofisi anteriore. Globalmente, la risposta ipofisaria al GnRH sembra essere diminuita. Gli estrogeni in particolare sembrano efficaci nell'inibire il rilascio di FSH da parte dell'ipofisi.

### ***Contraccettivi e sistema nervoso centrale***

Dato il largo impiego nella popolazione femminile mondiale dei contraccettivi orali, sono numerosi gli studi sperimentali che hanno lo scopo di valutare l'incidenza di questi farmaci nell'insorgenza dei disturbi d'umore e nel comportamento. Un'ampia varietà di risultati supportano l'ipotesi che i contraccettivi orali influenzino la funzione del sistema nervoso centrale. Alcuni gruppi di ricerca hanno dimostrato che questi farmaci influenzano negativamente l'umore delle donne che ne fanno uso (Sanders et al., 2001; Oinonen e Mazmanian, 2002; Kurshan ed Epperson, 2005). Al contrario, altri studi dimostrano che non ci sono differenze nelle variazioni d'umore, sia in negativo che in positivo, tra donne che fanno uso di contraccettivi e donne che non ne fanno uso, sebbene vi siano evidenze che in donne che assumono contraccettivi si ha una minore variabilità giornaliera dell'umore (Kurshan e

Epperson, 2005; Oinonen e Mazmanian, 2002; Rapkin et al., 2006). In generale, il fatto che alcune donne manifestino sintomi depressivi, leggeri o moderati, associati all'uso di contraccettivi, potrebbe suggerire l'esistenza di fattori di rischio che predispongono queste donne a specifiche modificazioni negative dell'umore, che includono storie personali e familiari di depressione, depressione post-partum, e sindrome premestruale (Kahn e Halbreich, 2001; Joffe et al., 2003; Borgström et al., 2008; Segebladh et al., 2009).

I contraccettivi orali alterano i ritmi circadiani, le percezioni visive e uditive, le performance psicomotorie, e la precedente assunzione di contraccettivi orali aumenta il numero dei contatti aggressivi ricevuti nelle scimmie (Henderson and Shively, 2004).

Uno degli effetti collaterali più spiacevoli e più frequenti associato all'utilizzo dei contraccettivi orali è inoltre la riduzione del desiderio sessuale (Alexander et al., 1990; Graham, 1993; Caruso et al., 2004; Wallwiener et al., 2010). Infatti, alcuni studi effettuati sull'uomo, dimostrano che il trattamento cronico con una combinazione di estroprogestinici ha un effetto negativo su vari aspetti della sessualità, in particolare riduce l'interesse sessuale, la frequenza dell'attività sessuale e la frequenza nell'iniziare l'approccio sessuale con il partner (Graham et al., 1995, Battaglia et al., 2011). Tuttavia i dati in relazione all'influenza dei contraccettivi orali sulla vita sessuale sono contrastanti, in quanto alcune donne che assumono questi farmaci

riferiscono una maggiore frequenza nei rapporti sessuali (Wynn et al., 1975; Trussel and Westoff, 1980) o nessuna variazione, e in ogni caso gli effetti sono strettamente dipendenti dal dosaggio di estrogeni o progestinici presenti nella pillola e dalla modalità d'uso, continua o discontinua, quest'ultima a sua volta strettamente determinata dagli effetti negativi dei contraccettivi orali e associata ad una maggioranza di effetti negativi sulla sfera sessuale (Sanders et al., 2001).

### ***Steroidi neuroattivi***

Alcuni ormoni steroidei inducono i loro effetti non solo attraverso la classica azione genomica, ma anche alterando l'eccitabilità neuronale mediante un'azione diretta su specifici recettori di membrana per i neurotrasmettitori (Majewska et al., 1986; Paul e Purdy, 1992; Lambert et al., 1995). Gli steroidi con questa proprietà sono denominati steroidi neuroattivi. Mentre l'azione degli steroidi a livello del genoma richiede un periodo di tempo di qualche ora, poiché è limitata dal tempo necessario per la biosintesi delle proteine, la modulazione degli steroidi neuroattivi è un evento rapidissimo che richiede solo pochi secondi per l'insorgenza dell'effetto (McEwen, 1991).

La sintesi di questi steroidi avviene non solo nei principali organi periferici steroidogenici, quali gonadi e surreni, ma con un processo simile e indipendente da

quello periferico ha luogo direttamente nel cervello. Infatti, le cellule gliali (oligodendrociti e astrociti) e le cellule neuronali, sono capaci di sintetizzare tali molecole *ex novo* a partire dal colesterolo, attraverso una via biosintetica che richiede l'attività del citocromo P-450 (Hu et al., 1987; Le Goascogne et al., 1987; Ukena et al., 1998). Gli ormoni steroidei di sintesi cerebrale vengono così denominati neurosteroidi.

Il pregnenolone e il progesterone rappresentano i precursori di fondamentale importanza per la sintesi dei neurosteroidi e in generale degli ormoni steroidei (Fig. 7). Il pregnenolone può essere trasformato in progesterone dall'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\beta$ -HDS), il progesterone a sua volta può subire diversi destini metabolici: 1) essere metabolizzato in 5 $\alpha$ -deidroprogesterone (5 $\alpha$ -pregnen-3,20 dione) dall'enzima 5 $\alpha$ -riduttasi, e quindi ulteriormente convertito in allopregnanolone (3 $\alpha$ -idrossi-5 $\alpha$ -pregnan-20-one) dall'enzima 3 $\alpha$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\alpha$ -HDS); 2) essere metabolizzato in 11-deossicorticosterone (DOC) per azione dell'enzima P450<sub>C21</sub> (21-idrossilasi). Il DOC, per azione della 5 $\alpha$ -riduttasi viene quindi trasformato in diidrodossicorticosterone (DHDOC) e successivamente in tetraidrodossicorticosterone (THDOC) ad opera della 3 $\alpha$ -HDS; 3) per azione dell'enzima P450<sub>C17</sub> (17 $\alpha$ -idrossilasi) il progesterone (attraverso l'intermedio androstenedione) può essere convertito a testosterone, che per opera di una aromatasi può essere ulteriormente metabolizzato a estradiolo.

Inoltre, il pregnenolone attraverso una seconda via biosintetica, che prevede l'intervento dell'enzima P450<sub>C17</sub>, viene idrossilato a 17-OH pregnenolone e successivamente a deidroepiandrosterone (DHEA). Anche quest'ultimo può essere convertito, attraverso composti intermedi, in testosterone e quindi in estradiolo.

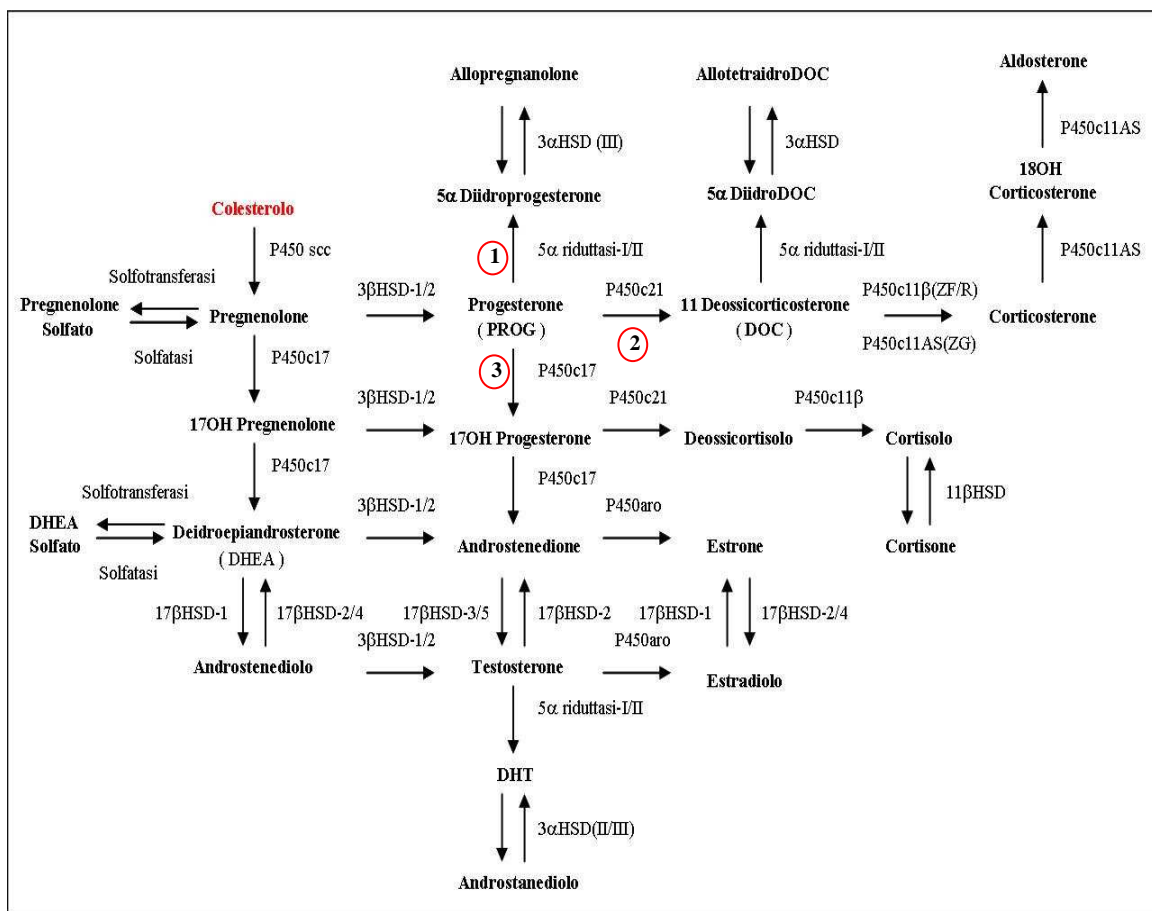


Figura 7. Biosintesi degli steroidi neuroattivi a partire dal colesterolo.

Alcuni neurosteroidi inducono i loro effetti alterando l'eccitabilità neuronale attraverso la modulazione diretta dell'attività dei recettori di membrana associati a canali ionici, esercitando quindi un effetto rapido non genomico (Majewska et al., 1986; Paul e Purdy, 1992; Lambert et al., 1995).

Tra questi, l'allopregnanolone è, sia in vivo che in vitro, tra i più potenti ed efficaci modulatori allosterici positivi endogeni della funzione dei recettori di tipo A per l'acido gamma-aminobutirrico ( $GABA_A$ ), il neurotrasmettitore a carattere inibitorio più diffuso nel sistema nervoso centrale dei mammiferi (Majewska et al., 1986; Paul e Purdy, 1992; Lambert et al., 1995), che svolge un ruolo cruciale nella regolazione fisiologica e farmacologica del sonno, delle emozioni, delle crisi epilettiche e della memoria. Numerosi esperimenti in vivo hanno infatti dimostrato che l'allopregnanolone induce effetti ansiolitici, anticonvulsivanti e neuroendocrini simili a quelli indotti da altri modulatori allosterici positivi del recettore  $GABA_A$  come benzodiazepine e barbiturici (Mendelson et al., 1987; Belelli et al., 1989; Bitran et al., 1991; Concas et al., 1996). L'evidenza che l'allopregnanolone moduli la funzione di questi recettori ha stimolato numerosi studi volti a comprendere come essi possano essere coinvolti nella regolazione delle funzioni cognitive superiori e nel controllo delle emozioni. Numerosi studi sperimentali hanno evidenziato come alterate concentrazioni periferiche e centrali di allopregnanolone siano coinvolte in diverse patologie psichiatriche e disturbi d'umore, come la depressione maggiore

(Uzunova et al., 1998; Heuser et al., 1998), la depressione in gravidanza e post partum (Pearson Murphy et al., 2001), gli attacchi di panico e i disturbi d'ansia (Ströhle et al., 2002; Bicikova et al., 2000), la sindrome premestruale (Wang et al., 1996; Monteleone et al., 2000) e lo stress associato ad amenorrea (Genazzani et al., 2002).

Infatti i livelli di allopregnanolone sono ridotti in individui con disturbi di panico, depressione o ansia, depressione post-partum (Pearson Murphy et al., 2001) e in modelli animali di depressione e di stress cronico (Guidotti et al., 2001; Pinna et al., 2004; Serra et al., 2000), e la sua somministrazione agli animali induce un effetto antidepressivo in test comportamentali (Porsolt) utilizzati per valutare l'efficacia antidepressiva di un farmaco (Khisti et al., 2000).

Inoltre è stato chiaramente dimostrato che l'allopregnanolone riveste un ruolo importante nel controllo del comportamento sessuale femminile ed è cruciale per il successo della riproduzione. Infatti la sua somministrazione promuove il rilascio di gonadotropine, l'ovulazione e il comportamento riproduttivo (Frye et al., 1998). Inoltre, bloccando il metabolismo del progesterone mediante iniezione sistemica o centrale di un inibitore della 5 $\alpha$ -reduttasi si riduce la lordosi negli animali trattati rispetto agli animali di controllo, trattati col solvente (Frye 2001).

### **Obiettivo**

Il nostro laboratorio ha precedentemente dimostrato che il trattamento cronico con etinilestradiolo e levonorgestrel, due steroidi di sintesi tra i più utilizzati nelle combinazioni estroprogestiniche (EE-LNG) della pillola contraccettiva, induce una marcata riduzione delle concentrazioni cerebrocorticali e plasmatiche di progesterone e allopregnanolone (Follesa et al., 2002) e nella donna previene le fluttuazioni dei livelli plasmatici di questi ormoni che si verificano in corrispondenza dell'ovulazione e nella fase luteale del ciclo mestruale (Rapkin et al., 2006). Quest'alterazione dell'assetto neuroendocrino è correlata ad una modificazione nell'espressione di alcune subunità del recettore GABA<sub>A</sub> (Follesa et al., 2002). Pertanto, ho voluto valutare se la riduzione delle concentrazioni di allopregnanolone fosse associata a modificazioni comportamentali negli animali trattati cronicamente con EE-LNG. In particolare ho analizzato lo stato emozionale degli animali nel test di Porsolt, nel test della preferenza al saccarosio e nel test dell'elevated plus maze, l'apprendimento e la memoria nel test del Morris water maze, il comportamento agonistico nel test del resident-intruder, e il comportamento sessuale nel test del paced-mating e del non paced-mating. In letteratura sono pochissimi gli studi che documentano gli effetti dei contraccettivi orali, soprattutto a livello centrale, sugli animali, che rappresentano un modello sperimentale molto utile, poiché è possibile escludere gli aspetti psicologici



associati all'utilizzo della pillola e quindi osservarne esclusivamente gli effetti farmacologici.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Animali***

Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti femmina Sprague-Dawley (Charles River, Calco, LC, Italia) del peso di 200-225 g. Gli animali sono stati stabulati, sei per ogni gabbia, con un ciclo artificiale luce:buio di 12:12 ore (luce dalle 08:00 alle 20:00), a una temperatura costante di  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e un'umidità relativa del 65%. Per lo studio del comportamento aggressivo e sessuale gli animali sono stati stabulati a ciclo luce:buio di 12:12 ore invertito (luce dalle 20:00 alle 8:00). Gli animali hanno avuto libero accesso all'acqua e al cibo per l'intero periodo sperimentale. I ratti femmina usati come intrusi nel test del resident-intruder sono stati ovariectomizzati previa anestesia con equithesin (una miscela di pentobarbital, etanolo 96%, e cloralio idrato; 3 ml/Kg) due settimane prima del test per permettere l'assorbimento dei punti e la stabilizzazione del sistema neuroendocrino.

Nello studio del comportamento sessuale il ciclo estrale delle ratte è stato monitorato quotidianamente attraverso uno striscio vaginale, in quanto la valutazione della citologia vaginale è importante poiché le femmine sono recettive, e quindi disponibili per l'accoppiamento, solo durante la fase dell'estro. La cura e la manipolazione degli animali per le procedure sperimentali, sono state condotte in

accordo con le linee guida del Consiglio Direttivo della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

### ***Trattamento farmacologico***

I ratti femmina sono stati trattati una volta al giorno (h. 9.00) per 4 settimane con una combinazione di etinilestradiolo (EE 0,030 mg/animale) e levonorgestrel (LNG 0,125 mg/animale) disciolti in una soluzione di carbossimetilcellulosa allo 0,4% e somministrati oralmente in un volume di 1 ml mediante sondini intragastrici; gli animali di controllo hanno ricevuto la stessa quantità di solvente. Gli animali sono stati quindi sottoposti ai test comportamentali 24 ore dopo l'ultimo trattamento.

Anche per il saggio degli steroidi gli animali sono stati sacrificati 24 ore dopo l'ultimo trattamento, mentre alcuni gruppi di ratti trattati con i contraccettivi orali sono stati sacrificati dopo trattamento sotto cute con: veicolo (200 µl olio di sesamo), progesterone (P; 4 mg/Kg/200 µl di olio di sesamo) 4 h prima del sacrificio, Finasteride (F; 50 mg/kg/3 ml olio di sesamo) 6 ore prima del sacrificio seguita 2 ore dopo da 4mg/Kg di P, e F da sola.

***Estrazione e misurazione degli steroidi cerebrali e plasmatici mediante dosaggio radioimmunologico (RIA)***

Dopo il sacrificio degli animali, il cervello è stato rapidamente estratto (<1 minuto) e le cortecce cerebrali sono state dissezionate e congelate in ghiaccio secco per essere poi conservate a -20°C fino all'estrazione degli steroidi. Gli steroidi presenti nell'omogenato di corteccia cerebrale (400 mg di tessuto in 4 ml di tampone fosfato) di ogni singolo ratto sono stati estratti quattro volte con un ugual volume di etilacetato. La fase organica è stata fatta evaporare sottovuoto, il residuo è stato disciolto in 5 ml di n-esano, caricato su una colonna di silica Seppak (Waters) e i suoi componenti sono stati eluiti con una miscela di n-esano e 1-propanolo (7:3; vol:vol). Gli steroidi sono stati ulteriormente purificati tramite cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), utilizzando una colonna di Lichrosorb-diolo (250 mm x 4 mm) (Phenomenex) sviluppata con un gradiente di 1-propanolo in n-esano. Dal momento che il colesterolo viene eluito dalla colonna di Lichrosorb-diolo insieme al progesterone e poiché esso riduce la sensibilità del dosaggio radioimmunologico (RIA) per il progesterone, la frazione eluita dalla colonna corrispondente a quest'ultimo steroide, è stata ulteriormente purificata dal colesterolo tramite due lavaggi con 200 µl di Dimetilsolfossido (Sigma-Aldrich) ed uno con 400 µl di acqua distillata. Il progesterone è stato quindi estratto per quattro volte dalla fase acquosa con 1,5 ml di n-esano. Il recupero di ciascuno steroide attraverso le varie fasi di

estrazione e purificazione (dal 60 al 80%) è stato monitorato tramite l'aggiunta di steroidi traccianti triziati (8000 cpm) all'omogenato di tessuto cerebrale prima dell'estrazione. Gli steroidi sono stati quantificati mediante il test radioimmunologico come descritto (Porcu et al., 2003), utilizzando anticorpi specifici per il progesterone e il testosterone (MP Biomedicals, Illkirch Francia), per l'allopregnanolone e i relativi steroidi triziati (circa 8000cpm). L'anticorpo per l'allopregnanolone è stato ottenuto dal coniglio e caratterizzato come precedentemente descritto (Purdy et al., 1990).

### ***Studi comportamentali***

#### ***Elevated plus-maze test***

Il plus-maze è un test comportamentale che permette di valutare lo stato ansioso di un animale ed è basato sulla naturale avversione degli animali per gli spazi aperti. L'apparato è fabbricato in cloruro di polivinile nero e consiste in due bracci aperti e due chiusi dotati di pareti scure (12 cm x 60 cm) connessi da un quadrato centrale (12 cm x 12 cm) che serve da punto d'inizio per il test (*start point*). L'apparato è sollevato 50 cm da terra e posto in una stanza silenziosa con luce soffusa (Fig. 8).

Il giorno del test, i ratti sono stati portati nella stanza almeno 1 h prima dell'inizio del test, in modo da abituarsi al nuovo ambiente. Il test ha una durata di 5 minuti e ogni ratto è stato testato una sola volta. All'inizio del test, l'animale è stato posto sullo *start point* con il muso rivolto verso un braccio aperto. Durante il test sono

stati annotati il numero delle entrate effettuate nei bracci aperti e chiusi così come il tempo trascorso negli stessi; l'entrata nel braccio è stata considerata quando l'animale metteva tutte e quattro le zampe nel corrispettivo braccio aperto o chiuso. L'apparato è stato pulito con metanolo al 20% nell'intervallo del test fra un animale e un altro.

La proporzione delle esplorazioni spontanee negli spazi aperti verso quelle negli spazi chiusi e il rispettivo tempo trascorso al loro interno, è stata considerata come misura dello stato ansioso dell'animale.



**Figura 8. Elevated Plus-Maze test.**

### Porsolt test

Il test di Porsolt, chiamato anche “test del nuoto forzato” o “test del comportamento disperato”, viene utilizzato per valutare l’efficacia di farmaci a potenziale attività antidepressiva. Esso consiste nell’immergere individualmente l’animale in un ambiente ristretto, un cilindro di plexiglas dell’altezza di 40 cm e del diametro di 20 cm, riempito di acqua alla temperatura di 25°C, dal quale non esiste possibilità di fuga (Fig. 9). L’animale è quindi costretto a rimanere a galla o nuotare per la durata di 5 min.



**Figura 9. Test di Porsolt**

Dopo un breve periodo d’iperattività, gli animali adottano una posizione immobile caratteristica, in cui galleggiano in acqua compiendo solamente i movimenti necessari a tenere la testa fuori dall’acqua, e non tentano più di scappare. Questo parametro d’immobilità nell’acqua, associato a un tono dell’umore depresso, è utilizzato per testare l’attività antidepressiva di diversi farmaci, che tendono a ridurre

questo tempo d'immobilità. I ratti sono stati prima sottoposti a un *pretest* di 10 minuti che consiste nel farli abituare individualmente nel cilindro di plexiglass, e quindi asciugati, riscaldati e rimessi nella propria gabbia. 24h dopo il *pretest*, i ratti sono stati nuovamente introdotti nell'acqua del cilindro per 5 minuti e la durata totale dell'immobilità durante il test è stata utilizzata come parametro di riferimento per valutare lo stato depressivo degli animali. Sono inoltre stati misurati il tempo speso nel comportamento di climbing, caratterizzato da movimenti attivi con le zampe anteriori dentro e fuori dall'acqua solitamente diretti contro le pareti, e di swimming, ovvero il nuoto all'interno del cilindro.

#### *Test di preferenza al saccarosio*

Il saccarosio è molto appetibile per i ratti, e una riduzione del suo consumo è indice di una ridotta sensibilità agli stimoli normalmente gratificanti, condizione paragonabile all'anedonia, uno tra i principali sintomi di depressione, che viene valutato con questo test.

Tutti gli animali sono stati isolati per valutare individualmente il consumo dei fluidi, e sottoposti a una sessione di allenamento della durata di 48 ore, in cui sono stati privati di acqua, ma avevano accesso a due bottiglie contenenti una soluzione di saccarosio all'1%, in modo da abituarli alla bevanda. Il giorno del test una delle due bottiglie è stata sostituita con una bottiglia contenente acqua e gli animali sono stati lasciati liberi di bere per 24 ore. La posizione delle bottiglie è stata invertita dopo 12



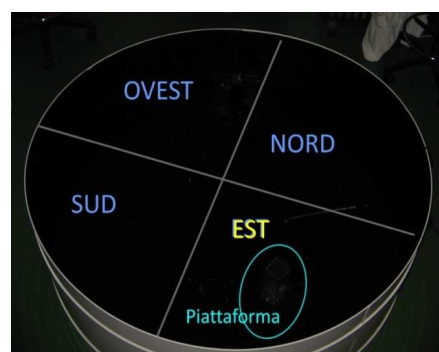
ore per evitare che il risultato fosse falsato da un'eventuale preferenza degli animali per un lato della gabbia. Il consumo dei fluidi è stato calcolato confrontando il peso delle bottiglie prima e dopo il test e correlato al peso corporeo di ogni animale, per il calcolo del consumo di saccarosio, di acqua e il consumo totale di fluidi (g/Kg). Questi dati sono stati quindi utilizzati per calcolare la preferenza al saccarosio (%) come rapporto tra la soluzione di saccarosio consumata e il consumo totale di fluidi.

#### Test del Morris water maze

Gli animali sono stati sottoposti al test del water maze (Morris, 1984) per valutare la loro capacità di apprendimento individuale e di memoria spaziale. L'apparecchiatura del water maze consiste in una vasca di plastica nera del diametro di 150 cm, riempita con acqua fino all'altezza di 40 cm circa e mantenuta alla temperatura costante di 24-26 °C. All'interno della vasca è posta, in posizione fissa e sotto il pelo dell'acqua, una piccola piattaforma in cui l'animale può salire. L'intero test consta di due fasi: fase di *allenamento* (o fase di acquisizione) e *probe trial*. Durante la prima fase si eseguono 4 prove di addestramento (trials) al giorno per ogni animale e per un periodo complessivo di 4 giorni, in modo che il ratto si ambienta nel labirinto ad acqua e impari la posizione della piattaforma (Vorhees e Williams, 2006). La vasca è suddivisa idealmente in 4 quadranti con l'ausilio del software Noldus Ethovision XT 5.0 e di una telecamera a circuito chiuso. Ciascun quadrante è indicato

con il nome di uno dei quattro punti cardinali e la piattaforma viene posizionata sempre nella stessa zona del labirinto, quella EST (Fig. 10). Ciascun trial ha avuto inizio posizionando l'animale con il muso rivolto verso la parete della vasca nel seguente ordine:

- 1° trial zona SUD
- 2° trial zona OVEST
- 3° trial zona NORD
- 4° trial zona EST

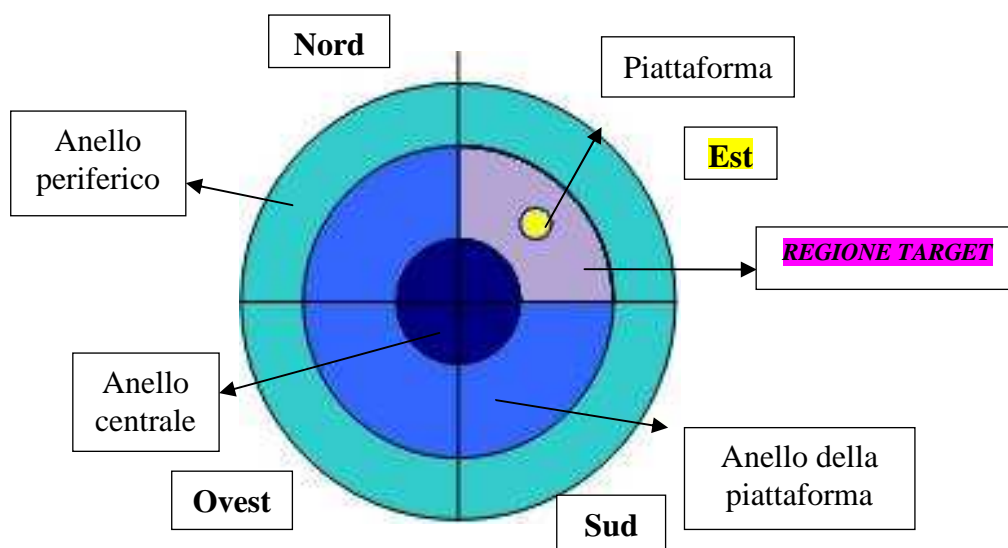


**Figura 10. Il labirinto ad acqua diviso in quadranti con la piattaforma posizionata nella zona EST**

Durante le sedute di training l'animale impara la posizione della piattaforma utilizzando i riferimenti spaziali presenti nella stanza; per i nostri esperimenti sono state utilizzate diverse figure geometriche sistemate nelle quattro pareti della stanza. Una volta raggiunta la piattaforma, l'animale sosta su di essa per 15 secondi, terminati i quali il ratto viene sottoposto al trial successivo. Ciascun trial ha una durata massima di 2 minuti; se l'animale non raggiunge la piattaforma entro tale tempo, viene accompagnato manualmente dall'operatore e lasciato su di essa per 15 secondi, al termine dei quali avrà inizio il trial successivo. Durante la fase di apprendimento viene registrato il tempo che l'animale impiega a raggiungere la piattaforma (latenza al ritrovamento della piattaforma).

Al 5° giorno dell'esperimento è stato eseguito il test finale o *probe trial*, un unico trial della durata di 60 secondi eseguito in assenza della piattaforma. Il ratto viene immerso nella vasca nel quadrante OVEST, opposto a quello nel quale si trovava la piattaforma, con il muso rivolto verso la parete della vasca. Per il *probe trial* l'arena viene inoltre suddivisa in tre anelli, anello periferico, anello della piattaforma e anello centrale (Fig. 11). In questo intervallo di tempo sono stati registrati i seguenti parametri:

- Latenza e frequenza nella zona occupata dalla piattaforma durante il training
- Tempo speso nell'anello della piattaforma
- Tempo speso nella regione target
- Tempo speso nell'anello periferico
- Tempo speso nel quadrante in cui si trovava la piattaforma (EST)



**Figura 11. Rappresentazione schematica dei parametri del probe**

L'impiego del software Noldus Ethovision XT 5.0 ha permesso di circoscrivere/delimitare l'esatta posizione della piattaforma in modo da poterla identificare quando questa viene rimossa, e le varie aree per la valutazione dei parametri del *probe trial*.

#### Test del resident-intruder

Per il test del resident-intruder sono stati utilizzati 10 ratti femmina controllo, 10 ratti femmina trattati con EE-LNG, come residenti, e 20 ratti femmina ovariectomizzati, della stessa dimensione dei residenti, come intrusi. L'uso di ratti femmina ovariectomizzati come intrusi elimina la variabilità del comportamento, indotta dal ciclo estrale.

Due settimane prima dell'esperimento gli animali sono stati messi a ciclo luce-buio invertito, stabulati circa 5 per gabbia, con libero accesso ad acqua e cibo. Una settimana prima dell'esperimento i residenti sono stati isolati, e le gabbie non sono mai state cambiate fino al giorno dell'esperimento in modo da instaurare una territorialità per l'home cage, mentre gli animali ovariectomizzati sono rimasti in gruppo. Il giorno dell'esperimento, eseguito durante la fase buia e nella stessa stanza dove gli animali stabulavano, un ratto ovariectomizzato (intruso) è stato introdotto nella gabbia di ogni residente; l'interazione, della durata di 15 minuti, è stata ripresa con una videocamera Sony Handicam in modalità nightshot per l'analisi successiva dei comportamenti mostrati dal residente vis-à-vis con l'intruso.

L'analisi dei comportamenti è stata eseguita utilizzando il software Behavior Tracker, e sono stati analizzati 20 comportamenti in base all'etogramma di Grant e Mackintosh (1963; vedi tabella 2 modificata da Clipperton et al., 2008, per la descrizione dei comportamenti); per l'analisi sono stati presi in considerazione i comportamenti dell'animale sperimentale, e i comportamenti dell'ovariectomizzato solo in relazione all'altro.

**Tabella 2. Descrizione dei comportamenti misurati.**

---

*Comportamenti Sociali*

Inseguimento dell'intruso	Il ratto segue attivamente o rincorre e dà la caccia all'intruso; il contrario di evitare.
Comportamenti dominanti	Il residente ha il controllo; immobilizza l'intruso, lo mordicchia aggressivamente, striscia sopra di esso e tenta la monta.
Attacchi compiuti	Attacchi fisici, che includono morsi del ventre e del dorso. È stata misurata solo la frequenza degli attacchi.
Aggressione ritualizzata	Attacchi fisici che includono pugni e lotta, posture offensive e difensive, postura laterale di minaccia, colpi della coda.
Aggressione aperta	Attacchi fisici con una lotta serrata che include cadute, respinte con calci e contrattacchi, dove chi attacca non è identificabile.
Evitamento dell'intruso	Il residente si ritira e scappa dall'intruso, mentre questo lo segue.
Comportamenti di sottomissione	L'intruso ha il controllo; comprende stare sotto l'intruso, in posizione supina (esposizione della parte ventrale), stare accovacciato a lungo, e ogni altro comportamento in cui il residente è dominante (immobilizzazione, cure aggressive).
Attacchi ricevuti	Attacchi fisici, che includono morsi del ventre e del dorso. È stata misurata solo la frequenza degli attacchi.
Postura eretta di difesa	Comportamento difensivo specie-specifico; postura

---

	eretta con la testa retratta e le zampe pronte a respingere.
Inattività sociale	Include sedersi, sdraiarsi, dormire insieme.
Investigazione oronasale	Attivo annusamento della zona oronasale dell'intruso.
Investigazione corporea	Attivo annusamento del corpo dell'intruso.
Investigazione anogenitale	Attivo annusamento della zona anogenitale dell'intruso.
Approcci protesi	Comportamento di valutazione del rischio; le zampe posteriori restano ferme, mentre quelle anteriori sono tese verso l'intruso. È stata misurata solo la frequenza.
Approcciare/accudire l'intruso	Comportamenti che spesso avvengono per tutta la gabbia; l'attenzione del residente è focalizzata sull'intruso, la testa è rivolta verso l'intruso, così come i movimenti; questo comportamento diventa "inseguimento dell'intruso" se avviene lungo la coda o annusamento se il residente è a 1.5 cm di distanza dall'intruso.
<i>Comportamenti non sociali</i>	
Esplorazione orizzontale	Movimento intorno alla gabbia; include un attivo annusamento dell'aria e del pavimento.
Esplorazione verticale	Movimento d'investigazione in posizione eretta, con entrambe le zampe anteriori sollevate dal pavimento; include annusare e appoggiarsi alle pareti e mordicchiare il coperchio della gabbia.
Escavazione	Rapido movimento stereotipato delle zampe anteriori nella segatura.
Stereotipie insolite	"Strani" comportamenti, che comprendono rotazioni, salti verso il coperchio, masticare, scrollare la testa (più di 3).
Inattività solitaria	Nessun movimento; include sedersi, sdraiarsi e dormire.
Pulizia personale	Rapido movimento delle zampe anteriori sulla faccia e sul corpo.

---

I punteggi per ogni comportamento/postura individuale sono stati raggruppati secondo la loro categoria motivazionale (Tabella 3).

**Tabella 3. Descrizione dei comportamenti raggruppati.**

Attività totale	Tutti i comportamenti che implicano attività, sociali e non-sociali. Esclusi da questa categoria sono inattività solitaria e sociale e cura personale.
Comportamenti sociali	Inseguimento dell'intruso, comportamenti dominanti, attacchi compiuti, posture aggressive, aggressione aperta, evitamento dell'intruso, comportamenti di sottomissione, attacchi ricevuti, postura eretta di difesa, inattività sociale, investigazione oronasale, corporea e anogenitale, approcci protesi, e avvicinare/accudire l'intruso.
Comportamenti agonistici	Inseguimento dell'intruso, comportamenti dominanti, attacchi compiuti, evitamento dell'intruso, comportamenti di sottomissione, attacchi ricevuti, postura eretta di difesa, posture aggressive e aggressione aperta. Questo comportamento raggruppatto rappresenta i livelli generali di agonismo presenti nelle interazioni residente-intruso e non indica la direzione del comportamento agonistico.
Comportamenti agonistici compiuti	Inseguimento dell'intruso, comportamenti dominanti e attacchi compiuti.
Comportamenti agonistici ricevuti	Evitamento dell'intruso, comportamenti di sottomissione, attacchi ricevuti e postura eretta di difesa.
Punteggio di dominanza	Comportamenti agonistici compiuti meno comportamenti agonistici ricevuti. Un punteggio negativo indica che il residente era l'animale sottomesso nella coppia, mentre un punteggio positivo significa che era l'animale dominante.
Investigazione sociale	Investigazione oronasale, corporea, anogenitale, approcci protesi, e avvicinare/accudire l'intruso.
Comportamenti non sociali	Esplorazione orizzontale, esplorazione verticale, escavazione, stereotipie, inattività solitaria, pulizia personale.
Comportamenti non sociali di locomozione	Esplorazione orizzontale, esplorazione verticale ed escavazione.
Comportamenti non sociali e non di locomozione	Inattività solitaria e pulizia personale.

*Test del non-paced mating*

Per valutare il comportamento sessuale spontaneo, ogni ratto femmina (animale sperimentale) è stato disposto con un maschio esperto all'interno di una gabbia singola, al di sopra della quale è stato collocato un pannello di plexiglass, allo scopo di facilitare la videoripresa. All'interno della gabbia è stato reso disponibile, agli animali, cibo e acqua. L'esperimento consiste in una videoripresa con videocamere Sony Handicam (in modalità nightshot), per la successiva analisi del comportamento sessuale femminile. L'esperimento ha la durata di un'intera notte, ed è stato ripetuto per 4 notti consecutive, perché gli animali trattati con i contraccettivi orali non hanno mostrato un ciclo estrale regolare, con quattro fasi distinte, ma di solito presentano uno striscio vaginale in metestro o diestro. Ogni notte, il maschio è stato posto in una gabbia con una femmina diversa, per promuovere l'accoppiamento sfruttando l'"effetto Coolidge", secondo il quale i maschi tendono ad accoppiarsi più facilmente se interagiscono con femmine diverse. I video sono stati analizzati per la misurazione dei parametri che definiscono il comportamento sessuale nella femmina, la recettività e la procettività. La recettività è la componente "consumatoria" dell'interazione sessuale, caratterizzata dalla postura della lordosi: il ratto femmina inarca la schiena, piega la testa all'indietro e flette la coda da un lato, per permettere al maschio l'intromissione. La componente "appetitiva", motivazionale, invece, include un insieme di comportamenti procettivi espressi dalla femmina recettiva (in



estro) per attirare il maschio e facilitare la monta; questi comportamenti includono saltelli, guizzi e movimenti delle orecchie. La recettività è stata espressa come quoziente di lordosi ( $\text{lordosi} / \text{monte} + \text{intromissioni} \times 100$ ) mentre per valutare la procettività, è stato calcolato il numero totale di comportamenti procettivi.

### Test del paced mating

Il test comportamentale del paced mating ha permesso di osservare e discriminare la motivazione e predisposizione del ratto femmina per l'accoppiamento, in quanto è la femmina stessa a decidere il ritmo di interazione sessuale, al contrario del "non paced-mating", in cui è il maschio a deciderlo. Nel primo esperimento è stato valutato il comportamento sessuale nelle ratte trattate con contraccettivi orali e in ratte femmine di controllo in fasi random del ciclo estrale; nel secondo esperimento, le femmine trattate con contraccettivi orali sono state sottoposte al test del paced mating dopo trattamento sottocute con: veicolo (200  $\mu\text{l}$  olio di sesamo),  $\beta$ -estradiolo 3-benzoato (EB, 10  $\mu\text{g}$ / ratto/200  $\mu\text{l}$  olio di sesamo ) 48 h prima del test, progesterone (P, 4 mg/Kg/200  $\mu\text{l}$  di olio di sesamo) 4 h prima del test, finasteride (F; 50 mg/kg/3 ml olio di sesamo) 6 ore prima del test seguita 2 ore dopo da 4mg/Kg di P, e F da sola. L'accoppiamento è stato videoripreso durante la fase di buio del ciclo luce/buio in gabbie di plexiglass (misura 37,5 x 105 x 30 cm), divise in due compartimenti da una parete in plexiglas avente un foro centrale di dimensioni tali

(5,5 cm di diametro) da permettere il passaggio solo del ratto femmina ma non del ratto maschio a causa delle diverse dimensioni degli animali. Le femmine possono efficacemente evitare il contatto con i maschi passando attraverso il foro presente nella parete che separa i compartimenti. Inizialmente ogni ratto maschio è stato messo in un compartimento della gabbia per 5 minuti, in modo da permettere loro l'ambientamento. Successivamente il ratto femmina è stato messo nel compartimento libero della gabbia, e gli animali sono stati lasciati liberi di interagire per 20 minuti. I video sono stati quindi analizzati per la misurazione della recettività e della procettività.

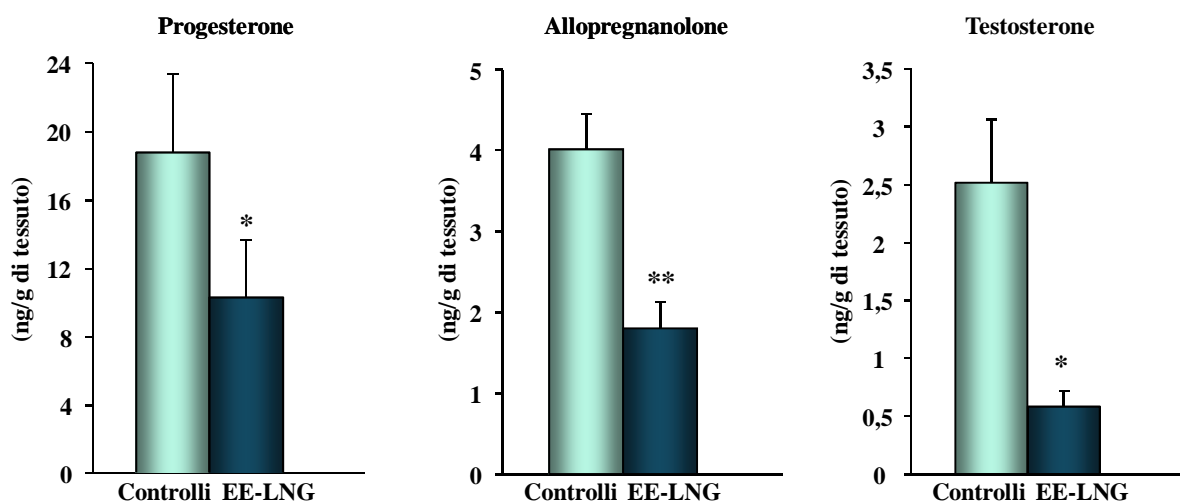
### *Analisi statistica*

I dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Newman Keuls o dal test di Scheffè. Il valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## RISULTATI

### *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sulle concentrazioni cerebrocorticali degli steroidi neuroattivi*

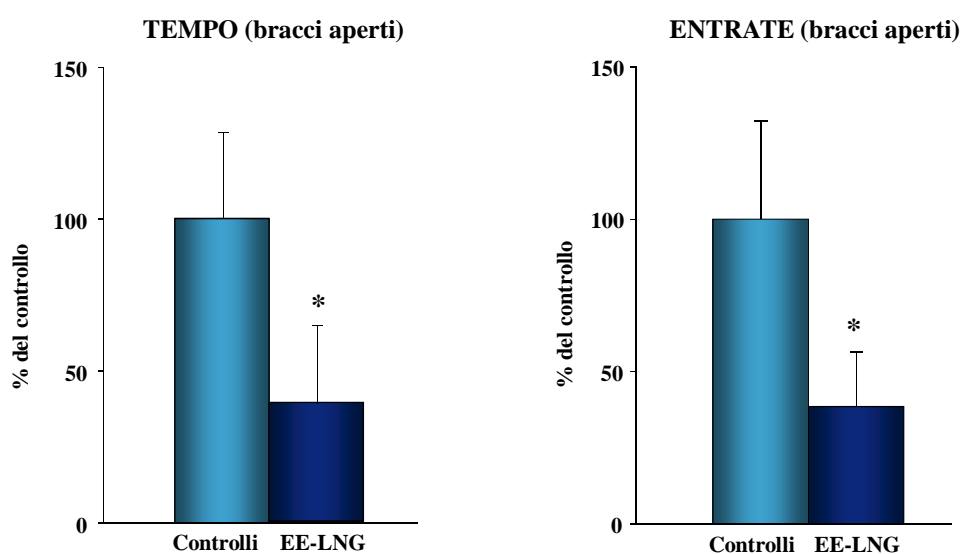
Come atteso, il trattamento cronico con EE-LNG induce una significativa riduzione delle concentrazioni di progesterone (-45%,  $p < 0,05$ ) e allopregnanolone (-55%,  $p < 0,005$ ) nella corteccia cerebrale degli animali rispetto ai controlli. Ho inoltre misurato i livelli cerebrocorticali di testosterone, che risultano drasticamente ridotti (-77%,  $p < 0,05$ ) negli animali trattati. (Fig. 12).



**Figura 12** Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sulle concentrazioni cerebrocorticali degli steroidi neuroattivi. Gli animali sono stati trattati una volta al giorno con la combinazione di EE (0,030 mg, o.s.) e LNG (0,125 mg, o.s.) o con il solvente (Controlli) per 4 settimane e sacrificati 24 ore dopo l'ultima somministrazione per la misurazione delle concentrazioni cerebrocorticali di progesterone, allopregnanolone e testosterone. I valori sono espressi in ng di steroide per grammo di tessuto e sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.  
\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$  vs Controlli.

***Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test dell'elevated plus maze***

I risultati ottenuti nel test dell'elevated plus maze hanno confermato che il trattamento cronico con EE-LNG induce un comportamento ansioso negli animali, come mostrato dalla significativa riduzione delle percentuali del tempo speso nei bracci aperti e delle entrate negli stessi (-61% e -62% rispettivamente,  $p < 0,05$ ), rispetto agli animali di controllo (Fig. 13), come già dimostrato precedentemente nel nostro laboratorio (Follesa et al., 2002). Inoltre il numero di entrate nei bracci chiusi del maze non differisce tra i due gruppi sperimentali (Controlli  $9,10 \pm 1,50$ ; Pillola  $10,60 \pm 1,19$ ), indicando che le differenze comportamentali tra gli animali trattati col solvente e quelli trattati con EE-LNG non sembrano essere dovute ad alterazioni dell'attività locomotoria spontanea.

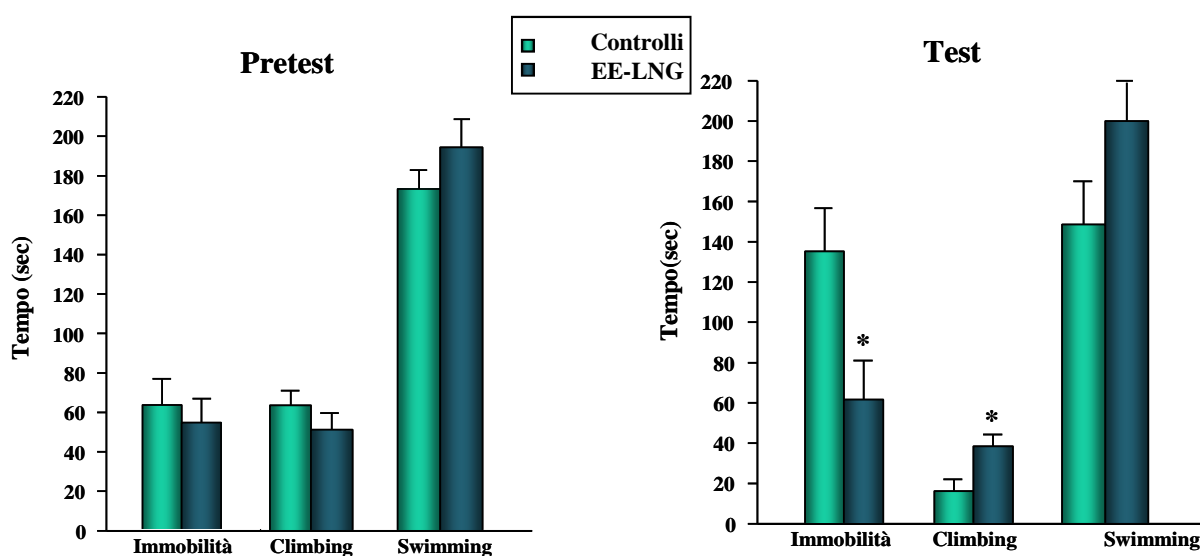


**Figura 13** Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test dell'elevated plus maze. I valori rappresentano la percentuale di tempo trascorso nei bracci aperti ed il numero di entrate negli stessi e sono la media  $\pm$  SEM di 20 animali per gruppo.

\* $p < 0,05$  vs Controlli

### *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test di Porsolt*

Come mostra il grafico in Fig. 14, durante il pretest del Porsolt, non ci sono differenze tra i due gruppi sperimentali nel tempo di immobilità, nel tempo di climbing e di swimming. Il giorno del test invece, eseguito 24 h dopo il pretest, gli animali di controllo passano un tempo superiore nella posizione di immobilità, in quanto hanno capito dal pretest del giorno precedente che non c'è nessuna via di fuga dal cilindro, e di conseguenza un tempo inferiore nel climbing e nel swimming; invece gli animali trattati cronicamente con contraccettivi orali, si comportano in maniera simile al pretest, e spendono un tempo significativamente minore immobili e un tempo maggiore nel comportamento di climbing, rispetto ai controlli nel test (-54% e +137% rispettivamente,  $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test di Porsolt.* I valori rappresentano il tempo trascorso in immobilità, nel comportamento di climbing e di swimming durante i primi 5 minuti di pretest e durante i 5 minuti di test e sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.

\* $p < 0,05$  vs Controlli

***Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test di preferenza al saccarosio***

Come mostra la tabella 4, il test di preferenza al saccarosio non ha mostrato nessuna differenza tra i ratti femmina trattati con EE-LNG e gli animali di controllo, che mostrano una percentuale simile di preferenza al saccarosio rispetto all'acqua, evidenziando quindi il fatto che il trattamento cronico con EE-LNG non induce anedonia, e quindi uno stato depressivo, confermando i risultati ottenuti nel test di Porsolt.

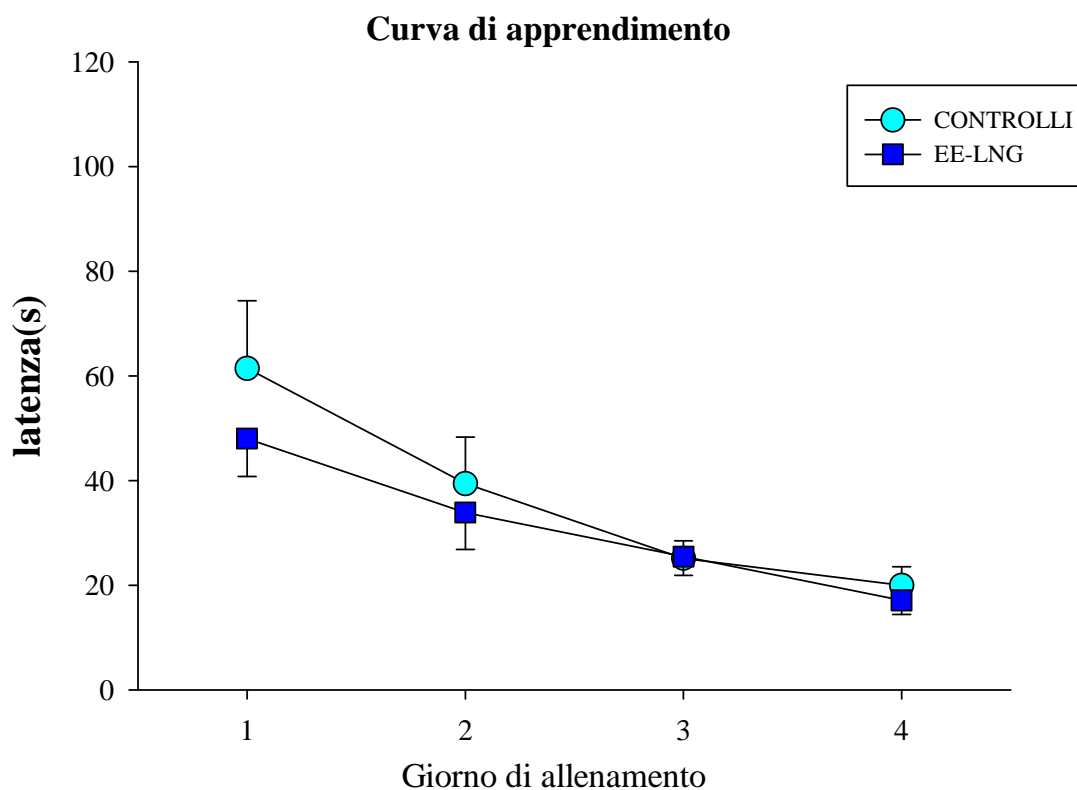
**Tabella 4.** *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test di preferenza al saccarosio.*

Gruppi	Consumo (g di liquido/kg di peso)			Preferenza al saccarosio (%)
	Totale fluidi	Acqua	Soluzione di saccarosio	
<b>Controlli</b>	227,1 ± 40,9	25,6 ± 3,8	201,6 ± 40,8	83,9 ± 3,5
<b>EE-LNG</b>	343,8 ± 42,7	34,9 ± 10,3	308,9 ± 45.1	86,9 ± 5,4

Gli animali sono stati isolati e lasciati liberi di bere da due bottiglie, una contenente acqua, e l'altra una soluzione di saccarosio all' 1%, per 24 ore. Sono stati quindi misurati il consumo dei due fluidi (g/kg peso) ed è stata calcolata la preferenza al saccarosio (g saccarosio/totale fluidi x 100)per ogni animale. I dati rappresentano la media ± SEM di 10 animali per gruppo.

***Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del Morris water maze***

Il trattamento con EE-LNG non modifica l'apprendimento nel test del Morris water maze, come mostrato dalla latenza al raggiungimento della piattaforma che decresce durante i giorni di apprendimento in maniera simile nei due gruppi sperimentali (Fig. 15).



**Figura 15.** *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sull'apprendimento dei ratti nel test del Morris water maze.* I valori rappresentano il tempo di latenza (s) al raggiungimento della piattaforma e sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.

Anche nel probe trial, eseguito in assenza della piattaforma, non ci sono differenze significative tra le femmine trattate cronicamente con EE-LNG e le femmine di controllo per quanto riguarda la latenza al raggiungimento della piattaforma e il numero di entrate nella stessa, mentre il trattamento induce un aumento significativo della velocità e della distanza totale percorsa (+33% entrambi,  $p < 0,05$ ), e del numero di entrate nel quadrante della piattaforma (+ 49%,  $p < 0,05$ ) rispetto ai controlli (Tab. 5). Il trattamento con contraccettivi orali non modifica pertanto le performance mnemoniche degli animali nel test del Morris water maze.

**Tabella 5. Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sulla memoria dei ratti nel test del Morris water maze.**

	<b>Controlli</b>	<b>EE-LNG</b>
<b>Distanza(m)</b>	6.94 ± 0.60	<b>9.24 ± 0.74*</b>
<b>Velocità (m/s)</b>	0.11 ± 0.01	<b>0.15 ± 0.01*</b>
<b>Quadrante della piattaforma (est)</b>		
No. di entrate	4.1 ± 0.53	<b>6.11 ± 0.70*</b>
Tempo (s)	19.1 ± 3.59	19.3 ± 2.98
Latenza (s)	8.53 ± 2.22	7.17 ± 1.30
<b>Anello periferico</b>		
Tempo(s)	29.7 ± 3.15	32.7 ± 3.39
<b>Anello della piattaforma</b>		
Tempo(s)	25.5 ± 2.95	23.4 ± 3.00
<b>Regione target</b>		
Tempo(s)	9.90 ± 1.61	9.22 ± 1.97
<b>Piattaforma</b>		
No. di entrate	2.1 ± 0.48	2.2 ± 0.40
Latenza(s)	27.7 ± 7.28	18.3 ± 5.63

I valori rappresentano i parametri considerati nel probe trial e sono la media ± SEM di 10 animali per gruppo.

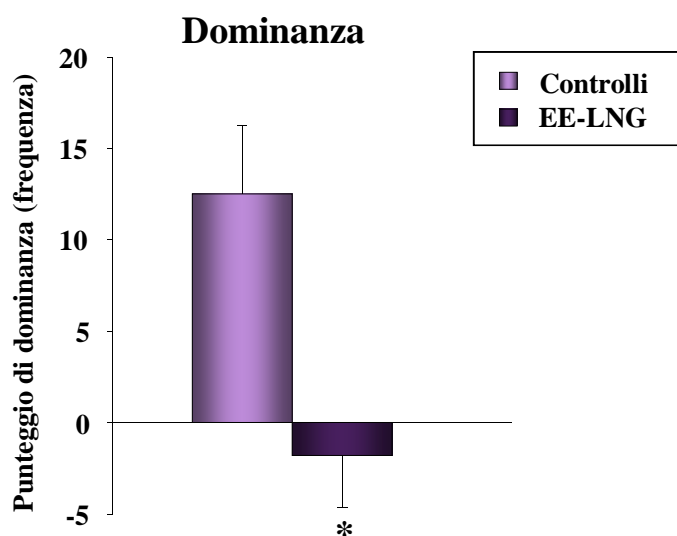
\* $p < 0,05$  vs Controlli



### ***Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del resident-intruder***

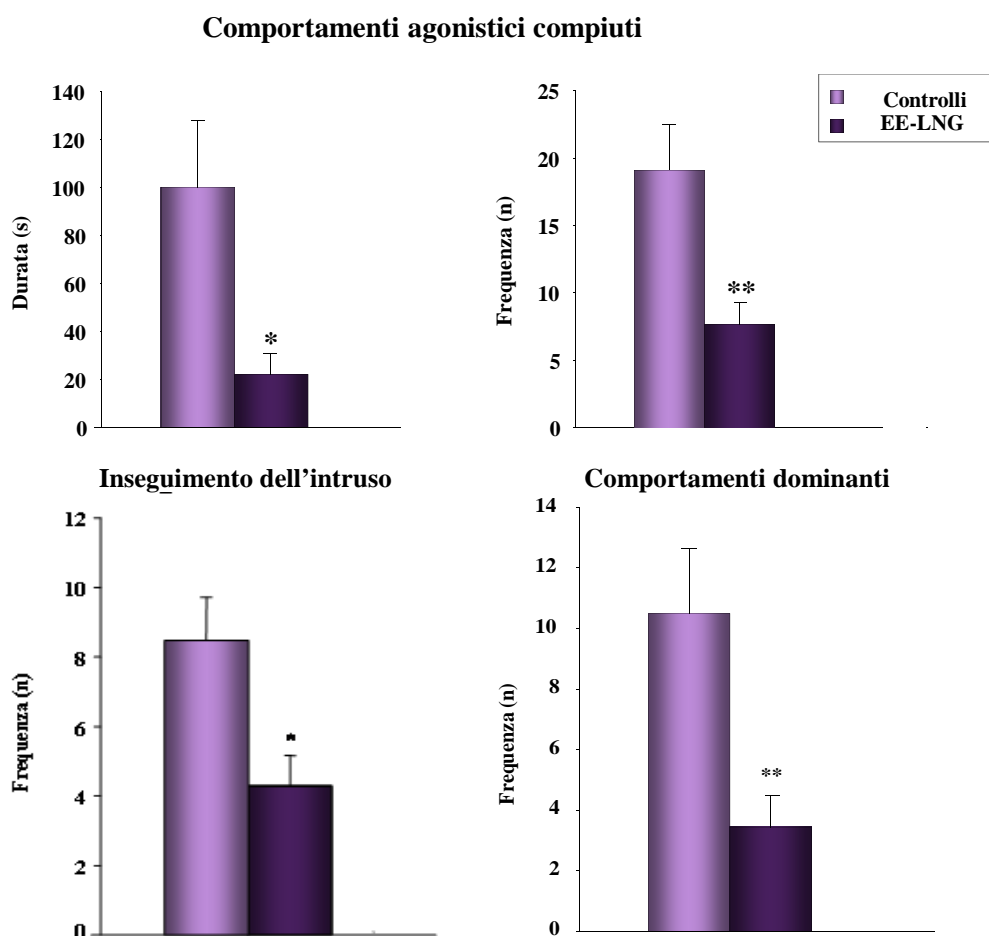
Il trattamento con EE-LNG non modifica il comportamento generale degli animali nel test del resident-intruder, infatti i comportamenti non sociali (esplorazione orizzontale e verticale, escavazione, inattività solitaria e pulizia personale) rimangono invariati, così come alcuni comportamenti sociali (investigazione oronasale).

Al contrario, per quanto riguarda i comportamenti specifici misurati nel paradigma del resident-intruder, utilizzato per valutare l'aggressività, le femmine trattate con la combinazione estroprogestinica mostrano una riduzione del punteggio di dominanza (frequenza dei comportamenti agonistici compiuti – frequenza dei comportamenti agonistici ricevuti) rispetto agli animali di controllo (-114%  $p < 0,005$ , Fig. 16).



**Figura 16.** *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del resident-intruder.* I valori riportati nel grafico rappresentano il punteggio di dominanza (frequenza). I comportamenti degli animali sono stati analizzati per 15 minuti dal momento dell'introduzione dell'intruso nella gabbia del residente. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.  
\* $p < 0,005$  vs Controlli

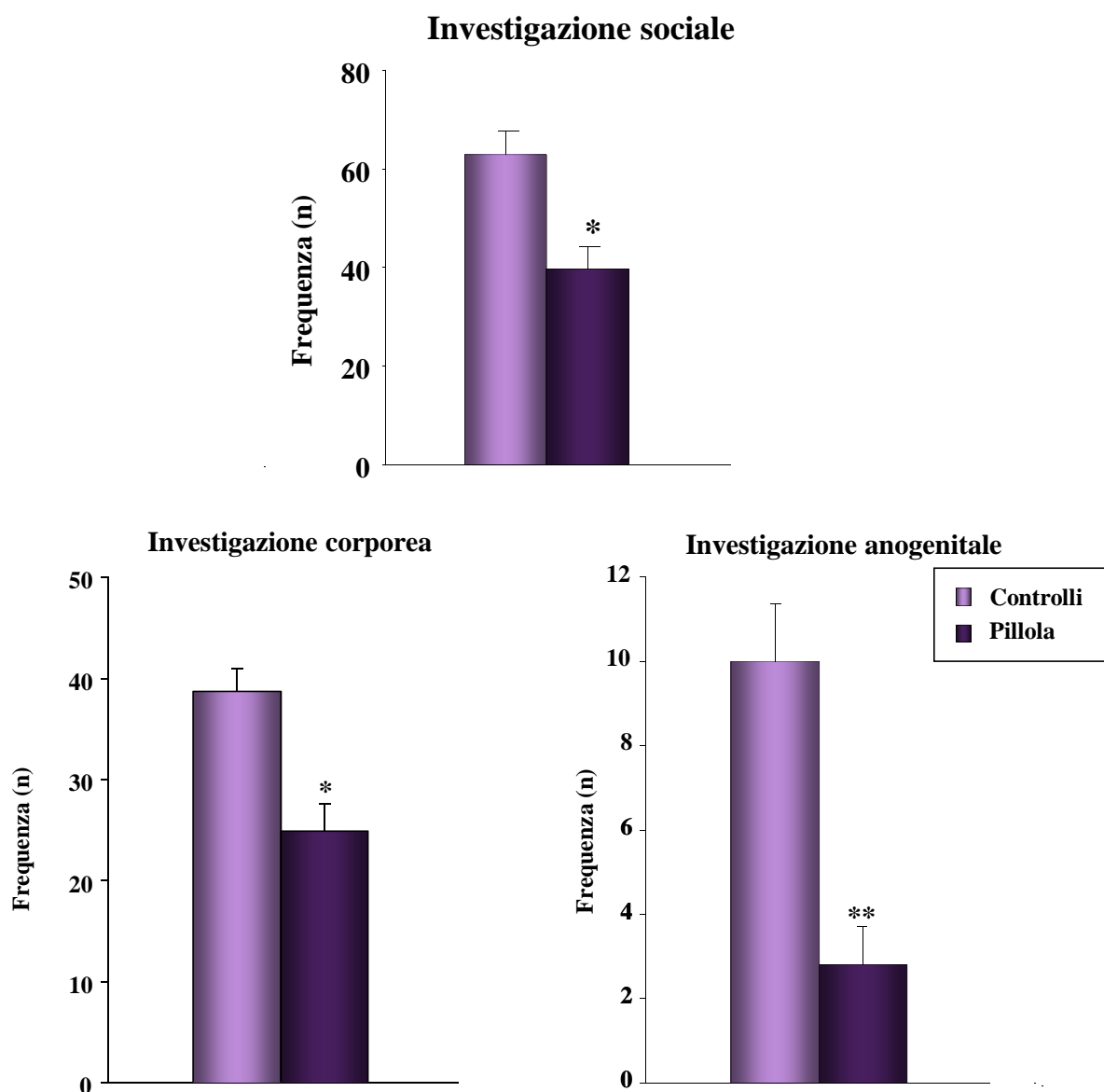
Inoltre, tutti i comportamenti agonistici (inseguimento dell'intruso, comportamenti dominanti, attacchi compiuti) sono stati raggruppati, e dall'analisi degli stessi è risultato che i ratti femmina trattati con EE-LNG mostrano sia nella durata che nella frequenza, un minore comportamento agonistico rispetto ai controlli (-78%,  $p < 0,05$  e -60%,  $p < 0,01$ , rispettivamente Fig. 17). In particolare dall'analisi dei comportamenti agonistici, è emerso che le ratte trattate cronicamente con EE-LNG hanno una riduzione della frequenza nell'inseguimento dell'intruso (-49%,  $p < 0,05$ ) e dei comportamenti dominanti (-67%,  $p < 0,01$ ), rispetto agli animali di controllo.



**Figura 17** Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del resident-intruder. I valori riportati nel grafico rappresentano la durata e la frequenza dei comportamenti agonistici compiuti e la frequenza dell'inseguimento dell'intruso e dei comportamenti di dominanza da parte del residente nei due gruppi sperimentali. I comportamenti degli animali sono stati analizzati per 15 minuti dal momento dell'introduzione dell'intruso nella gabbia del residente. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.

\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs Controlli

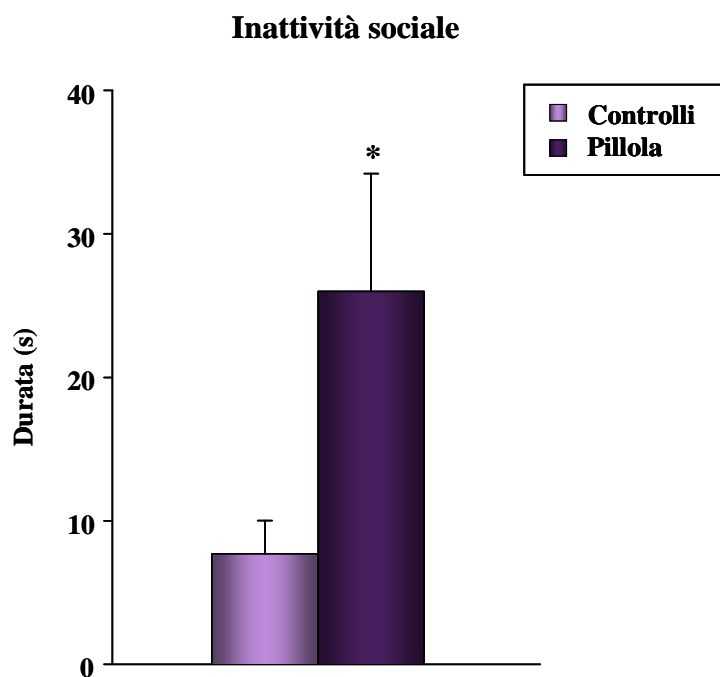
Inoltre le femmine trattate con EE-LNG hanno mostrato un minore interesse nell'investigazione sociale (Fig. 18), come mostrato dalla ridotta frequenza di questo comportamento (-37%  $p<0,005$ ), e in particolare dell'investigazione corporea (-36%,  $p<0,001$ ) e di quella anogenitale (-72%  $p<0,001$ ).



**Figura 18** Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del resident-intruder. I valori riportati nei due grafici rappresentano la frequenza di investigazione sociale, corporea e anogenitale compiuta dal residente nei confronti dell'intruso. I comportamenti degli animali sono stati analizzati per 15 minuti dal momento dell'inserimento dell'intruso nella gabbia. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.

\*  $p<0,05$  e \*\*  $p<0,005$  vs Controlli

Come mostra la Fig. 19, tra i 21 comportamenti analizzati è emerso anche che le ratte trattate cronicamente con EE-LNG hanno speso un maggiore tempo in inattività sociale (+238%,  $p < 0,05$ ) rispetto ai controlli, che include sedersi, sdraiarsi e dormire insieme, oltre che mostrare poco interesse alle attenzioni da parte dell'intruso.

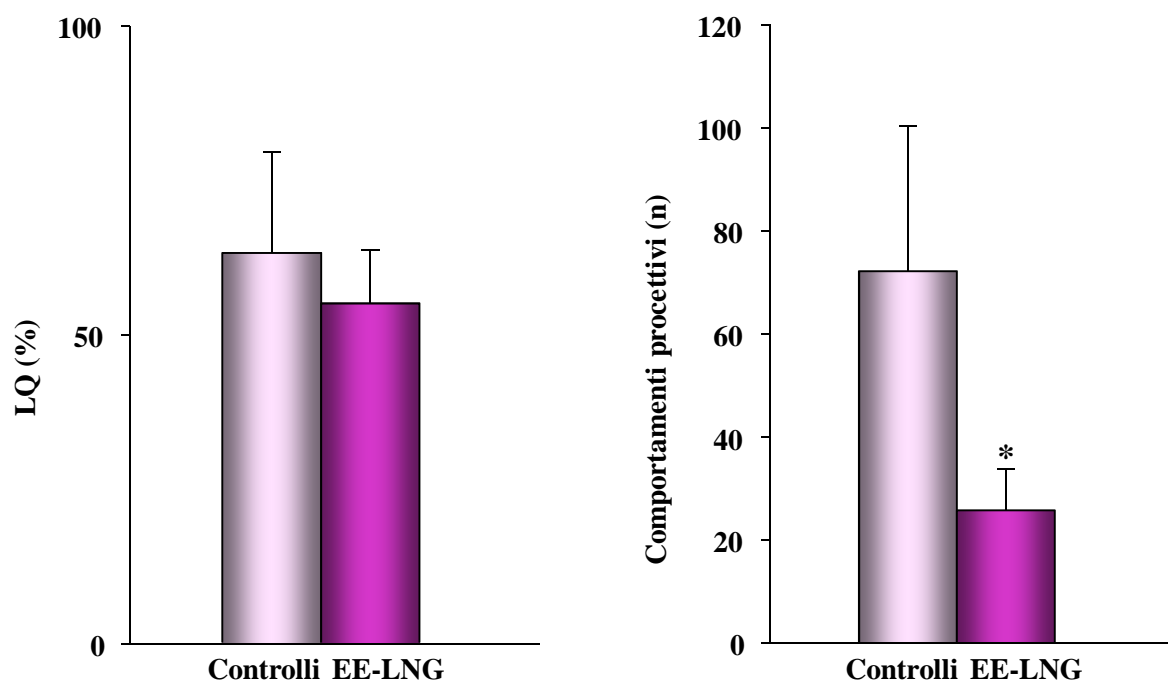


**Figura 19** Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti nel test del *resident-intruder*. I valori riportati nel grafico rappresentano la durata di inattività sociale compiuta dai residenti nei confronti dell'intruso nei due gruppi sperimentali. I comportamenti degli animali sono stati analizzati per 15 minuti dal momento dell'inserimento dell'intruso nella gabbia. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.

\*  $p < 0,05$  vs Controlli

### *Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento sessuale dei ratti*

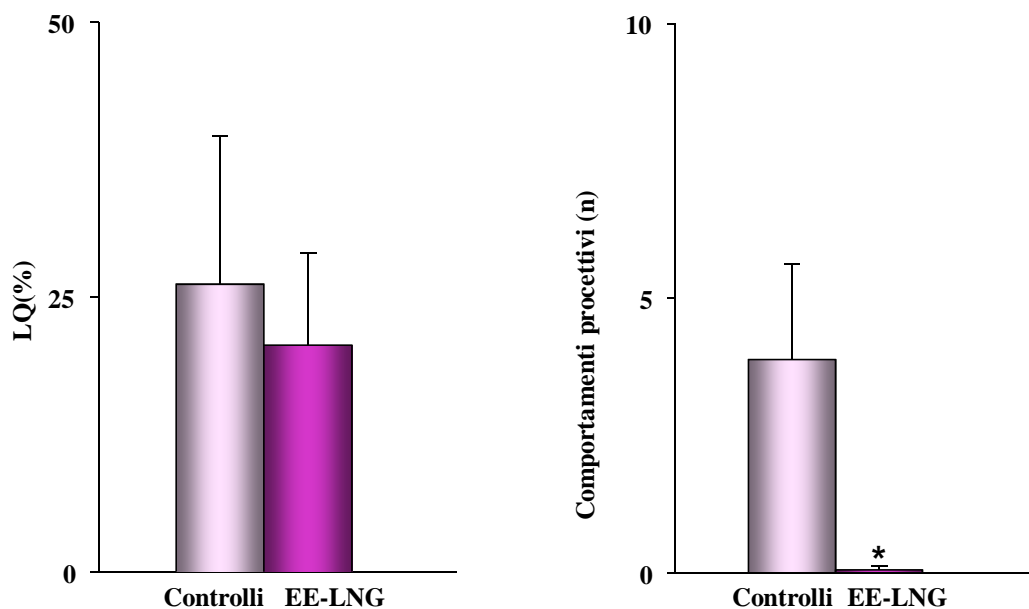
Il trattamento cronico con EE-LNG non altera la recettività femminile nel test del non-paced mating (Fig. 20), come dimostrato dal quoziente di lordosi simile nei due gruppi sperimentali. Al contrario questo trattamento influenza in maniera specifica la motivazione sessuale, come mostrato dalla significativa riduzione dei comportamenti procettivi (-64%,  $p < 0,05$ ) nei ratti femmina trattati rispetto al gruppo di controllo.



**Figura 20** Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti femmina nel test del non-paced mating. I valori nei grafici rappresentano il quoziente di lordosi espresso in percentuale e il numero dei comportamenti procettivi. I dati sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.

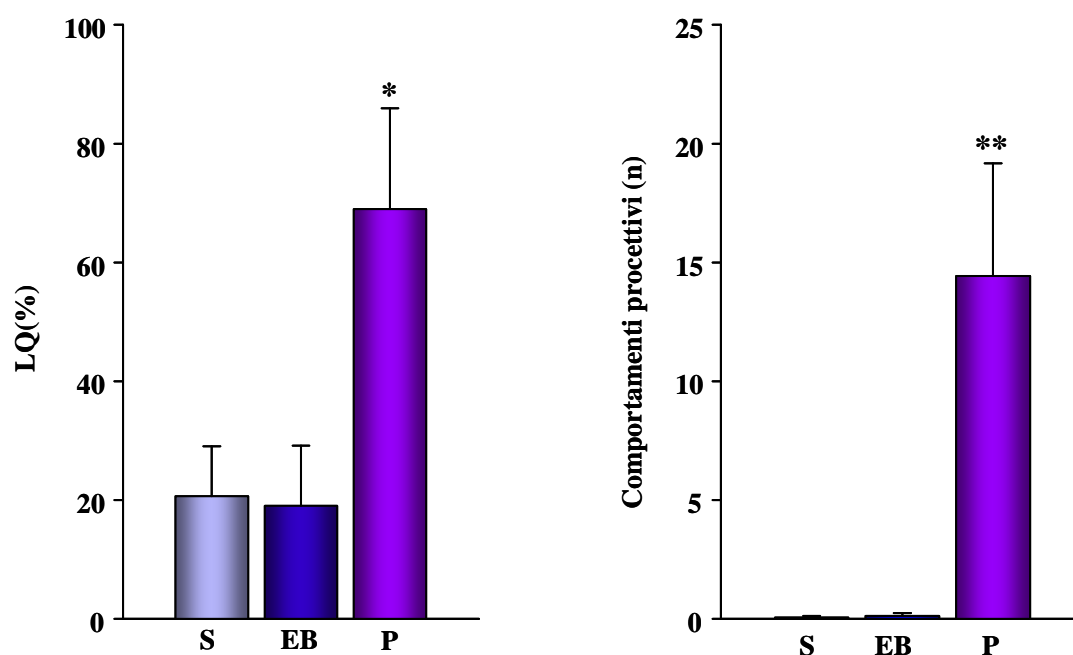
\* $p < 0,05$  vs Controlli

Come mostra la Fig. 21, il test del paced mating, che permette di studiare in maniera specifica la motivazione sessuale femminile, conferma i risultati ottenuti nel non-paced mating. Infatti, il trattamento cronico con EE-LNG non influenza il quoziente di lordosi, mentre riduce drasticamente i comportamenti procettivi, che risultano quasi assenti nelle femmine trattate rispetto ai controlli ( $-98\%$ ,  $p<0,05$ ).



**Figura 21** Effetto del trattamento cronico con contraccettivi orali sul comportamento dei ratti femmina nel test del paced mating. I valori nei grafici rappresentano il quoziente di lordosi espresso in percentuale e il numero dei comportamenti procettivi. I dati sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo. \* $p<0,05$  vs Controlli

Poiché il trattamento con contraccettivi orali riduce le concentrazioni plasmatiche di estradiolo e progesterone (Rapkin et al., 2006), abbiamo valutato se la somministrazione di questi due ormoni potesse ripristinare l'attività sessuale nelle femmine trattate con EE-LNG. La somministrazione di estradiolo benzoato ai ratti femmina trattati cronicamente con EE-LNG 48 ore prima del test non influenza il comportamento sessuale degli animali, mentre il progesterone, 4 ore prima del test, determina un aumento significativo sia del quoziente di lordosi (+234%,  $p < 0,05$ ) sia dei comportamenti procettivi (+230%,  $p < 0,001$ ) rispetto agli animali trattati con il solvente (Fig. 22).

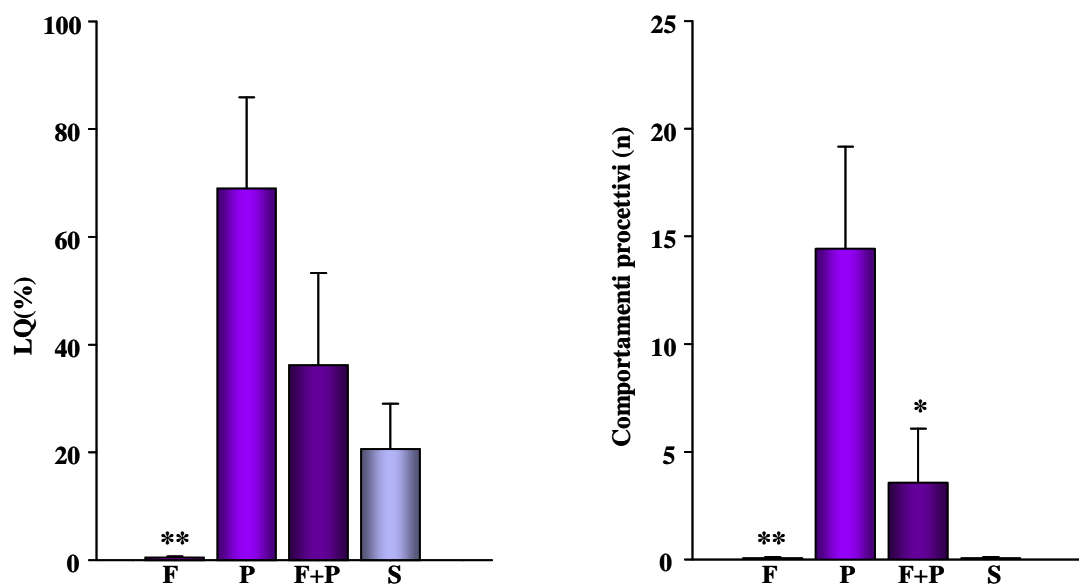


**Figura 22** Effetto della somministrazione di estradiolo e progesterone ai ratti femmina trattati con EE-LNG sul comportamento nel test del paced mating.

I valori nei grafici rappresentano il quoziente di lordosi espresso in percentuale e il numero dei comportamenti procettivi. I dati sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo. S: solvente; EB: estradiolo benzoato; P: progesterone.

\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  vs S

Per valutare il ruolo dell'allopregnanolone sull'aumento dei comportamenti recettivi e procettivi indotto dalla somministrazione di progesterone nei ratti femmina trattati cronicamente con EE-LNG, ho somministrato la finasteride che inibisce la sintesi di allopregnanolone bloccando l'enzima 5 $\alpha$ -reduttasi. Come mostra la Fig. 23, la somministrazione della finasteride da sola, 6 ore prima del test, determina una riduzione significativa sia del quoziente di lordosi sia dei comportamenti procettivi rispetto agli animali trattati con il progesterone. La somministrazione di finasteride 2 ore prima del progesterone, invece, determina una riduzione non significativa del quoziente di lordosi (-48%), mentre riduce drasticamente i comportamenti procettivi (-75%,  $p < 0,05$ ), rispetto al trattamento con il solo progesterone.



**Figura 23** Effetto del trattamento cronico con EE-LNG sul comportamento dei ratti femmina nel test del paced mating. I valori nei grafici rappresentano il quoziente di lordosi espresso in percentuale e il numero dei comportamenti procettivi. I dati sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo.

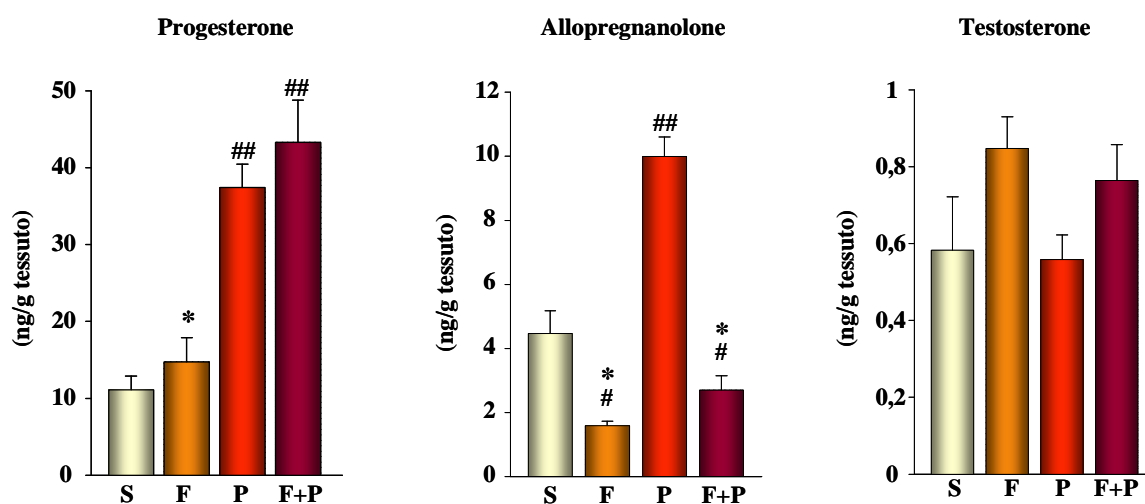
F: finasteride; P: progesterone; F+P: finasteride + progesterone; S: solvente.

\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  vs P



***Effetto della somministrazione di progesterone e finasteride sulle concentrazioni cerebrocorticali degli steroidi neuroattivi nei ratti trattati cronicamente con EE-LNG***

Come mostra la Fig. 24, la somministrazione di progesterone 4 ore prima del sacrificio ai ratti trattati cronicamente con EE-LNG, che induce un aumento significativo dei comportamenti procettivi nel test del paced mating, induce anche un contestuale aumento significativo delle concentrazioni di progesterone (+ 237%,  $p < 0,0005$ ) e di allopregnanolone (+ 105%,  $p < 0,0005$ ) nella corteccia cerebrale degli animali, rispetto ai ratti trattati con il solvente, mentre non modifica i livelli cerebrali di testosterone.



**Figura 24.** Effetto della somministrazione di progesterone e finasteride sulle concentrazioni cerebrocorticali degli steroidi neuroattivi nei ratti trattati cronicamente con EE-LNG. Gli animali sono stati trattati una volta al giorno con la combinazione di EE (0,030 mg, o.s.) e LNG (0,125 mg, o.s.) per 4 settimane e sacrificati per la misurazione delle concentrazioni cerebrocorticali di progesterone, allopregnanolone e testosterone dopo trattamento con: finasteride (F) 6 ore prima del sacrificio, progesterone (P) 4 ore prima del sacrificio, finasteride + progesterone (F+P), o solvente (S). I valori sono espressi in ng di steroide per grammo di tessuto e sono la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo. \* $p < 0,0005$  vs P, # $p < 0,05$  vs S e ## $p < 0,0005$  vs S

La somministrazione di finasteride, da sola o in combinazione con il progesterone, che in entrambi i casi induce una riduzione della motivazione sessuale, come atteso, non influenza le concentrazioni cerebrocorticali di progesterone degli animali trattati con EE-LNG, mentre induce una significativa riduzione delle concentrazioni di allopregnanolone sia rispetto agli animali trattati con il solo progesterone (-65% F e -70% F+P), sia rispetto ai ratti ai quali è stato somministrato il solvente (-83% F e -39% F+P), e un aumento, anche se non significativo, dei livelli di testosterone.

## DISCUSSIONE

Numerose ricerche hanno dimostrato che le concentrazioni cerebrali e plasmatiche dell'allopregnanolone, si modificano durante le diverse fasi del ciclo (Genazzani et al., 1998), aumentano drasticamente durante la gravidanza (Concas et al., 1998) e si riducono notevolmente prima del parto (Concas et al., 1998) e durante la menopausa (Genazzani et al., 1998), cioè seguono le variazioni del suo precursore progesterone. Queste scoperte, insieme all'evidenza che l'allopregnanolone induce una potente azione sedativa, ansiolitica, antidepressiva ed è implicato nella regolazione del comportamento sessuale, suggeriscono che questo ormone potrebbe avere un ruolo rilevante nel controllo degli stati emozionali e del comportamento sessuale associati non solo alle suddette condizioni fisiologiche ma anche a trattamenti farmacologici che inducono marcate fluttuazioni nelle concentrazioni cerebrali e plasmatiche di questo steroide.

Come è noto dalla letteratura, i contraccettivi riducono la funzione endocrina dell'ovaio inibendo l'attività del sistema ipotalamo-ipofisi-gonadi e quindi la secrezione di LH (Luteinizing Hormone) e FSH (Follicle Stimulating Hormone). Coerentemente con questo meccanismo, il trattamento con i contraccettivi orali nel ratto riduce drasticamente i livelli plasmatici di LH per tutto il periodo del trattamento e di conseguenza la sintesi degli ormoni gonadici (Kuhl et al., 1984). In accordo con

questi risultati, il nostro laboratorio ha dimostrato che la somministrazione cronica della combinazione estroprogestinica EE-LNG, riduce marcatamente i livelli cerebrali e plasmatici di progesterone e del suo metabolita neuroattivo, allopregnanolone, nel ratto femmina (Follesa et al., 2002) e nella donna previene l'aumento di questi ormoni nella fase luteale del ciclo mestruale (Rapkin et al., 2006). Sulla base di queste evidenze, ho voluto approfondire ulteriormente tale ricerca studiando il comportamento animale, nell'ipotesi che tale trattamento, riducendo i livelli dei neurosteroidi, fosse in grado di modificare lo stato emozionale e il comportamento sessuale nel ratto femmina.

I miei risultati indicano che gli animali trattati per quattro settimane con EE-LNG e sottoposti al test dell' elevated plus-maze, un test comportamentale che si basa sulla naturale avversione dei ratti nei confronti di ambienti aperti e luminosi, mostrano un comportamento simile all'ansia. Infatti, nei ratti trattati con EE-LNG diminuiscono significativamente le percentuali sia degli ingressi nei bracci aperti (-62%) che del tempo totale passato in essi (-61%) rispetto agli animali di controllo trattati con il solvente. Le differenze nel comportamento tra gli animali trattati col solvente e quelli trattati con EE-LNG sembrano non essere dovute ad una differenza nell'attività locomotoria spontanea in quanto il numero delle entrate nei bracci chiusi risulta essere molto simile nei due gruppi sperimentali. Il comportamento ansioso osservato nei ratti femmina trattati con EE-LNG potrebbe essere correlato alla

diminuzione dei livelli cerebrali e plasmatici di allopregnanolone indotta dallo stesso trattamento (Follesa et al., 2002). Questa conclusione è in accordo con precedenti studi che mostrano come la riduzione delle concentrazioni dei neurosteroidi indotta dall'ovariectomia o dalla somministrazione di finasteride, un inibitore della 5 $\alpha$ -reduttasi (un enzima deputato alla sintesi di allopregnanolone), induce un comportamento simile all'ansia in animali sottoposti all'elevated plus-maze (Zimmerberg & Farley, 1993; Smith et al., 1998). Inoltre, sia il progesterone sia l'allopregnanolone, quando iniettati in peritoneo o direttamente nei ventricoli cerebrali, inducono effetti ansiolitici in diversi test sperimentali (Bitran et al., 1991; Wieland et al., 1991; Zimmerberg et al., 1994).

Diversi studi clinici hanno dimostrato che l'allopregnanolone è ridotto in individui con disturbi di panico, depressione o ansia, depressione post-partum (Pearson Murphy et al., 2001) e sindrome premestruale (Rapkin et al., 1997). Inoltre i farmaci antidepressivi, così come una dieta ricca di triptofano, aminoacido precursore della serotonina, aumentano le concentrazioni di steroidi neuroattivi, che modulano positivamente il recettore GABA<sub>A</sub>, nel plasma e nel liquido cefalorachidiano dell'uomo (Uzunova et al., 1998; Rasgon et al., 2001). Inoltre, i livelli dei neurosteroidi sono ridotti in modelli animali di depressione e di stress cronico (Guidotti et al., 2001; Pinna et al., 2004; Serra et al., 2000), e l'allopregnanolone

esplica un effetto antidepressivo in test comportamentali (Porsolt) utilizzati per valutare l'efficacia antidepressiva di un farmaco nell'animale (Khisti et al., 2000).

Ho quindi valutato se il trattamento cronico con EE-LNG modificasse il comportamento degli animali nel test di Porsolt. Durante il pretest, che ha la funzione di abituare gli animali all'ambiente in cui eseguiranno il test, in modo da eliminare la componente ansiosa e stressante dovuta all'immersione nell'acqua, non sono state osservate differenze tra i due gruppi sperimentali nel tempo di immobilità, nel tempo di climbing e di swimming. Il giorno del test, mentre gli animali di controllo hanno trascorso un tempo maggiore nella posizione d'immobilità, gli animali trattati cronicamente con EE-LNG, si sono comportati in maniera simile al pretest, trascorrendo un tempo significativamente minore immobili e mostrando un maggiore comportamento di climbing, rispetto agli animali di controlli. La riduzione del tempo d'immobilità misurato nelle femmine trattate rispetto ai controlli, insieme all'aumento del tempo trascorso nel comportamento di climbing, potrebbe indicare un effetto antidepressivo della combinazione EE-LNG. Tuttavia, secondo una recente interpretazione, la riduzione dell'immobilità e l'aumento del comportamento di climbing sembrano piuttosto suggerire, in accordo con i risultati ottenuti nell'elevated plus-maze, che il trattamento con EE-LNG induca uno stato simile all'ansia piuttosto che un effetto antidepressivo. Infatti, recentemente è stata suggerita una relazione tra il comportamento osservato nell'elevated plus-maze e quello osservato nel test di

Porsolt; in particolare, un tempo inferiore passato nei bracci aperti sembra essere associato a un ridotto tempo d'immobilità (Estanislau et al., 2010). I due test comportamentali sono diversi per molti aspetti, ma in entrambi è molto importante il modo in cui un animale reagisce agli stimoli avversi (bracci aperti e immersione nell'acqua), una caratteristica comune nella patologia ansiosa e depressiva. Pertanto, la relazione tra il tempo speso nei bracci aperti e l'immobilità nel Porsolt può essere spiegata da una generale reattività agli stimoli avversi. In accordo con questa conclusione, recentemente è stato dimostrato che l'isolamento sociale, una condizione che induce uno stato ansioso nell'animale (Serra et al., 2000), riduce il tempo d'immobilità e aumenta il tempo di climbing nel test di Porsolt (Pisu et al., 2011).

L'ipotesi che il trattamento cronico con EE-LNG non induca nell'animale un effetto antidepressivo è supportata anche dai risultati ottenuti sottoponendo gli animali al test di preferenza al saccarosio, in cui una ridotta preferenza al consumo di saccarosio rispetto all'acqua viene considerata come indice di anedonia, uno tra i principali sintomi di uno stato depressivo. Dai risultati non è emersa nessuna differenza tra gli animali trattati e il gruppo di controllo per quanto riguarda il consumo di saccarosio, suggerendo che il trattamento cronico con EE-LNG non induce anedonia, e quindi uno stato depressivo, confermando i risultati ottenuti nel test di Porsolt.

Il comportamento simile delle femmine trattate cronicamente con EE-LNG nel pretest e nel test del paradigma di Porsolt, potrebbe anche suggerire che questo trattamento induca deficit mnemonici, che impediscono agli animali di ricordare l'esperienza del pretest il giorno del test, e quindi il fatto che fosse inutile tentare la fuga; pertanto ho sottoposto gli animali al test del Morris Water Maze. Il trattamento cronico con EE-LNG non modifica l'apprendimento degli animali nel Morris water maze, in quanto gli animali trattati con EE-LNG imparano la posizione della piattaforma e la raggiungono con un tempo di latenza simile ai controlli. Il comportamento dei due gruppi sperimentali è simile anche nel probe trial, dimostrando che neanche i processi di memoria sono alterati dal trattamento cronico con la pillola. Tuttavia, nel probe trial ho riscontrato un aumento significativo del numero di ingressi nel quadrante della piattaforma (EST) e una riduzione della latenza alla piattaforma, anche se non significativa, degli animali trattati rispetto ai controlli. Questi dati però non rappresentano un indice di maggiore memoria, poiché sono accompagnati da un aumento significativo della distanza totale percorsa e della velocità; gli animali trattati con EE-LNG, quindi, raggiungono prima la piattaforma, ma percorrono un percorso più lungo e nuotano a una velocità maggiore. Questi risultati suggeriscono che anche nel Morris Water Maze la componente ansiosa possa giocare un ruolo importante, ma che il trattamento con EE-LNG non modifica le capacità di apprendimento e di memoria spaziale.



Poiché i contraccettivi inducono una marcata riduzione dei livelli di estrogeno e progesterone, questi risultati sono in contrasto con l'evidenza che gli ormoni gonadici hanno un importante ruolo in aree, come l'ippocampo, la corteccia frontale e l'amigdala, ampiamente coinvolte in processi cognitivi, di apprendimento e di memoria (Blurton-Jones et al., 1999; Gundlah et al., 2000; Osterlund et al., 2000 a,b; Register et al., 1998). Difatti, diversi studi dimostrano che le fluttuazioni ormonali fisiologiche nel ciclo mestruale, influenzano le funzioni cognitive quali la memoria verbale, ma anche la performance motoria (Phillips and Silverman, 1997; Broverman et al., 1981; Hampson and Kimura, 1988; Hausmann et al., 2000). È stato dimostrato che, durante le fasi preovulatoria e luteale, nelle quali i livelli di estrogeni sono alti, si ha una maggiore scioltezza verbale, una migliore abilità motoria manuale ma minore abilità spaziale; viceversa accade durante la mestruazione, periodo nel quale, i livelli di estrogeno sono bassi. Sulla base di queste evidenze si potrebbe ipotizzare che, i contraccettivi, farmaci che alterano le concentrazioni di estrogeno e progesterone, possano influenzare soltanto specifiche funzioni cognitive e non alterare la memoria spaziale. Infatti, studi effettuati sui ratti in fasi del ciclo estrale nelle quali i livelli di estradiolo sono alti e sottoposti al test del Morris water maze, non hanno dato risultati significativi (Berry et al., 1997; Stackman et al., 1997) o addirittura gli animali manifestavano delle prestazioni ridotte (Warren et al., 1997). D'altra parte, altri studi, effettuati su ratti femmina ovariectomizzati e trattati cronicamente con estrogeni,

dimostrano un miglioramento nella memoria spaziale in questi animali (Luine et al., 1998).

Poiché numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che gli ormoni gonadici, in particolare l'allopregnanolone, sono coinvolti nella modulazione di diversi comportamenti agonistici (Miczek et al., 2003), uno degli obiettivi della mia tesi è stato quello di valutare se il trattamento con EE-LNG potesse modificare il comportamento agonistico di questi animali. Per questo scopo è stato utilizzato il test del resident-intruder che permette di valutare i comportamenti agonistici (aggressività e dominanza) mostrati da un ratto residente nei confronti di un ratto intruso.

I risultati della mia tesi dimostrano che nel test del resident-intruder i ratti trattati con EE-LNG non mostrano un comportamento dominante, verso un conspecifico sconosciuto, che è stato introdotto nel loro territorio. Infatti, gli animali trattati con EE-LNG sono meno dominanti all'interno della coppia residente-intruso, come mostrato dal minore punteggio di dominanza (differenza tra comportamenti agonistici compiuti e comportamenti agonistici ricevuti). Inoltre, le femmine trattate con EE-LNG mostrano un minore comportamento agonistico rispetto agli animali di controllo. I comportamenti agonistici compiuti (inseguimento dell'intruso, comportamento dominante e attacchi) sono, infatti, significativamente minori, sia in durata sia in frequenza, in questi animali rispetto a quelli di controllo. Attraverso l'analisi dei singoli comportamenti si può osservare che le ratte trattate con EE-LNG

trascorrono un minore tempo, nei 15 minuti d'interazione, nell'inseguimento dell'intruso e in atteggiamenti di dominanza su di esso, quali le cure aggressive. Numerosi studi hanno dimostrato che i comportamenti agonistici osservati nei ratti femmina nel resident-intruder test sono paragonabili a comportamenti tipici della sindrome premenstruale e sono influenzati dalle fluttuazioni ormonali connesse al ciclo mestruale (Ho et al., 2011). Infatti, l'ovulazione e la successiva formazione del corpo luteo sembrano avere un ruolo fondamentale nel precipitare la sindrome premenstruale. In uno studio su un ampio gruppo di donne con sindrome premenstruale sono stati confrontati i sintomi durante cicli spontanei ovulatori e anovulatori e tutte le pazienti hanno mostrato un significativo peggioramento ciclico dei sintomi negativi premenstruali durante i cicli ovulatori, mentre nei cicli anovulatori i sintomi ciclici scomparivano, con conseguente attenuazione della sindrome premenstruale, suggerendo che essa è il risultato di fattori scatenanti prodotti dal corpo luteo (Hammarback and Backstrom, 1991). Pertanto il minore comportamento agonistico dei ratti femmina trattati cronicamente con EE-LNG, potrebbe essere in relazione alla soppressione dell'ovulazione e alla mancanza di fluttuazioni ormonali presenti nelle varie fasi del ciclo estrale indotta da questi farmaci (Ho et al., 2001). In accordo con questa conclusione, nelle donne con sindrome premenstruale, i contraccettivi sono efficaci nel ridurre i sintomi quali irritabilità, ansia, depressione, ipersensibilità e sintomi emotivi.

Dai risultati del resident-intruder test, è emersa inoltre una riduzione delle interazioni sociali da parte degli animali trattati con EE-LNG rispetto agli animali di controllo, in particolare una minore investigazione sociale e un maggior tempo speso in inattività sociale, che potrebbe essere indice di poco interesse da parte delle ratte trattate con EE-LNG, nei confronti degli intrusi. Questa riduzione dei comportamenti sociali potrebbe essere correlata alla riduzione delle concentrazioni di allopregnanolone indotta dal trattamento cronico con EE-LNG; infatti, ratti in estro, che hanno livelli elevati di allopregnanolone, mostrano più comportamenti sociali, rispetto ai ratti in diestro, con livelli ridotti di allopregnanolone. La rimozione delle ovaie, la fonte primaria del progesterone, riduce i comportamenti sociali dei ratti femmina, mentre la somministrazione di allopregnanolone ripristina questi comportamenti verso valori simili a quelli dei ratti in estro (Frye et al., 2008).

Ho voluto infine valutare se il trattamento cronico con EE-LNG modificasse il comportamento sessuale degli animali, e se queste eventuali modificazioni fossero correlate alla riduzione delle concentrazioni cerebrali di progesterone e allopregnanolone indotta da questi farmaci. Infatti, è noto dalla letteratura che l'assunzione cronica di contraccettivi orali è talvolta accompagnata a un calo dell'interesse e dell'attività sessuale nella donna (Alexander et al., 1990; Graham, 1993; Caruso et al., 2004; Wallwiener et al., 2010; Battaglia et al., 2011). Poiché non ci sono studi che documentino questo effetto negli animali, ho voluto studiare il

comportamento e la motivazione sessuale dei ratti trattati cronicamente con la combinazione estroprogestinica in due test comportamentali, il non-paced mating e il paced-mating. Nel primo test, la femmina è stata messa in accoppiamento con un maschio diverso per quattro notti consecutive, in una gabbia in cui il contatto con il maschio è sempre possibile; la scelta di ripetere l'esperimento per 4 notti è stata fatta in quanto gli animali trattati con EE-LNG non mostrano un ciclo estrale regolare, con le 4 fasi distinte, bensì mostrano quasi sempre uno striscio vaginale in metestro o diestro. Dai miei risultati si evince che il trattamento cronico con EE-LNG non altera la recettività femminile, infatti il quoziente di lordosi è simile nei due gruppi. Al contrario, questo trattamento influenza in maniera specifica la motivazione sessuale dei ratti femmina trattati con EE-LNG, come dimostrato dalla significativa riduzione dei comportamenti procettivi (-64%). Nel secondo test invece, il paced mating, gli animali sono separati in due compartimenti da una parete avente un foro di una dimensione tale da permettere il passaggio del ratto femmina ma non del ratto maschio, per cui il ratto femmina può allontanarsi dal maschio e pertanto decidere il ritmo dell'accoppiamento; in questo modo è stato possibile valutare l'aspetto motivazionale della femmina. I miei risultati confermano quelli ottenuti nel non-paced mating. Infatti, il trattamento cronico con EE-LNG non influenza il quoziente di lordosi, mentre riduce drasticamente i comportamenti procettivi, che risultano quasi assenti nelle femmine trattate rispetto ai controlli (-98%). Da questi risultati

emerge quindi che il trattamento cronico con EE-LNG non riduce la disponibilità delle femmine all'accoppiamento, come mostrato dal quoziente di lordosi inalterato, ma riduce drasticamente la motivazione sessuale e la frequenza nell'iniziare e promuovere l'approccio sessuale con il partner, evidente nella riduzione della procettività in entrambi i test comportamentali, ma soprattutto nel test del paced mating in cui è la femmina a controllare il ritmo dell'accoppiamento.

I miei risultati sono in accordo con l'evidenza che nella donna il trattamento cronico con una combinazione di estroprogestinici (Microgynon, etinilestradiolo 0.03 mg + levonorgestrel 0.15 mg) ha un effetto negativo su vari aspetti della sessualità, in particolare riduce l'interesse sessuale, la frequenza dell'attività sessuale e la frequenza nell'iniziare l'approccio sessuale con il partner (Graham et al., 1995). Al contrario, alcune donne che assumono questi farmaci riferiscono una maggiore frequenza nei rapporti sessuali (Wynn et al., 1975; Trussel and Westoff, 1980) o nessuna variazione, e in ogni caso gli effetti sono strettamente dipendenti dal dosaggio di estrogeni o progestinici presenti nella pillola e dalla modalità d'uso, continua o discontinua, quest'ultima a sua volta strettamente determinata dagli effetti negativi dei contraccettivi orali e associata ad una preponderanza di effetti negativi sulla sfera sessuale (Sanders et al., 2001). Mentre nelle donne gli effetti sul desiderio sessuale molto probabilmente rappresentano una combinazione complessa e peculiare di effetti biologici, psicologici e sociali, il modello animale da me utilizzato assume

una certa validità perché permette di escludere gli aspetti psicologici associati all'utilizzo della pillola e di osservarne esclusivamente gli effetti farmacologici.

I meccanismi che sottendono l'effetto dei contraccettivi sull'attività sessuale non sono ancora chiari; per quanto riguarda gli effetti positivi, potrebbero essere dati dalla rassicurazione psicologica che riduce la paura di una gravidanza inattesa, mentre gli effetti negativi sulla libido sembrano essere dovuti alla secchezza vaginale, data dalla riduzione della produzione di estrogeno, e alla riduzione delle concentrazioni di testosterone, che sembra giocare un ruolo centrale nel controllare il desiderio sessuale, determinati dalla pillola (Guida et al., 2004). In ogni caso, chiarire questi aspetti nella sfera sessuale dovuti all'utilizzo dei contraccettivi è di estrema importanza, dal momento che lo scopo primario del loro utilizzo è quello di avere la certezza di escludere una gravidanza senza avere ripercussioni negative sulle relazioni sessuali.

È stato chiaramente dimostrato che i neurosteroidi, in particolare l'allopregnanolone, rivestono un ruolo importante nel controllo del comportamento sessuale femminile e sono cruciali per il successo della riproduzione (Frye et al., 1998). In particolare, la somministrazione di allopregnanolone promuove il rilascio di gonadotropine, l'ovulazione e il comportamento riproduttivo. Inoltre, bloccando la sintesi di questo neurosteroido, mediante iniezione sistemica o centrale di un inibitore della 5 $\alpha$ -reduttasi, si riduce la lordosi e l'espressione della recettività sessuale rispetto

agli animali di controllo, trattati col solvente (Frye et al., 1998, Frye, 2011). Il progesterone, nell'ipotalamo, ha un'azione classica, attraverso i propri recettori (PR) intracellulari, nel promuovere il comportamento sessuale, mentre l'allopregnanolone sembra agire, con un'azione non genomica indipendente dai recettori per il progesterone, nell'area ventrale tegmentale (VTA) dove modula l'incidenza e la qualità dell'accoppiamento attraverso un'azione sui recettori GABA<sub>A</sub> (Frye et al., 2006). È stato quindi ipotizzato che alcuni degli effetti del progesterone sui comportamenti procettivi e recettivi nelle femmine possano essere mediati dall'allopregnanolone.

Il risultato che la somministrazione di EE-LNG per 4 settimane a ratti femmina diminuisce le concentrazioni cerebrocorticali di progesterone e allopregnanolone, suggerisce che la riduzione del comportamento sessuale, in particolare della motivazione sessuale, indotta da questo trattamento possa essere correlata ai ridotti livelli cerebrali di questi steroidi. In accordo con questa ipotesi, i miei esperimenti dimostrano che, nel test del Paced Mating, la somministrazione di estradiolo benzoato ai ratti femmina trattati cronicamente con EE-LNG 48 ore prima del test, non influenza il comportamento sessuale degli animali, mentre la somministrazione di progesterone, 4 ore prima del test, determina un aumento significativo sia del quoziente di lordosi sia dei comportamenti procettivi rispetto agli animali trattati con il solvente. Questo risultato sembra essere correlato alle



concentrazioni cerebrali del progesterone e del suo metabolita neuroattivo allopregnanolone, poiché la somministrazione di progesterone aumenta in modo molto marcato le concentrazioni cerebrali di questi ormoni, ripristinando quindi la drastica riduzione dei loro livelli indotta dal trattamento con EE-LNG.

Per valutare il ruolo dell'allopregnanolone sull'aumento dei comportamenti recettivi e procettivi indotto dalla somministrazione di progesterone nei ratti femmina trattati cronicamente con EE-LNG, ho utilizzato la finasteride, in inibitore della  $5\alpha$ -reduttasi. Somministrando questo composto, 2 ore prima del progesterone, è possibile inibire la sintesi di allopregnanolone. La somministrazione di finasteride in combinazione con il progesterone, riduce le concentrazioni cerebrali di allopregnanolone negli animali trattati con EE-LNG, senza modificare le concentrazioni di progesterone negli stessi animali. L'inibizione della sintesi cerebrale di allopregnanolone indotta dalla finasteride, determina inoltre una drastica riduzione dei comportamenti procettivi ma non modifica significativamente il quoziente di lordosi, confermando l'ipotesi che l'allopregnanolone è necessario per l'espressione dei comportamenti procettivi e la riduzione dei suoi livelli sembra essere responsabile dell'alterato comportamento sessuale indotto dal trattamento con EE-LNG.

Dai miei risultati non emerge, al contrario, un coinvolgimento del testosterone sulla riduzione del comportamento sessuale indotta dai contraccettivi orali. Le

concentrazioni cerebrali di questo ormone sono significativamente ridotte dal trattamento cronico con EE-LNG, in accordo con i dati in letteratura ottenuti sulle donne (Coenen et al., 1996). È noto che anche il testosterone è coinvolto nella motivazione sessuale femminile, infatti donne in premenopausa con cicli mestruali regolari (normali concentrazioni di estrogeno e progesterone) che hanno una carenza di androgeni per disfunzioni surrenali, presentano un ridotto desiderio sessuale, condizione revertita dal trattamento con androgeni (Guay, 2001). Tuttavia, l'evidenza che, il trattamento con finasteride, non riduce le concentrazioni di testosterone che tendono piuttosto ad aumentare, suggerisce un ruolo marginale di questo ormone nella drastica riduzione della motivazione sessuale femminile indotta dal trattamento con EE-LNG.

Anche i metaboliti del testosterone, il  $5\alpha$ -diidrotestosterone (DHT) e l'androstanediolo sembrano essere coinvolti nella regolazione del comportamento sessuale femminile. Mentre il DHT svolge un effetto negativo sull'espressione della recettività sessuale nei roditori (Erskine et al., 1983,1985,1989; Frye et al., 2001), la somministrazione di androstanediolo induce effetti diversi a seconda dell'area cerebrale interessata. In particolare, promuove la lordosi quando infuso nell'area ventromediale ipotalamica e i comportamenti procettivi se somministrato nel nucleus accumbens, mentre inibisce la recettività e promuove comportamenti aggressivi se somministrato nell'area preottica mediale (Sanchez Montoya et al., 2010). Dal

momento che l'enzima  $5\alpha$ -reduttasi, bloccato dalla finasteride, oltre che della sintesi di allopregnanolone, è responsabile anche della conversione del testosterone in DHT, da cui deriva poi l'androstanediolo, non si può escludere che anche l'alterazione delle concentrazioni di questi ormoni sia coinvolta in maniera specifica e diversa nel determinare l'effetto finale osservato sul comportamento sessuale degli animali indotto dalla somministrazione di finasteride.

In conclusione, i risultati della mia tesi dimostrano che il trattamento cronico con EE-LNG determina uno stato ansioso nell'animale, riduce il comportamento agonistico e la motivazione sessuale, effetto che sembra essere mediato dalla riduzione delle concentrazioni cerebrali di allopregnanolone indotta da questi farmaci, mentre non modifica le funzioni cognitive, quali l'apprendimento e la memoria spaziale. Ulteriori studi sono necessari al fine di chiarire i meccanismi molecolari tramite i quali tali effetti vengono esplicitati. Questi risultati possono fornire informazioni importanti sugli effetti dei contraccettivi a livello del sistema nervoso centrale che possono favorire un migliore utilizzo di questi farmaci.

## BIBLIOGRAFIA

- Alexander GM, Sherwin BB, Bancroft J, Davidson DW. Testosterone and sexual behavior in oral contraceptive users and nonusers: a prospective study. *Horm Behav* 24(3):388-402, 1990.
- Battaglia C, Battaglia B, Mancini F, Busacchi P, Paganotto MC, Morotti E, Venturoli S. Sexual Behavior and Oral Contraception: A Pilot Study. *J Sex Med*, 2011.
- Belelli D, Bolger MB, Gee KW. Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one. *Eur J Pharmacol* 166(2):325-9, 1989.
- Berry B, McMahan R, Gallagher M. Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behav Neurosci* 111(2):267-74, 1997.
- Bicikova M., Tallová J., Hill M, Krausova Z, Hampl R. Serum concentrations of some neuroactive steroids in women suffering from mixed anxiety-depressive disorder. *Neurochem Res* 25:1623-7, 2000.
- Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK. Anxiolytic effects of 3 alpha-hydroxy-5 alpha[beta]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABAA receptor. *Brain Res* 561(1):157-61, 1991.

- Bitzer J, Simon JA Current issues and available options in combined hormonal contraception. *Contraception* 84(4):342-56, 2011.
- Blurton-Jones MM, Roberts JA, Tuszyński MH. Estrogen receptor immunoreactivity in the adult primate brain: neuronal distribution and association with p75, trkA, and choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 405(4):529-42, 1999.
- Borgström A, Od lind V, Ekselius L, Sundström-Poromaa I. Adverse mood effects of combined oral contraceptives in relation to personality traits. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 141(2):127-30, 2008.
- Broverman DM, Vogel W, Klaiber EL, Majcher D, Shea D, Paul V. Changes in cognitive task performance across the menstrual cycle. *J Comp Physiol Psychol* 95(4):646-54, 1981.
- Caruso S, Agnello C, Intelisano G, Farina M, Di Mari L, Cianci A. Sexual behavior of women taking low-dose oral contraceptive containing 15 microg ethinylestradiol/60 microg gestodene. *Contraception* 69(3):237-40, 2004.
- Clipperton AE, Spinato JM, Chernetz C, Pfaff DW, Choleris E. Differential effects of estrogen receptor alpha and beta specific agonists on social learning of food preferences in female mice. *Neuropsychopharmacology* 33(10):2362-75, 2008.

- Coenen CM, Thomas CM, Borm GF, Hollanders JM, Rolland R. Changes in androgens during treatment with four low-dose contraceptives. *Contraception* 53(3):171-6, 1996.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13284-9, 1998.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29:547-569, 2005.
- Dhont M. History of oral contraception. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 15 Suppl 2:S12-8, 2010.
- Erskine MS. Effects of an anti-androgen and 5 alpha-reductase inhibitors on estrus duration in the cycling female rat. *Physiol Behav* 30:519-24, 1983.
- Erskine MS, MacLusky NJ, Baum MJ. Effect of 5 alpha-dihydrotestosterone on sexual receptivity and neural progesterone receptors in ovariectomized rats given pulsed estradiol. *Biol Reprod* 33(3):551-9, 1985.
- Erskine MS. Effect of 5 alpha-dihydrotestosterone and flutamide on the facilitation of lordosis by LHRH and naloxone in estrogen-primed female rats. *Physiol Behav* 45(4):753-9, 1989.

- Essirich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat. Neurosci* 1:563-571, 1998.
- Estanislau C, Ramos AC, Ferraresi PD, Costa NF, Pires de Carvalho HM, Batistela S. Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behavioural Processes* 86(1):46-51, 2010.
- Follesa P, Porcu P, Sogliano C, Cinus M, Biggio F, Mancuso L, Mostallino MC, Paoletti AM, Purdy RH, Biggio G, Concas A. Changes in GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma_2$  subunit gene expression induced by long-term administration of oral contraceptives in rats. *Neuropharmacology* 42:325-36, 2002
- Frye CA, Bayon LE, Pursnani NK, Purdy RH. The neurosteroids, progesterone and 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP, enhance sexual motivation, receptivity, and proceptivity in female rats. *Brain Res.* 808(1):72-83, 1998.
- Frye CA. The role of neurosteroids and nongenomic effects of progestins in the ventral tegmental area in mediating sexual receptivity of rodents. *Horm Behav* 40:226–33, 2001.
- Frye CA. The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Res Brain Res Rev* 37:201–22, 2001.

- Frye CA, Rhodes ME, Petralia SM, Walf AA, Sumida K, Edinger KL.  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -pregnan-20-one in the midbrain ventral area mediates social, sexual, and affective behaviors. *Neuroscience* 138:1007-1014, 2006.
- Frye CA, Paris JJ, Rhodes ME. Exploratory, anti-anxiety, social, and sexual behaviors of rats in behavioral estrus is attenuated with inhibition of  $3\alpha$ ,  $5\alpha$ -THP formation in the midbrain ventral tegmental area. *Behav Brain Res* 193(2):269-76, 2008.
- Frye CA. Novel substrates for, and sources of, progestogens for reproduction. *J Neuroendocrinol* 23(11):961-73, 2011.
- Genazzani AR, Palumbo MA, de Micheroux AA, Artini PG, Criscuolo M, Ficarra G, Guo AL, Benelli A, Bertolini A, Petraglia F, et al. Evidence for a role for the neurosteroid allopregnanolone in the modulation of reproductive function in female rats. *Eur J Endocrinol* 133(3):375-80, 1995.
- Genazzani AR, Petraglia F, Bernardi F, Casarosa E, salvestroni C, Tonetti A, Nappi RE, Luisi S, Palumbo M, Purdy RH, Luisi M. Circulating levels of allopregnanolone in humans: gender, age, and endocrine influences. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2099-103, 1998.
- Genazzani AD, Luisi M, Malavasi B, Strucchi C, Luisi S, Casarosa E, Bernardi F, Genazzani AR, Petraglia F. Pulsatile secretory characteristics of



- allopregnanolone, a neuroactive steroid, during the menstrual cycle and in amenorrheic subjects. *Eur J Endocrinol* 146:347-56, 2002.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80(2):84-97, 2007.
  - Graham CA, Sherwin BB. The relationship between mood and sexuality in women using an oral contraceptive as a treatment for premenstrual symptoms. *Psychoneuroendocrinology* 18(4):273-81, 1993.
  - Graham CA, Ramos R, Bancroft J, Maglaya C, Farley TM. The effects of steroidal contraceptives on the well-being and sexuality of women: a double-blind, placebo-controlled, two-centre study of combined and progestogen-only methods. *Contraception* 52(6):363-9, 1995.
  - Grant EC, Mackintosh JH. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. *Behaviour* Vol. 21, No. 3/4 pp. 246-259, 1963.
  - Guay AT. Decreased testosterone in regularly menstruating women with decreased libido: a clinical observation. *J Sex Marital Ther* 27(5):513-9, 2001.
  - Guida M, Di Spiezio Sardo A, Bramante S, Sparice S, Acunzo G, Tommaselli GA, Di Carlo C, Pellicano M, Greco E, Nappi C. Effects of two types of hormonal contraception--oral versus intravaginal--on the sexual life of women and their partners. *Hum Reprod* 20(4):1100-6, 2004.

- Guidotti A, Dong E, Matsumoto K, Pinna G, Rasmusson AM, Costa E. The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5[alpha]-dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):110-5, 2001.
- Gundlah C, Kohama SG, Mirkes SJ, Garyfallou VT, Urbanski HF, Bethea CL. Distribution of estrogen receptor beta (ERbeta) mRNA in hypothalamus, midbrain and temporal lobe of spayed macaque: continued expression with hormone replacement. *Brain Res Mol Brain Res* 76(2):191-204, 2000.
- Hammarbäck S, Ekholm UB, Bäckström T. Spontaneous anovulation causing disappearance of cyclical symptoms in women with the premenstrual syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 125(2):132-7, 1991.
- Hampson E, Kimura D. Reciprocal effects of hormonal fluctuations on human motor and perceptual-spatial skills. *Behav Neurosci.* 102(3):456-9, 1988.
- Hardy DF. Sexual behavior in continuously cycling rats. *Behaviour* 41(3):288-97, 1972.
- Hausmann M, Slabbekoorn D, Van Goozen SH, Cohen-Kettenis PT, Güntürkün O. Sex hormones affect spatial abilities during the menstrual cycle. *Behav Neurosci* 114(6):1245-50, 2000.

- Henderson JA, Shively CA. Triphasic oral contraceptive treatment alters the behavior and neurobiology of female cynomolgus monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 29(1):21-34, 2004.
- Herzberg BN, Draper KC, Johnson AL, Nicol GC. Oral contraceptives, depression, and libido. *British Medical Journal* 3:495-500, 1971.
- Heuser I, Deuschle M, Luppä P, Schweiger U, Standhardt H, Weber B. Increased diurnal plasma concentrations of dehydroepiandrosterone in depressed patients. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3130-3,1998.
- Ho HP, Olsson M, Westberg L, Melke J, Eriksson E. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: an animal model of premenstrual irritability? *Neuropsychopharmacology* 24(5):502-10, 2001.
- Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84: 8215-8219, 1987.
- Joffe H, Cohen LS, Harlow BL. Impact of oral contraceptive pill use on premenstrual mood: predictors of improvement and deterioration. *Am J Obstet Gynecol* 189(6):1523-30, 2003.
- Kahn LS, Halbreich U. Oral contraceptives and mood. *Expert Opin Pharmacother* 2(9):1367-82, 2001.

- Khisti RT, Chopde CT, Jain SP. Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one in mice forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 67:137-43, 2000.
- Kuhl H, Weber W, Mehlig W, Sandow J, Taubert HD. Time- and dose-dependent alterations of basal and LH-RH-stimulated LH-release during treatment with various hormonal contraceptives. *Contraception* 30:467-82, 1984.
- Kurshan N, Neill Epperson C. Oral contraceptives and mood in women with and without premenstrual dysphoria: a theoretical model. *Arch Womens Ment Health* 9(1):1-14, 2006.
- Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA. Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trend Pharmacol Sci* 16: 295-303, 1995.
- Le Goascogne C, Robel P, Gouezou M, Sananes N, Baulieu EE, Waterman M. *Science* 237: 1212-1214, 1987.
- Lobo RA, Stanczyk FZ. New knowledge in the physiology of hormonal contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 170(5 Pt 2):1499-507, 1994.
- Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav* 34(2):149-62, 1998.

- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232(4753): 1004-7, 1986.
- McEwen BS. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity; *Trends Pharmacol Sci* 12(4):141-7, 1991.
- Mendelson WB, Martin JV, Perlis M, Wagner R, Majewska MD, Paul SM. Sleep induction by an adrenal steroid in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 93(2):226-9, 1987.
- Miczek KA, Fish EW, De Bold JF. Neurosteroids, GABAA receptors, and escalated aggressive behavior. *Horm Behav* 44(3):242-57, 2003.
- Monteleone P, Luisi S, Tonetti A, Bernardi F, Genazzani AD, Luisi M, Petraglia F, Genazzani AR. Allopregnanolone concentrations and premenstrual syndrome. *Eur J Endocrinol* 142:269-73, 2000.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11(1):47-60, 1984.
- Oinonen KA, Mazmanian D. To what extent do oral contraceptives influence mood and affect. *J Affect Disord* 70(3):229-40, 2002.
- Osterlund MK, Grandien K, Keller E, Hurd YL. The human brain has distinct regional expression patterns of estrogen receptor alpha mRNA isoforms derived from alternative promoters. *J Neurochem* 75(4):1390-7, 2000.

- Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *Faseb J* 6:2311-22, 1992.
- Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LA. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front Neuroendocrinol* 30(3):343-57, 2009.
- Pearson Murphy BE, Steinberg SI, Hu F-Y, Allison CM. Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: elevated levels of 5alpha-dihydroprogesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5981-7, 2001.
- Phillips K, Silverman I. Differences in the relationship of menstrual cycle phase to spatial performance on two- and three-dimensional tasks. *Horm Behav* 32(3):167-75, 1997.
- Pinna G, Agis-Balboa RC, Doueiri MS, Guidotti A, Costa E. Brain neurosteroids in gender-related aggression induced by social isolation. *Crit Rev Neurobiol* 16(1-2):75-82, 2004.
- Pisu MG, Dore R, Mostallino MC, Loi M, Pibiri F, Mameli R, Cadeddu R, Secci PP, Serra M. Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. *Behav Brain Res* 222:73-80, 2011.

- Porcu P, Sogliano C, Cinus M, Purdy RH, Biggio G, Concas A. Nicotine-induced changes in cerebrocortical neuroactive steroids and plasma corticosterone concentrations in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 74(3):683-90, 2003.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers BD, Ymer S, Kettenham H, Schofield PR, Seeburg PH. Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338:582-585, 1989.
- Purdy RH, Moore PH Jr, Rao PN, Hagino N, Yamaguchi T, Schmidt P, Rubinow DR, Morrow AL, Paul SM. Radioimmunoassay of 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one in rat and human plasma. *Steroids* 55(7):290-6, 1990.
- Rapkin AJ, Morgan M, Goldman L, Brann DW, Simone D, Mahesh VB. Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Obstet Gynecol* 90(5):709-14, 1997.
- Rapkin AJ, Morgan M, Sogliano C, Biggio G, Concas A. Decreased neuroactive steroids induced by combined oral contraceptive pills are not associated with mood changes. *Fertil Steril* 85(5):1371-8, 2006.
- Rapkin AJ, Biggio G., Concas A. Oral contraceptives and neuroactive steroids. *ScienceDirect* 84:628-634, 2006.
- Rasgon N, Serra M, Biggio G, Pisu MG, Fairbanks L, Tanavoli S, Rapkin A. Neuroactive steroid-serotonergic interaction: responses to an intravenous L-

- tryptophan challenge in women with premenstrual syndrome. *Eur J Endocrinol* 145(1):25-33, 2001.
- Register TC, Shively CA, Lewis CE. Expression of estrogen receptor alpha and beta transcripts in female monkey hippocampus and hypothalamus. *Brain Res* 788(1-2):320-2, 1998.
  - Rodgers CH. Timing of sexual behavior in the female rat. *Endocrinology* 86(5):1181-3, 1970.
  - Sanchez Montoya EL, Hernández L, Barreto-Estrada JL, Ortiz JG, Jorge JC. The testosterone metabolite 3 $\alpha$ -diol enhances female rat sexual motivation when infused in the nucleus accumbens shell. *J Sex Med* 7:3598-609, 2010.
  - Sanders SA, Graham CA, Bass JL, Bancroft J. A prospective study of the effects of oral contraceptives on sexuality and well-being and their relationship to discontinuation. *Contraception* 64:51-8, 2001.
  - Schwartz SM. Effects of constant bright illumination on reproductive processes in the female rat. *Neurosci Biobehav Rev* 6(3):391-406, 1982.
  - Segebladh B, Borgström A, Odlanda V, Bixo M, Sundström-Poromaa I. Prevalence of psychiatric disorders and premenstrual dysphoric symptoms in patients with experience of adverse mood during treatment with combined oral contraceptives. *Contraception* 79:50–55, 2009.



- Serra M, Pisu MG, Littera M, Papi G, Sanna E, Tuveri F, Usala L, Purdy RH, Biggio G. Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA (A) receptor function in rat brain. *J Neurochem* 75(2):732-40, 2000.
- Smith SS, Gong QH, Li X, Moran MH, Bitran D, Frye CA, Hsu FC. Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABAA-gated current and increases the GABAA receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety. *J Neurosci* 18:5275-84, 1998.
- Stackman RW, Blasberg ME, Langan CJ, Clark AS. Stability of spatial working memory across the estrous cycle of Long-Evans rats. *Neurobiol Learn Mem* 67(2):167-71, 1997.
- Ströhle A, Romeo E, Di Michele F, Pasini A, Yassouridis A, Holsboer F, Rupprecht R. GABA<sub>A</sub> receptor modulatory neuroactive steroid composition in panic disorder and during paroxetine treatment. *Am J Psychiatry* 159(1):145-7, 2002.
- Trussell J, Westoff CF. Contraceptive practice and trends in coital frequency. *Fam Plann Perspect* 12(5):246-9, 1980.

- Ukena K, Usui M, Kohchi C, Tsutsui K. Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology* 139(1):137-47, 1998.
- Uzunova V, Sheline Y, Davis JM, Rasmusson A, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A. Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3239-44, 1998.
- Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1(2):848-58, 2006.
- Wallwiener M, Wallwiener LM, Seeger H, Mueck AO, Zipfel S, Bitzer J, Wallwiener C. Effect of sex hormones in oral contraceptives on the female sexual function score: a study in German female medical students. *Contraception* 82:155-159, 2010.
- Wang M, Seippel L, Purdy RH, Backstrom T. Relationship between symptom severity and steroid variation in women with premenstrual syndrome: study on serum pregnenolone, pregnenolone sulfate, 5 alpha-pregnane-3, 20-dione and 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one. *J Clin Endocrinol Metab* 81(3):1076-82, 1996.
- Warren SG, Juraska JM. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci* 111(2):259-66, 1997.

- Wieland S, Lan NC, Mirasedeghi S, Gee KW. Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one. *Brain Res* 565:263-8, 1991.
- Williams CL, Stancel GM. Estrogeni e Progestinici. In: Hardman J. G., Limbird L. F., Molinoff P. B., Ruddon R. W.; Goodman-Gilman A. eds. *Le basi farmacologiche della terapia* (nona edizione) McGraw Hill, 1371-1399, 1997.
- Wynn V, Adams PW, Folkard J, Seed M. Tryptophan, depression and steroidal contraception. *J Steroid Biochem* 6(6): 965–970, 1975.
- Zimmeberg B, Farley MJ. Sex differences in anxiety behavior in rats:role of gonadal hormones. *Physiol Behav* 54:1119-24, 1993.
- Zimmeberg B, Brunelli SA, Hofer MA. Reduction of rat pup ultrasonic vocalizations by the neuroactive steroid allopregnanolone. *Pharmacol Biochem Behav* 47:735-8, 1994.