



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

NEUROSCIENZE

Ciclo **XXIII**

TITOLO TESI

La separazione dalla prole reverte le modificazioni nell'espressione di BDNF, proteina Arc, spine dendritiche, LTP e neurogenesi osservate durante la gravidanza e dopo il parto

Settore scientifico disciplinare di afferenza:

BIO 14

Presentata da: Pietro Paolo Secci

Coordinatore Dottorato Prof. Alessandra Concas

Relatore Prof. Giovanni Biggio

Esame finale anno accademico 2009 – 2010

Indice

<i>La gravidanza</i>	<i>1</i>
<i>Obiettivi</i>	<i>7</i>
<i>Introduzione</i>	<i>10</i>
• <i>Ormoni steroidei</i>	<i>11</i>
• <i>Fattori neurotrofici</i>	<i>19</i>
• <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>	<i>32</i>
• <i>LTP e plasticità sinaptica</i>	<i>43</i>
• <i>Spine dendritiche</i>	<i>49</i>
• <i>Neurogenesi</i>	<i>59</i>
<i>Materiali e Metodi</i>	<i>65</i>
<i>Risultati</i>	<i>80</i>
<i>Discussione</i>	<i>111</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>120</i>

La gravidanza

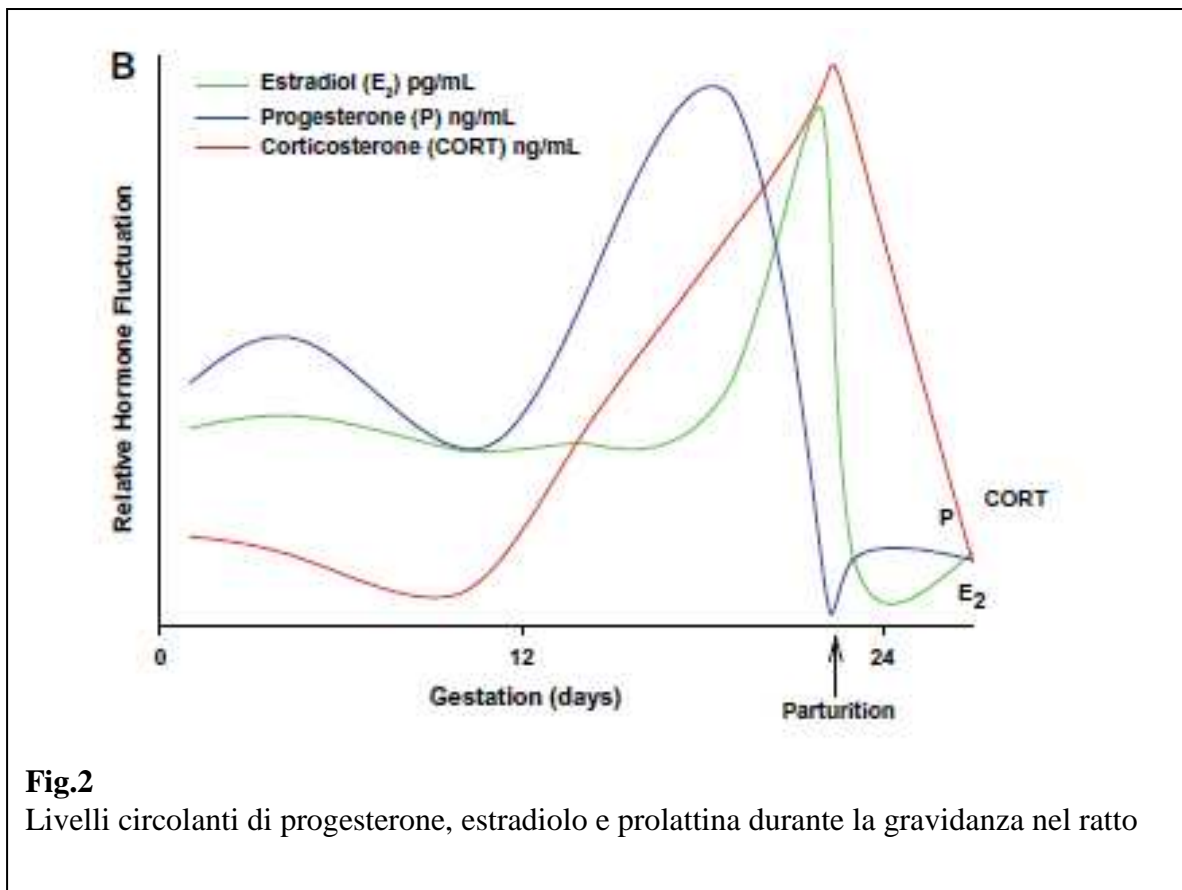
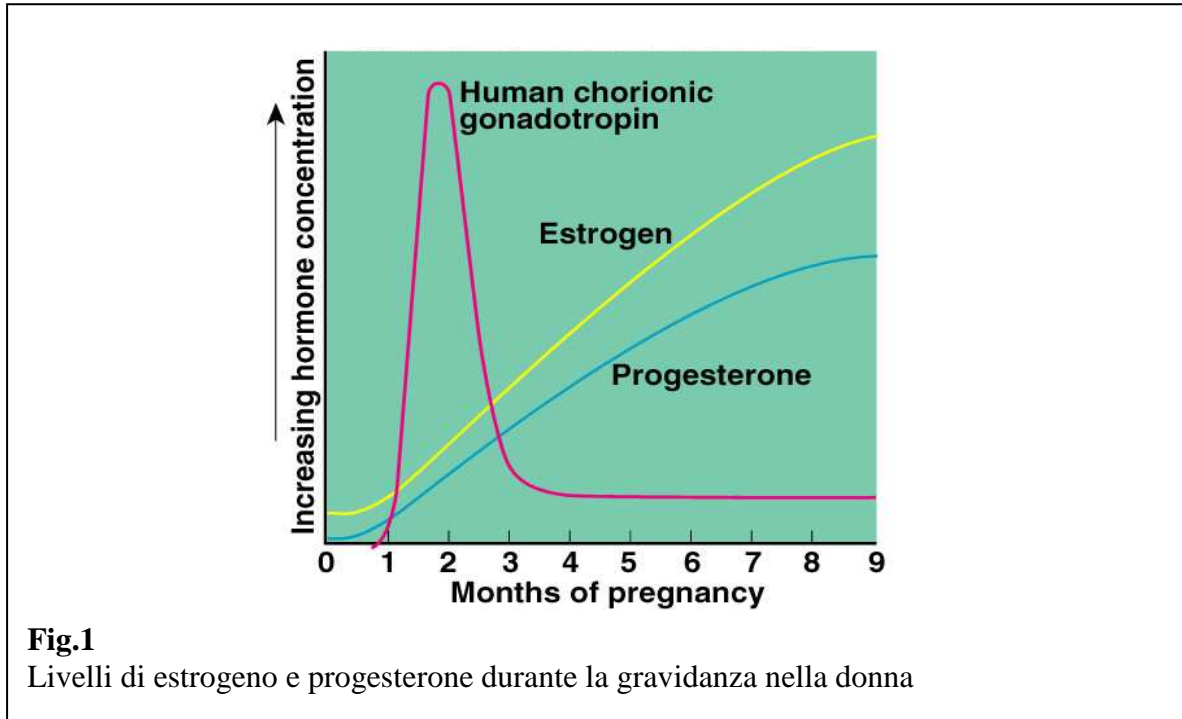
La gravidanza

La gravidanza rappresenta il soddisfacimento del bisogno di maternità che tutte le donne, chi più chi meno, manifestano nel corso della loro esistenza, e identifica perciò un periodo personalissimo della vita femminile che va dal momento del concepimento a quello del parto. Dal punto di vista fisiologico è caratterizzata dall'aumento di numerosi processi metabolici, mentre dal punto di vista psicologico è caratterizzata da situazioni di conflitto, ansia e frustrazioni; tali emozioni cominciano a manifestarsi soprattutto a partire dal terzo mese, quando la donna inizia a prendere coscienza della sua nuova condizione, il fisico comincia a mutare e i sentimenti diventano contrastanti, al punto che talvolta amore e odio si alternano nei confronti del nascituro. Nel secondo trimestre la donna comincia a percepire la presenza del bambino dentro se stessa, le emozioni iniziano a stabilizzarsi, essa dimostra maggiore fiducia in se stessa e notevole attivismo, di solito orientato verso i preparativi per il nascituro. Nel terzo trimestre compare spesso un certo grado di apatia, svogliatezza, affaticamento; la donna tende nuovamente a fare maggior affidamento sul marito o sui familiari nello svolgimento delle varie incombenze domestiche e nel prendere decisioni. Nelle ultime settimane, talvolta, ricompare l'ansia soprattutto nei confronti del parto.

Questi sbalzi d'umore possono persistere anche dopo la nascita del bambino. Infatti durante la gravidanza i molteplici adattamenti fisiologici che avvengono nella madre hanno un unico scopo, quello cioè di ottimizzare la crescita e lo sviluppo fetale, di proteggere il feto dalle condizioni esterne, di indurre il parto e di garantire al bambino adeguate cure materne.

Durante la gravidanza il metabolismo della madre cambia radicalmente, in quanto le energie devono essere indirizzate principalmente verso il feto e quelle in esubero vengono conservate sotto forma di tessuto adiposo come preparazione ad una maggiore richiesta di energie in vista dell'allattamento. Durante tutto questo periodo il sistema neuroendocrino subisce notevoli variazioni: i livelli plasmatici di estrogeno e progesterone aumentano notevolmente durante la gravidanza e diminuiscono poi bruscamente in prossimità del parto

[Fig. 1, 2, 3], momento a cui corrisponde un aumento dei livelli dell'ormone ossitocina e successivamente, durante l'allattamento, dell'ormone prolattina.



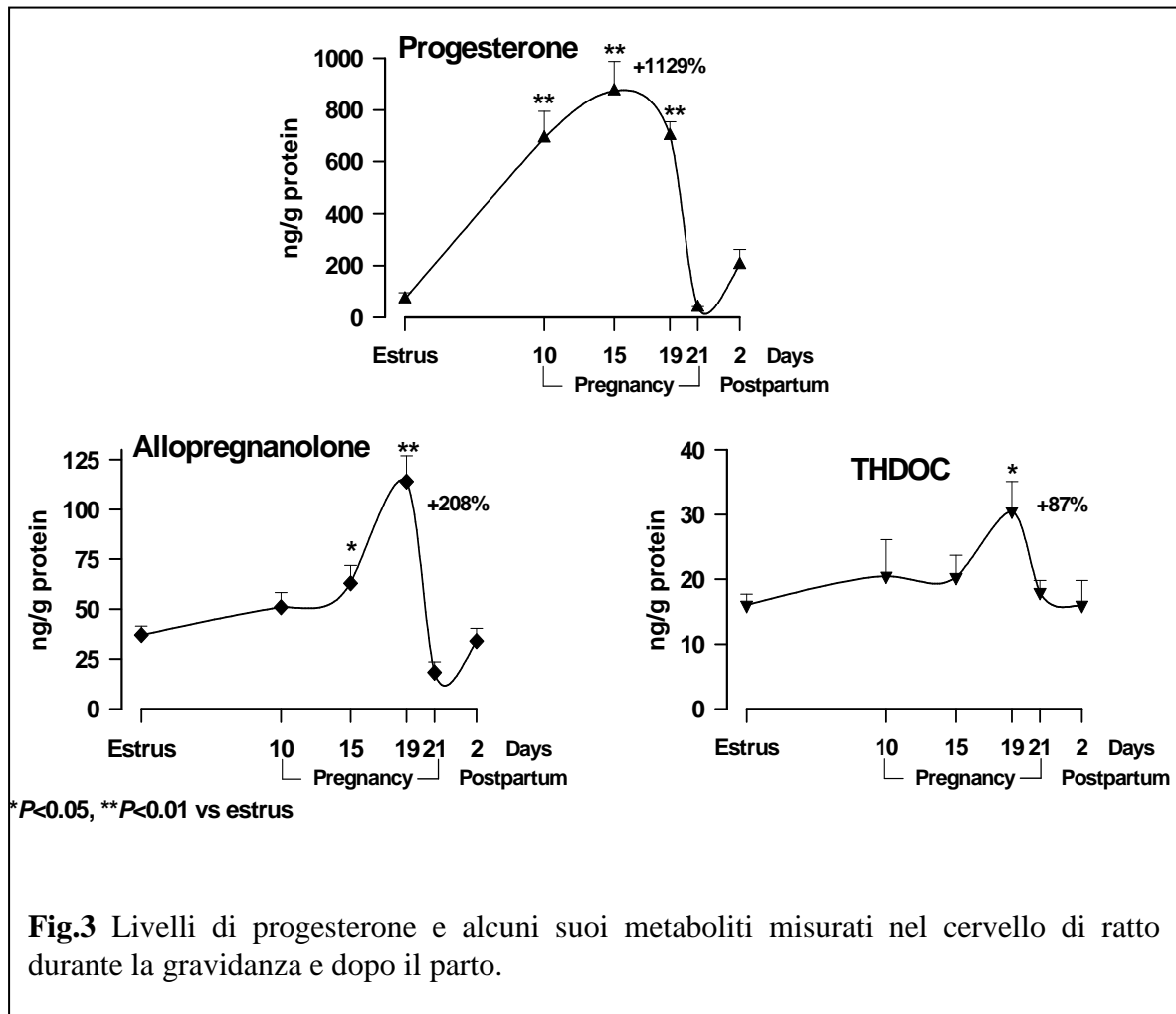


Fig.3 Livelli di progesterone e alcuni suoi metaboliti misurati nel cervello di ratto durante la gravidanza e dopo il parto.

La gravidanza, il parto e il periodo post-partum sono dunque importanti condizioni fisiologiche durante le quali il cervello femminile è sottoposto a notevoli modificazioni funzionali e morfologiche necessarie per adattare il comportamento alla maternità (*Brunton e Russell, 2008; Pawluski et al., 2009*). Alcuni cambiamenti nelle proprietà dei neuroni come la variazione dell'eccitabilità neuronale, l'incremento o il decremento nella sintesi e nel rilascio di differenti neurotrasmettitori, neuropeptidi e ormoni osservati durante la gravidanza e/o l'insorgenza del comportamento materno sono fenomeni selettivamente associati a modificazioni funzionali e morfologiche di specifiche popolazioni neuronali (*Brunton e Russell, 2008, review*).

Ormai è generalmente accettato che i neuroni del cervello femminile durante la gravidanza e la maternità differiscono per forma e funzionalità da quelli delle femmine

vergini durante la fase di estro (*Kinsley et al., 2006; Rasia-Filho et al., 2004; Brusco et al., 2008*). Dato che le concentrazioni plasmatiche e cerebrali degli ormoni variano drasticamente durante la gravidanza, il parto e il periodo post partum, numerosi studi hanno cercato di chiarire se queste variazioni temporanee siano anche correlate alle variazioni funzionali e morfologiche dei neuroni osservate in specifiche aree cerebrali in queste stesse condizioni (*Pawluski et al., 2009, review*). Questi studi hanno permesso di dimostrare che, nelle femmine di ratto, gli ormoni estrogeno e progesterone, insieme a prolattina, ossitocina, vasopressina e altri peptidi endogeni svolgono un ruolo cruciale nella modulazione della plasticità neuronale durante la gravidanza, il parto e nelle prime 3-4 settimane dopo il parto (*Pawluski et al., 2009, review*).

Il fattore trofico Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF) costituisce un mediatore chiave della plasticità neuronale, capace di regolare la composizione sinaptica, il rilascio di neurotrasmettitori, l'eccitabilità neuronale, la neurogenesi e lo sviluppo delle spine dendritiche nel sistema nervoso adulto. Infatti sia l'aumento che la riduzione nella secrezione cerebrale di questa proteina sono funzionalmente legati ai principali fenomeni di adattamento neuronale in differenti aree cerebrali come trofismo o ipotrofismo, neurogenesi, LTP, aumento delle spine dendritiche osservati in conseguenza ad arricchimento ambientale, comportamento motorio o interazioni sociali (*Nithianantharajah e Hannan, 2006, review; Boger et al., 2010; Fredriksson et al., 2010; Yasuhara et al., 2007; Branchi I. 2009, review*).

Inoltre l'azione a lungo termine del BDNF ha anche un ruolo nell'apprendimento, nella memoria, nel comportamento affettivo ed emotivo (*Baroncelli et al., 2009; Strasser et al., 2006; Cowansage et al., 2010*).

L'ippocampo, la corteccia cerebrale e il bulbo olfattivo sono tre aree cerebrali che esprimono un notevole adattamento plastico allo stress e ai cambiamenti ambientali e svolgono un ruolo cruciale nei processi di apprendimento e di memoria, due funzioni

cerebrali necessarie a garantire alla madre la capacità di adattarsi alle nuove richieste da parte dei propri cuccioli.

Tuttavia tutte queste modificazioni a cui il cervello è sottoposto durante la gravidanza e dopo il parto che sono in grado di modificare la sfera emozionale hanno un costo: le improvvise variazioni dei livelli ormonali non permettono solo l'attivazione dei comportamenti materni e la regolazione delle funzioni neuroendocrine necessarie per l'allattamento, ma possono anche indurre importanti variazioni nell'umore e nei casi più gravi possono predisporre la madre alla depressione post partum. Perciò tutti questi dati hanno stimolato lo studio di alcuni dei più importanti meccanismi molecolari che permettono al cervello di adattare rapidamente le proprie funzioni neuronali alle necessità ambientali durante la gravidanza e dopo il parto.

Obiettivi

Tenuto conto di quanto citato, lo scopo della mia tesi è stato quello di studiare:

- i livelli di espressione del BDNF;
- i livelli di espressione della proteina Arc, una proteina correlata alla plasticità sinaptica in quanto si trova localizzata nei dendriti e nelle spine dendritiche dei neuroni e la cui espressione è indotta dalla stimolazione sinaptica (*Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Steward e Worley, 2001; Rodriguez et al., 2005*);
- la variazione della densità delle spine dendritiche nel giro dentato;
- la neurogenesi nel giro dentato;
- la LTP nel giro dentato;
- le correnti eccitatorie postsinaptiche in miniatura (mEPSCs) glutamatergiche nelle cellule granulari del giro dentato;
- i livelli di espressione dei recettori GluR1 e GluR2 del glutamato.

Tutti questi studi sono stati effettuati nell'ippocampo di ratto durante la gravidanza, il parto e il periodo dopo il parto, quindi in un modello in cui si hanno brusche variazioni fisiologiche di ormoni steroidei che, come detto precedentemente, interagiscono nella plasticità neuronale.

Nel ratto la gravidanza dura 21 giorni, e anche il periodo dell'allattamento è di circa 21 giorni. Per il mio studio ho utilizzato femmine di ratto a diversi giorni di gravidanza (15, 19, 21 giorni) e a diversi giorni dopo il parto, sia durante l'allattamento (2, 7, 10, 14, 21 giorni) che dopo lo svezzamento (28 e 42 giorni).

Dato che la plasticità neuronale è regolata anche dagli stimoli esercitati dalla presenza dei cuccioli, ho voluto studiare gli stessi fattori anche nelle madri private definitivamente della cucciolata 7 giorni dopo la nascita a distanza di 10, 14 e 21 giorni dal parto.

Presumibilmente, la plasticità neuronale è necessaria per sostenere i nuovi stimoli ambientali che la madre deve affrontare dopo il parto e che comportano la formazione di

nuovi ricordi, le strategie per affrontare i diversi livelli di ansia e fame, e in generale negli animali le azioni aggressive e difensive, la costruzione del nido e la cura dei cuccioli (*Brett et al., 2001; Kinsley et al., 2008; Numan et al., 2003; Pawluski et al., 2005; Scanlan et al., 2006*).

Le variazioni dei parametri da me studiati potrebbero indurre quindi anche importanti modificazioni nel comportamento della madre, che deve rivolgere tutte le sue attenzioni al figlio e proteggerlo da qualunque tipo di pericolo. Gli adattamenti che avvengono nel cervello della madre durante l'allattamento potrebbero essere quindi determinati sia dalle variazioni degli ormoni che avvengono durante questo periodo che dagli stimoli esterni indotti dal bambino.

Introduzione

Ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei possiedono una struttura di base, detta ciclopentanperidrofenantrene, costituita da 3 anelli a 6 atomi di carbonio e da 1 a 5 atomi di carbonio [Fig. 4].

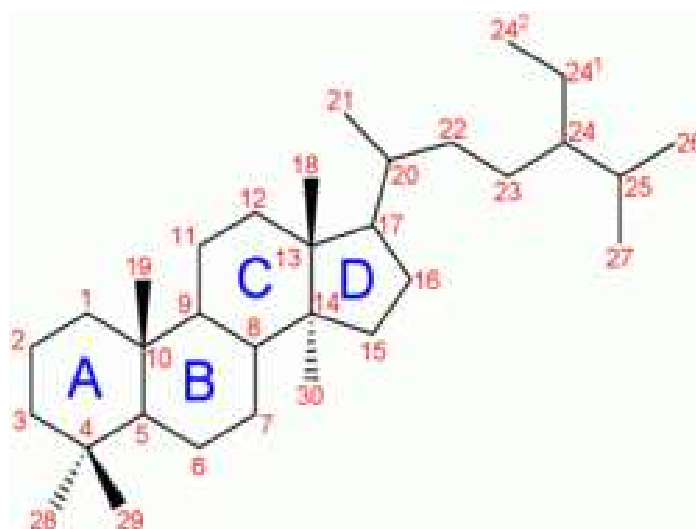


Fig.4

Struttura base delle molecole steroidee

Gli ormoni steroidei si dividono in tre gruppi principali, a seconda del numero degli atomi di carbonio che possiedono:

- I corticosteroidi e i progestinici a 21 atomi di carbonio (C-21), di cui il profano è la struttura di base;
- la serie degli steroidi a 18 atomi di carbonio (C-19), che comprende gli androgeni che condividono il nucleo androstano;
- gli estrogeni, steroidi a 18 atomi di carbonio (C-18) basati sul nucleo estrano.

Gli ormoni vengono sintetizzati nelle ghiandole surrenali, nelle gonadi e nella placenta a partire dal colesterolo. L'ovaio può sintetizzare il colesterolo "ex novo" a partire

catena laterale grazie all'ossidasi P450_{scc} mitocondriale. La biosintesi steroidogenica prosegue seguendo due vie [Fig.5]:

- quelle dei delta 5-3 β -idrossisteroidi che porta alla formazione del 17-idrossipregnenolone e del deidroepiandrosterone (DHEA);
- quella dei delta 4-3cheto-steroidi con la formazione di progesterone, 17 α -idrossiprogesterone e androstenedione [Fig.5]

Attraverso la via dei delta 5-3 β -idrossisteroidi, il pregnenolone viene convertito a 17 α -idrossipregnenolone, che la P450_{c17} desmolasi trasforma in DHEA. Quest'ultimo viene convertito in androstenedione dalla 3 β -idrossisteroide deidrogenasi. L'androstenedione e il suo derivato testosterone, per azione della 17 β -idrossisteroide deidrogenasi sono trasformati rapidamente nei corrispondenti estrogeni fenolico-steroidi dei C18 (estrone ed estradiolo) mediante reazioni microsomiali di aromatizzazione. L'aromatizzazione è mediata dall'aromatasi P450, situata nel reticolo endoplasmatico; la somministrazione di inibitori altamente specifici dell'aromatasi P450 potrà consentire un efficace blocco della produzione di estrogeni utile nella terapia degli iperestrogenismi e del cancro mammario.

Nella via dei delta 4-3-cheto-steroidi il pregnenolone viene direttamente trasformato in progesterone, tramite una 3 β -idrossisteroide deidrogenasi e una delta 4-5-isomerasi. Quest'ultimo, idrossilato a 17 α -idrossi-progesterone, costituisce il precursore della serie degli androgeni C19 (androstenedione e testosterone).

Questi ormoni steroidi, oltre che nell'ovaio, possono essere sintetizzati anche nel cervello.

L'endocrinologo *E.E. Baulieu* introdusse per primo il termine di neurosteroidi nel 1981 per indicare gli steroidi che vengono sintetizzati *de novo* nel cervello a partire dal colesterolo attraverso le classiche vie del mevalonato, la cui sintesi è indipendente dal livello plasmatico (*Baulieu, 1981*).

Infatti l'osservazione che quantità sostanziali di pregnenolone e deidroepiandrosterone (DHEA) possano essere misurate nel cervello di roditori 3-4 settimane dopo l'asportazione chirurgica dei tessuti steroidogenici periferici, ha portato alla conclusione che le cellule del cervello (sia i neuroni che le cellule gliali) siano in grado di sintetizzare steroidi sia *de novo* a partire dal colesterolo (Hu et al., 1987) che mediante il metabolismo di precursori (Kabbadj et al., 1993; Karavolas & Hodges, 1990; Mathur et al., 1993).

Gli steroidi prodotti nel cervello possono avere quindi un ruolo importante nella fisiopatologia cerebrale. Sebbene il tessuto nervoso esprima alcuni enzimi steroidogenici presenti nel tessuto della ghiandola mammaria e delle gonadi, la steroidogenesi nel cervello non sembra essere regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene che controlla solo la produzione periferica di ormoni steroidei (Mathur et al., 1993; Corpechot et al., 1993).

Ci sono alcune differenze fra la sintesi degli steroidi nel cervello e quello che avviene in periferia. Infatti il deossicorticosterone (DOC) può essere convertito in corticosterone dall'enzima 11- β -idrossilasi o in aldosterone dall'enzima aldosterone sintetasi. Nelle ghiandole surrenali questi enzimi non sono espressi nella stessa cellula, ma nel cervello i due enzimi si trovano coespressi ed entrambi comportano la conversione del DOC in corticosterone o aldosterone (Greener, 2003) [Fig. 6].

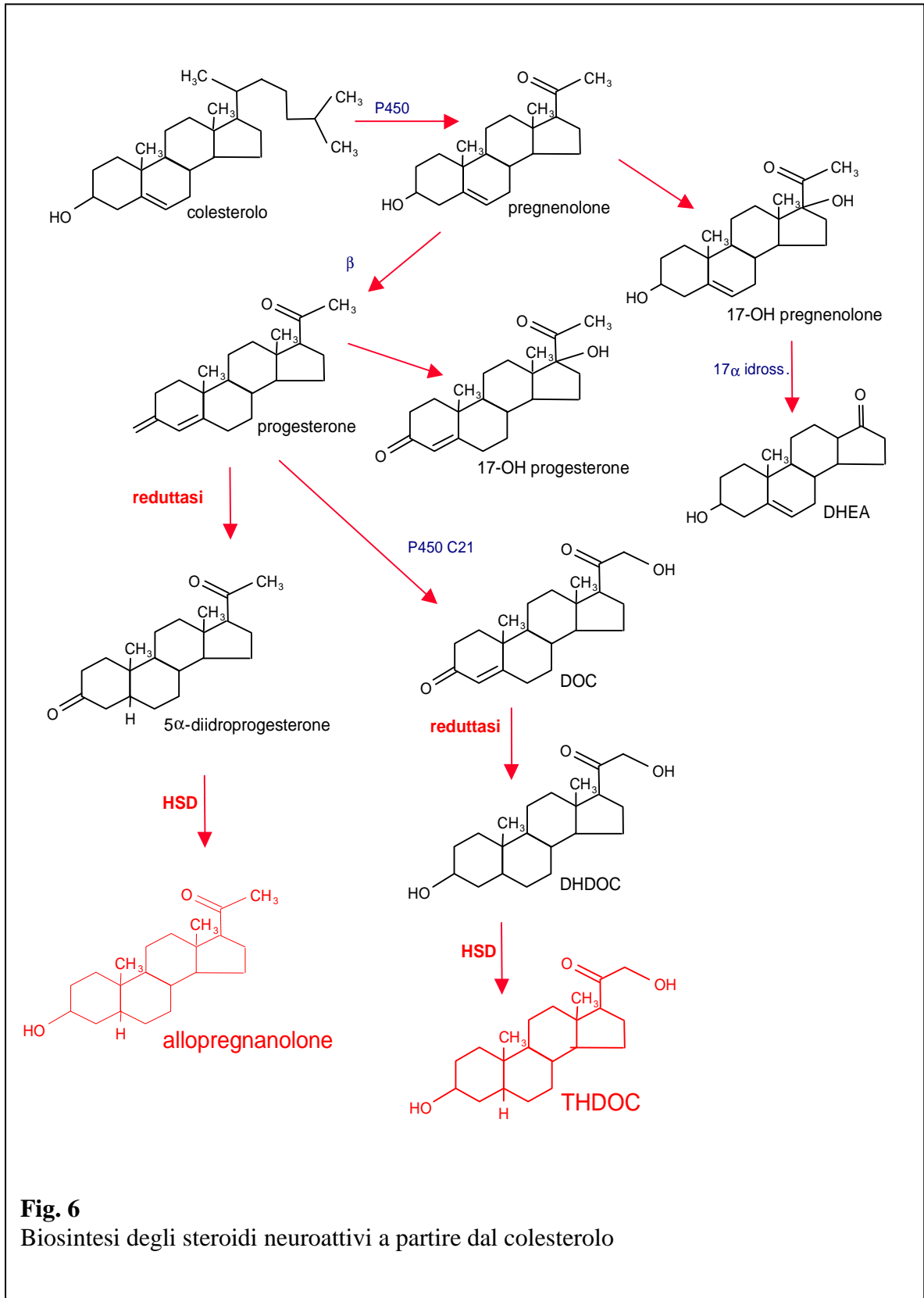


Fig. 6
Biosintesi degli steroidi neuroattivi a partire dal colesterolo

Nel cervello il pregnenolone è metabolizzato dagli enzimi 5 α -reduttasi e 3 α -idrossisteroide deidrogenasi (HDS). Inizialmente si forma il progesterone (P) che può essere convertito in allopregnenolone (AP), oppure in DOC e successivamente tetraidrodeoxicorticosterone (THDOC). La riduzione da parte della 5 α -reduttasi è un processo unidirezionale, mentre la riduzione da parte della HSD è bidirezionale (*Dubrovsky, 2006*) [Fig. 6].

Così il colesterolo è un importante precursore della biosintesi degli ormoni steroidei che avviene sia in periferia che nel cervello.

È noto che gli steroidi possono agire sia attraverso un'azione genomica mediata da uno specifico recettore per gli steroidi, sia attraverso un'azione non genomica mediata da alcuni recettori per i neurotrasmettitori o proteine neuromodulatorie (*Rupprecht, 2003*). Sulla base di queste caratteristiche, questi steroidi sono considerati steroidi neuroattivi.

Gli steroidi neuroattivi hanno effetti farmacologici in particolare sul recettore GABA_A, NMDA (*Paul e Purdy, 1992*) e sul recettore sigma-1 (*Monnet e Maurice, 2006*). Infatti il progesterone e alcuni suoi metaboliti come l'allopregnanolone (ALLO) sono dei potenti modulatori positivi della funzione GABAergica, mentre il DHEA, il PREG e i loro esteri solfati sono dei modulatori negativi del recettore GABA_A, e dei modulatori positivi dei recettore NMDA e sigma-1.

Sono state descritte in letteratura delle interazioni tra gli steroidi neuroattivi e il sistema serotoninergico, supportando l'ipotesi di un coinvolgimento degli steroidi neuroattivi nella depressione. In particolare il DHEA e l'ALLO modulano l'attività dei neuroni serotoninergici nel nucleo dorsale del raphe sia attraverso una loro azione diretta su questi neuroni che in combinazione con alcuni inibitori del recettore della serotonina (*Griffin e Mellon, 1999; Robichaud e Debonnel, 2004*).

Ormoni come gli estrogeni, il progesterone ed i suoi metaboliti svolgono un ruolo importante nello sviluppo, crescita, maturazione e differenziamento del Sistema Nervoso Periferico (SNP) e Centrale (SNC) (*McEwen et al., 1994; Scharfman e MacLusky, 2006*).

Gli ormoni steroidei agiscono sulle plasticità neuronali determinando variazioni nella funzione e nella struttura in diversi modi durante l'arco della vita. Questi effetti degli ormoni steroidei inoltre sono diversi tra i due sessi e determinano variazioni nella struttura neuronale e funzionale in diverse regioni del cervello.

Sono presenti in letteratura numerose pubblicazioni che dimostrano l'effetto trofico e neurotrofico del progesterone e dell'estrogeno. Nel sistema nervoso periferico è stato mostrato che il progesterone e l'estrogeno stimolano la mielinizzazione dei neuroni (*Koenig et al., 1995; Azcoitia et al., 2003; Desarnaud et al., 1998; Magnaghi et al., 2001*). Il progesterone è in grado di stimolare la mielinizzazione anche nelle colture cellulari organotipiche di cervelletto di topo o ratto (*Gomar et al., 2007*) e previene la neurodegenerazione della corteccia cerebrale (*Roof et al., 1994, 1997; Stein, 2001*).

Più recentemente è stato osservato un trofismo differente durante le fasi del ciclo mestruale correlate a variazioni di concentrazione di progesterone (*Fernandez et al., 2003*).

L'estrogeno invece stimola la neurogenesi e aumenta la sopravvivenza di neuroni neoformati (*Ormerod et al., 2004*).

L'ippocampo mostra un'elevata sensibilità agli ormoni steroidei (*Segal e Murphy, 2001*); anche in questo caso gli effetti maggiori sono determinati dall'estradiolo. Infatti l'estradiolo nella CA1 dell'ippocampo aumenta la densità delle spine dendritiche (*Woolley e McEwen, 1993*), le sinapsi a livello di queste (*Woolley, 1998*), stimola la sintesi di proteine sinaptiche (*Choi et al., 2003; Li et al., 2004*) e aumenta la Long Term Potentiation (LTP) (*Warren et al., 1995*). Ancora l'estradiolo altera i recettori per l'NMDA (*Adams et al., 2004*), diminuisce l'apoptosi indotta sperimentalmente e aumenta i livelli di mRNA e

proteina del BDNF (*Solum e Handa, 2002; Scharfman et al., 2003*) e sinaptofisina (*Frick et al., 2002*).

E' stato osservato che la somministrazione di progesterone, dei suoi metaboliti e di estrogeno hanno un effetto simile ad alcuni fattori trofici, per esempio prevengono assontomia dei motoneuroni indotta dalla diminuzione di acetilcolina transferasi, stimolano lo sviluppo di fibre colinergiche, aumentano l'espressione del gene associato alla rigenerazione di GAP-43 in seguito a danno neuronale (*Ankeny et al., 2001; Kobayashi et al., 1997*).

Inoltre sia gli ormoni che i fattori trofici riducono la formazione di edema e promuovono la mielinizzazione dei neuroni (*Winkler et al., 2000; Ikeda et al., 2002*).

Fattori neurotrofici

Gran parte delle capacità del cervello di adattare o modificare se stesso in funzione dell'esperienza acquisita e all'ambiente risiede nella plasticità delle connessioni sinaptiche, sia a breve che a lungo termine. Esistono numerosi studi che indicano che il numero e la forza delle sinapsi possono essere modificati dall'attività neuronale (*Bliss e Collingridge, 1993; Linden, 1994; Malenka e Nicoll, 1999*). È ormai ampiamente riconosciuto che la modulazione attività-dipendente delle sinapsi è un fattore critico per lo sviluppo cerebrale così come per molte funzioni cognitive negli adulti. Tuttavia i meccanismi molecolari che traducono gli schemi dell'attività neuronale in specifiche modificazioni nelle strutture e funzioni delle sinapsi restano in gran parte sconosciuti. Recentemente però è stata avanzata un'ipotesi secondo cui già a partire dall'embriogenesi vari citotipi, tessuti e organi siano in grado di produrre e rilasciare in piccola quantità una o più proteine secretorie, appartenenti alla categoria dei fattori di crescita e definite collettivamente fattori neurotrofici, indispensabili per la sopravvivenza dei neuroni e per la corretta organizzazione morfo-funzionale del sistema nervoso. Questa ipotesi è basata su due principali osservazioni:

- 1) l'espressione delle neurotrofine è regolata dall'attività neuronale;
- 2) le neurotrofine possono modulare l'efficacia della trasmissione sinaptica, la crescita del dendrite e dell'assone, e in generale gli elementi necessari per la sinaptogenesi (*Thoenen, 1995; Berninger e Poo, 1996; Bonhoeffer, 1996; Katz e Shatz, 1996; Lu e Figurov, 1997*).

I neuroni competono tra di loro per assicurarsi tali molecole: soltanto quelli che instaurano collegamenti adatti sopravvivono e formano le sinapsi, riuscendo a captare le trofine, mentre gli altri muoiono per apoptosi. Questo fenomeno che rappresenta un sistema semplice per adeguare il numero dei neuroni al numero e alle esigenze delle cellule bersaglio che essi innervano viene definito “*ipotesi del fattore neurotrofico*”

(*Oppenheim, 1991*). Questa ipotesi nacque dai risultati delle ricerche di Victor Hamburger e Rita Levi Montalcini che nei primi anni '50 identificarono il primo dei fattori di sopravvivenza neuronale, il Nerve Growth Factor (NGF) (*Levi-Montalcini, 1987*). Inizialmente, l'ipotesi del fattore neurotrofico è stata sviluppata nel contesto del SNP, ma successivamente è stata estesa anche ai neuroni del SNC.

Attualmente, i fattori neurotrofici comprendono diverse proteine che vengono raggruppate in famiglie in base alla loro sequenza e alle loro proprietà farmacologiche, e ciascuna di esse promuove la sopravvivenza di specifici tipi neuronali durante determinati stadi del loro sviluppo. Nei mammiferi sono espressi altri cinque fattori neurotrofici: il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), le Neurotrofine 3 e 4 (NT-3 e NT-4), il Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) e il Ciliar Neurotrophic Factor (CNTF). Le neurotrofine vengono sintetizzate inizialmente come pro-neurotrofine, ovvero precursori ad alto peso molecolare, poi tramite processi proteolitici vengono convertite in neurotrofine mature.

Le neurotrofine e i geni dalle quali derivano mostrano elevata omologia di sequenza e di struttura. I geni codificanti le neurotrofine originano da duplicazioni successive di una porzione di genoma derivante da un cordato antico (*Hallböök, 1999*). Sono geni che mostrano molte somiglianze, inclusa l'esistenza di promotori multipli. I prodotti di questi geni possono essere processati attraverso la proteolisi nella loro forma matura. È stato dimostrato che la regolazione della loro maturazione è un importante punto di controllo post-trascrizionale che limita e indirizza la specificità della loro azione (*Lee et al., 2001*). Le neurotrofine si trovano associate in dimeri attraverso legami non-covalenti; studi "in vitro" hanno dimostrato che alcune neurotrofine sono in grado di creare eterodimeri con altre neurotrofine in vitro, però questa evidenza non è stata dimostrata "in vivo". Ciascuna di queste proteine mostra un'alta omologia di struttura con molti altri

gruppi di fattori di crescita, incluso il fattore trasformante β (TGF- β) e il Platelet Derived Neurotrophic Factor (PDGF).

I recettori per le neurotrofine

L'attività biologica dei fattori neurotrofici è mediata dalla loro interazione con proteine recettoriali transmembranaliche dotate di un dominio extracellulare a cui si legano i fattori trofici e di un dominio citosolico sede dell'attività regolatoria e catalitica tirosinchinasica. La maggior parte dei recettori conosciuti possiede un solo passo transmembranale. La porzione transmembrana e il dominio catalitico hanno un alto grado d'omologia interspecifico, mentre i domini extracellulari sono variabili e possono interagire con diversi ligandi. Sulla base di queste differenze si possono distinguere almeno 15 sottofamiglie di recettori, raggruppate in base alla sequenza dei domini extracellulari e al grado di omologia nel dominio catalitico. Ad una specifica sottofamiglia di recettori spesso corrisponde una famiglia di fattori trofici. Di regola ciascun recettore lega con alta affinità un singolo fattore, ma sono state riportate interazioni crociate (*Ibanez, 1998*).

Le neurotrofine interagiscono con due principali classi distinte di recettori [Fig.7]:

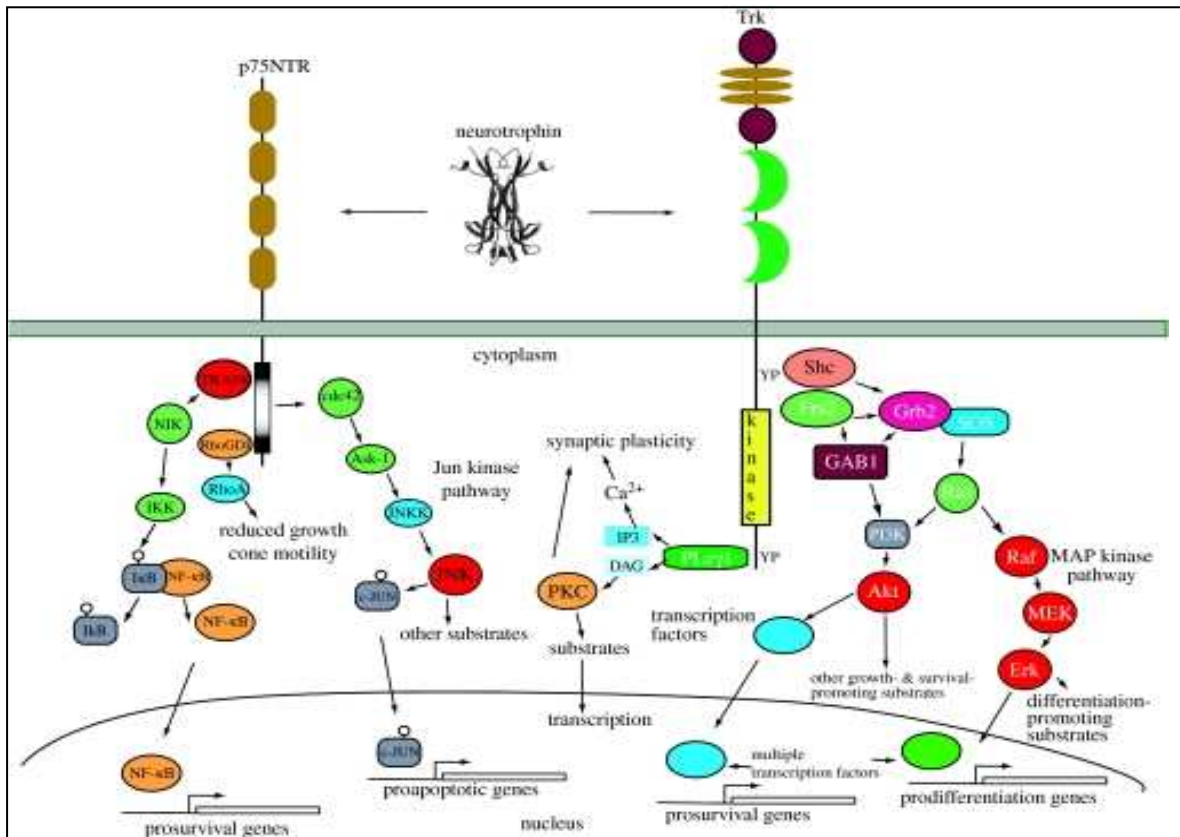


Fig.7

Rappresentazione delle vie intracellulari mediate dai recettori Trk e p75.

Il recettore p75 regola tre vie principali:

- attivazione di NF-κB che determina la trascrizione di diversi geni, inclusi molti promotori della sopravvivenza cellulare;
- attivazione della via di Rho che controlla l'accrescimento del cono di crescita;
- attivazione del segnale pro-apoptotico mediato dai p75 che richiede la presenza della sortilina.

I recettori Trk controllano tre vie principali:

- attivazione di Ras che comporta l'attivazione delle MAP chinasi che promuovono la differenziazione neuronale incluso l'accrescimento dell'assone;
- attivazione di PI3K attraverso Ras o Gab1 che promuove la sopravvivenza e crescita dei neuroni;
- attivazione della PLC-γ che comporta l'attivazione della protein chinasi Ca²⁺ dipendente (PKC) che promuove la plasticità sinaptica.

(Reichardt, 2006)

La prima classe ad essere stata scoperta è quella dei recettori p75NTR, che furono identificati come recettori a bassa affinità per l'NGF, ma in seguito fu dimostrato essere capaci di legare anche le altre neurotrofine con affinità simile a quelle dell'NGF (*Rodriguez-Tebar et al., 1990; Frade e Barde, 1998*). Il recettore p75NTR è un membro della famiglia dei fattori di necrosi tumorale, con un dominio extracellulare che include quattro motivi ricchi di cisteina, con un singolo dominio transmembranale e un dominio citoplasmatico che include un dominio di morte cellulare (*Liepinsh et al. 1997; He e Garcia 2004*).

La pro-neurotrofina si lega ad alta affinità al complesso formato da p75NTR più la sortilina, una proteina contenente il dominio Vps10 (*Nykiaer et al., 2004; Chen et al., 2005*). Sia la sortilina che il p75NTR partecipano direttamente al legame della pro-neurotrofina. La presenza della sortilina è necessaria per osservare l'apoptosi successiva al legame della pro-neurotrofina al p75NTR. Come precedentemente detto, anche le neurotrofine mature si legano al recettore p75NTR con un'affinità approssimativamente 1000 volte inferiore rispetto alla rispettiva forma immatura.

Diverse vie di segnalazione sono attivate successivamente al legame della pro-neurotrofina al p75NTR. Queste sono mediate dal legame del p75NTR a molti adattatori, incluso il Traf6, il fattore di interazione delle neurotrofine (NRIF), l'antigene associato al melanoma (MAGE), l'omologo di MAGE (NRAGE), il fattore di Schwann 1 (SC1), e RhoGDI (*Yamashita et al., 2005*).

Una delle più importanti vie attivate dai p75NTR attivati dalle neurotrofine è quella delle Jun-chinasi. Il segnale determinato da questa cascata comporta l'attivazione di p53 e l'apoptosi. Tra i vari bersagli di p53 c'è il gene pro-apoptotico Bax.

L'attivazione dei recettori p75NTR può inoltre controllare l'attività delle proteine GTPasiche Rho, con il risultato di inibire l'accrescimento degli assoni (*Yamashita et al., 1999*).

La seconda classe di recettori, quelli ad attività tirosinchinasica, costituisce la classe più numerosa dei recettori per le neurotrofine (*Chao, 2003; Huang e Reichardt, 2003*). I tre membri principali di questa famiglia di recettori mostrano un'alta affinità specifica per le neurotrofine, mentre presentano bassa affinità per le rispettive pro-neurotrofine; l'NGF attiva preferenzialmente i TrkA, il BDNF e l'NT-4 attivano il TrkB, l'NT-3 attiva il TrkC.

A differenza dei p75NTR che non dimerizzano, in questo caso la neurotrofina sotto forma di dimero si lega al recettore e lo fa dimerizzare: ciò porta alla transfosforilazione delle chinasi presenti nel loro dominio citoplasmatico (*Huang e Reichardt, 2003*). Inoltre l'NT-3 può legarsi agli altri recettori Trk con bassa affinità.

Il dominio citoplasmatico dei recettori Trk contiene molte tirosine addizionali che sono substrato per la stessa fosforilazione dei recettori Trk. Quando questi residui di tirosina vengono fosforilati, si forma il core del sito di legame per proteine adattatrici ed enzimi che mediano la cascata di segnalazione intracellulare. La fosforilazione dei residui di tirosina crea siti di legame per proteine contenenti il dominio di legame alle tirosine fosforilate (PTB) o dominio di omologia ad Src-2 (SH2).

Le principali vie di segnalazione attivate dai recettori Trk sono Ras, PI3-chinasi, PLC- γ 1 e i loro effettori successivi (*Huang e Reichardt, 2003*). Queste includono la stimolazione della cascata delle protein-chinasi mitogeniche (MAP), di Akt da parte del PI3K e la generazione del diacilglicerolo (DAG) e dell' inositolo trifosfato (IP3) da parte della PLC γ 1 che porta alla mobilitazione delle scorte di Ca^{2+} e all'attivazione della protein-chinasi dipendente da Ca^{2+} e DAG (PKC).

In aggiunta, l'endocitosi e il trasporto dei recettori nei diversi compartimenti di membrana controllano l'efficacia e la durata della segnalazione mediata dai recettori Trk, in parte perché molti adattatori proteici sono localizzati nei compartimenti intracellulari.

L'attivazione di Ras è richiesta per la normale differenziazione neuronale e inoltre promuove la sopravvivenza di sottopopolazioni neuronali. L'attivazione di Ras è mediata dall'attivazione transitoria della proteina adattatrice Shc, che richiede la fosforilazione del recettore; ciò permette alla proteina Shc di legarsi tramite il dominio PTB (*Nimnual et al., 1998*). La fosforilazione di Shc crea dei siti di fosfo-tirosine su Shc stessa, che recluta l'adattatore Grb-2, a sua volta legato alla proteina di scambio di Ras (SOS). Ras attiva la protein-chinasi Raf (protein-chinasi mitogenica appartenente alla famiglia delle MAPK) la quale a sua volta, sempre mediante fosforilazione, attiva MEK, e quest'ultima attiva ERK1/2 che ha il compito di regolare l'espressione genica essendo un fattore di trascrizione.

Le neurotrofine, inoltre, attivano molte proteine della famiglia delle GTPasi monomeriche Rho che controllano l'organizzazione del citoscheletro, la motilità cellulare e il comportamento del cono di crescita (*Yuan et al., 2003b*) [Fig.8].

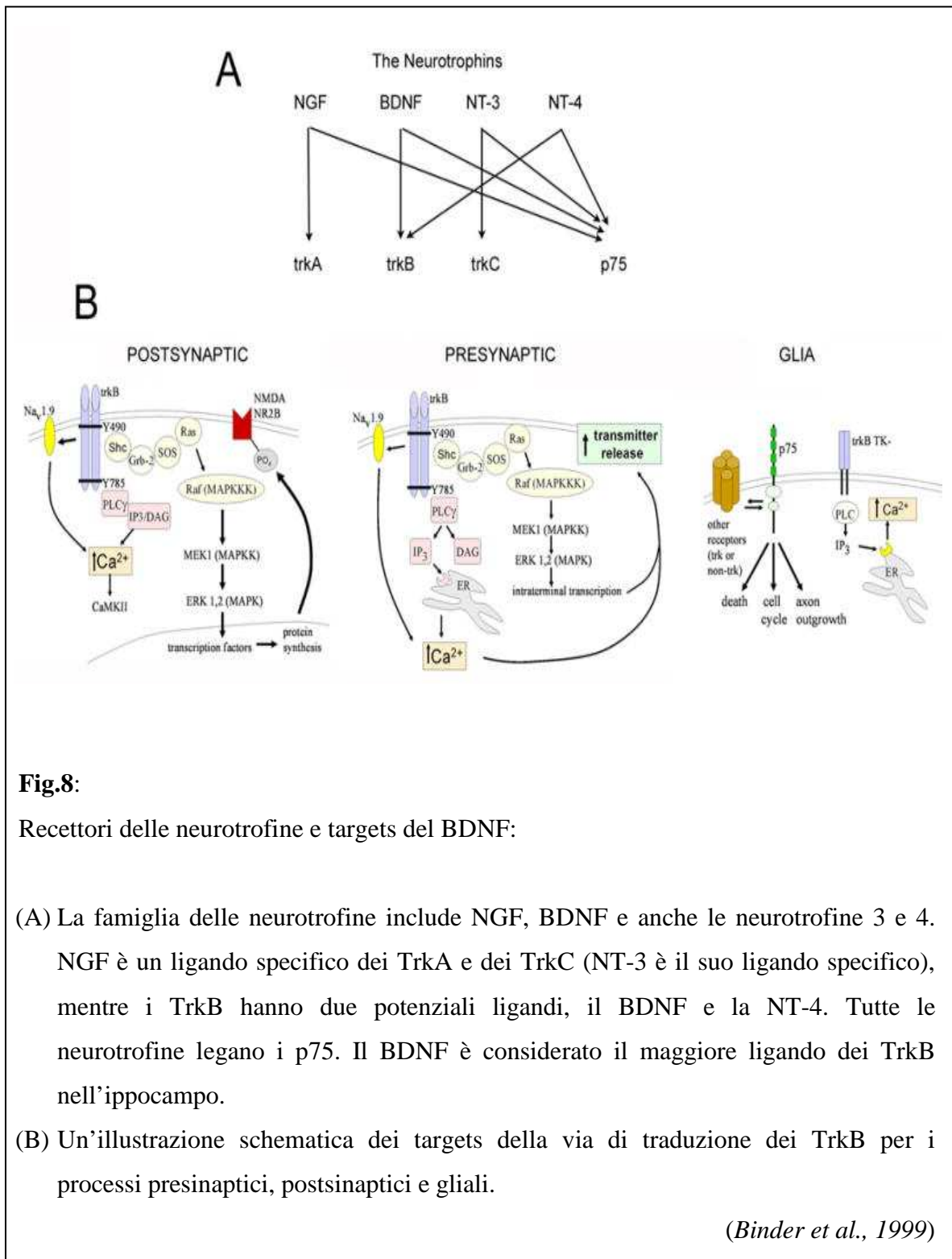


Fig.8:

Recettori delle neurotrofine e targets del BDNF:

(A) La famiglia delle neurotrofine include NGF, BDNF e anche le neurotrofine 3 e 4. NGF è un ligando specifico dei TrkA e dei TrkC (NT-3 è il suo ligando specifico), mentre i TrkB hanno due potenziali ligandi, il BDNF e la NT-4. Tutte le neurotrofine legano i p75. Il BDNF è considerato il maggiore ligando dei TrkB nell'ippocampo.

(B) Un'illustrazione schematica dei targets della via di traduzione dei TrkB per i processi presinaptici, postsinaptici e gliali.

(Binder et al., 1999)

Le interazioni mediate dal legame delle pro-neurotrofine ai p75NTR e delle neurotrofine ai recettori Trk hanno azioni opposte. Per esempio, il legame delle neurotrofine ai recettori Trk promuove la sopravvivenza, il differenziamento neuronale e la formazione di spine dendritiche, mentre l'attivazione dei p75NTR promuove l'apoptosi e la retrazione delle spine dendritiche (*DeFreitas et al., 2001*). Attualmente si ritiene che le neurotrofine e le pro-neurotrofine abbiano ligandi preferenziali diversi: le pro-neurotrofine legano prevalentemente i p75NTR, mentre le neurotrofine legano i Trk (*Lee et al., 2001*).

La via di segnalazione iniziata dai Trk agisce a diversi livelli per sopprimere la più importante via che determina gli effetti pro-apoptotici mediati dai p75NTR, ossia la via delle Jun-chinasi (*Yoon et al., 1998*). L'attivazione di Ras sopprime la cascata delle Jun-chinasi nei neuroni simpatici. In questi neuroni, l'attivazione di PI3K mediata da Ras è richiesta per sopprimere questa via di segnalazione (*Mazzoni et al., 1999*).

Ci sono diversi meccanismi che attraverso l'attivazione dei Trk sopprimono il segnale pro-apoptotico mediato dalla via di segnalazione dei p75NTR [Fig.7].

È chiaro che le neurotrofine e i recettori Trk attivati sono trasportati assieme in vescicole di endocitosi. L'internalizzazione e il trasporto delle neurotrofine legate al recettore attivato sono necessari per determinare specifiche risposte cellulari come la trascrizione genica (*Delcroix et al., 2003; Ye et al., 2003*).

Meccanismi di supporto trofico

Gli studi che riguardano l'espressione e gli effetti dei fattori neurotrofici e dei loro recettori hanno messo in luce che queste sostanze regolano la sopravvivenza neuronale in diversi modi [Fig.9]. La teoria classica di supporto trofico "di derivazione dal target" prevede che la trofina si leghi al suo recettore specifico, presente sulla membrana delle terminazioni nervose del neurone ad essa sensibile, e venga poi internalizzata e trasportata per via retrograda fino al soma, dove interviene nella regolazione dell'espressione genica (Davies, 2003) [Fig.9A]. Tuttavia è stato dimostrato che segnali trofici possono giungere ai neuroni sia tramite meccanismi paracrini da cellule gliali e neuroni vicini, che mediante meccanismi autocrini, quindi per interazione con auto-recettori (Davies, 2003) [Fig.9B]. D'altra parte, si è anche affermato il concetto che i neuroni possono derivare il supporto trofico non solo dalle cellule che innervano ma anche da neuroni che ad essi inviano contatti sinaptici. Questo fenomeno implica l'esistenza di un meccanismo di trasporto anterogrado che è stato effettivamente dimostrato per le Neurotofinae BDNF e NT-3 (Altar et al., 1998) e per il GDNF (Russell et al., 2000) [Fig.9C].

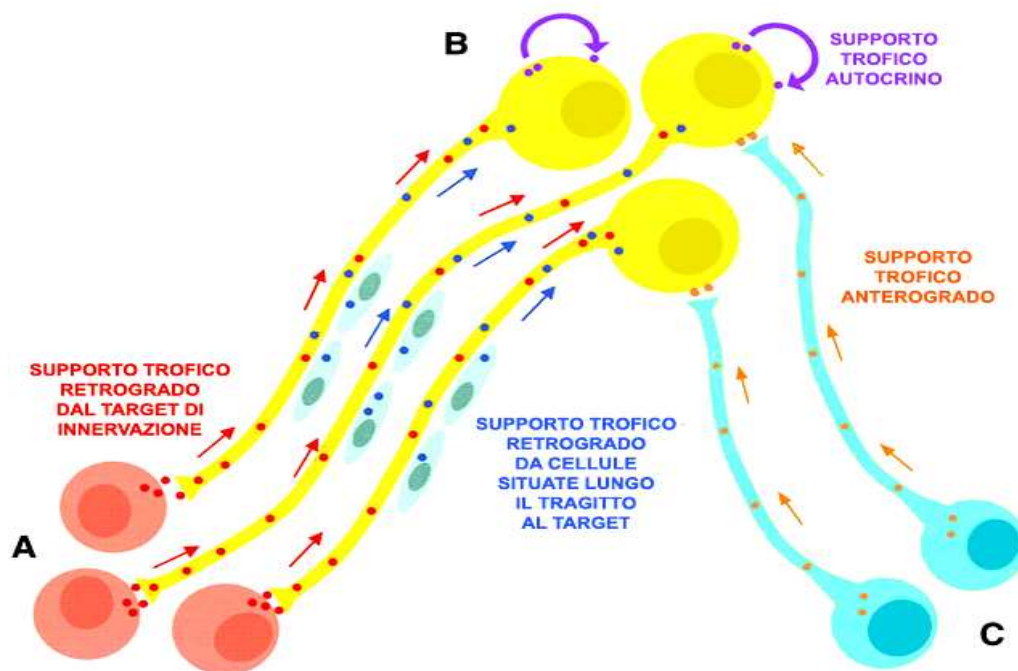


Fig.9

Rappresentazione schematica dei meccanismi di supporto trofico. A, B e C indicano tre gruppi di neuroni interconnessi tra loro. I neuroni del gruppo B possono ottenere i fattori trofici da quattro sorgenti:

- 1) dai territori di terminazione delle cellule nervose o da altri neuroni con cui fanno sinapsi (i neuroni A secernono un fattore neurotrofico (pallini rossi), che si lega ai recettori sulle terminazioni assoniche dei neuroni del gruppo B, i quali lo internalizzano per endocitosi e quindi lo trasportano retrogradamente (freccie rosse) fino al corpo cellulare dove esplicano la loro azione);
- 2) da cellule bersaglio intermedie o da cellule gliali associate agli assoni [questo fattore neurotrofico è rappresentato da pallini blu ed è trasportato al soma in maniera retrograda (freccie blu)];
- 3) da fibre nervose di neuroni afferenti (gruppo C) che sintetizzano il fattore neurotrofico (pallini arancioni) e lo trasportano in maniera anterograda verso le terminazioni (freccie arancioni) dove, in seguito a rilascio, si lega ai recettori presenti sul corpo cellulare o sui dendriti dei neuroni B;
- 4) secondo una modalità autocrina, in cui il fattore neurotrofico viene utilizzato dagli stessi neuroni che lo producono (pallini viola).

Immagine modificata da: Davies AM, 2003

E' stato inoltre recentemente dimostrato che alcuni fattori neurotrofici, in determinate circostanze, possono promuovere anche la morte cellulare attivando in maniera diretta i meccanismi cellulari dell'apoptosi. Pertanto, ogni popolazione di neuroni sarebbe esposta, durante lo sviluppo, ad una varietà di segnali derivati dai tessuti innervati, dalle fibre afferenti o secreti per via autocrina (Davies, 2003).

E' importante rilevare che, con l'eccezione del meccanismo autotrofico (autocrino), le cellule che producono le trofine sono distinte da quelle per le quali il fattore trofico rappresenta una molecola di supporto vitale.

Funzioni dei fattori neurotrofici nel sistema nervoso

Durante lo sviluppo embrionale e l'organogenesi, i fattori neurotrofici svolgono numerose funzioni:

- 1) promuovono la sopravvivenza, la differenziazione e la definizione del fenotipo neuronale;
- 2) stimolano la crescita dell'assone e influenzano il suo trofismo verso il target;
- 3) partecipano alla sinaptogenesi;
- 4) contrastano l'apoptosi di specifiche sottopopolazioni neuronali (Davies, 2003).

Il periodo nel quale i neuroni richiedono un supporto neurotrofico ha una durata variabile nelle diverse popolazioni neuronali ed è stato dimostrato che determinati neuroni cambiano la loro dipendenza da un fattore trofico ad un altro (Davies, 2003). Inoltre, la sopravvivenza della maggior parte dei neuroni sembra dipendere non da una singola sostanza ma da sostanze multiple, appartenenti alla stessa o a diverse famiglie di fattori neurotrofici, che possono essere necessarie contemporaneamente o in sequenza temporale (Snyder, 1994).

Tuttavia, l'espressione dei fattori neurotrofici persiste in vario grado nel sistema nervoso maturo, dove essi partecipano alla regolazione delle proprietà e della funzionalità dei neuroni. Pertanto, l'ipotesi del fattore neurotrofico è stata estesa nel suo significato per includere, oltre alla sopravvivenza, altre importanti implicazioni delle trofine sulla funzionalità neuronale, quali il mantenimento dell'integrità strutturale e del fenotipo, la plasticità morfo-funzionale e le capacità neuroriparative (*McMahon e Priestley, 1995; Hefti, 1997; Murer et al., 2001*). Altri studi rivelano una serie d'effetti di questi fattori trofici fuori del sistema nervoso, in modo importante nello sviluppo cardiaco, nella neovascolarizzazione e nelle funzioni del sistema immunitario (*Donovan et al., 2000; Lin et al., 2000; Coppola et al., 2004; Kermani et al., 2005*).

Infine molti disturbi umani sono associati a mutazioni genetiche delle neurotrofine e/o dei loro recettori. Per esempio, una mutazione dominante del recettore TrkB che riduce la segnalazione tirosin-chianasica è stata descritta in pazienti con grave obesità iperfagica e alterazioni della nocicezione, dell'apprendimento e della memoria (*Yeo et al., 2004*), mentre un polimorfismo del gene del BDNF, che porta ad una riduzione del trasporto della proteina BDNF, è stata associata a riduzione delle funzioni ippocampali e della memoria episodica (*Egan et al., 2003*).

Numerosi studi suggeriscono che le neurotrofine continuano a influenzare la struttura e le funzioni neuronali durante tutta la vita (*Castren et al., 1992; Schnell et al., 1994; Thoenen, 1995; Bonhoeffer, 1996; Prakash et al., 1996; Alsina et al., 2001; Maffei, 2002; Bolanos e Nestler, 2004; Duman, 2004; Tuszynski e Blesch, 2004*).

Brain derived Neurotrophic Factor, BDNF

La seconda neurotrofina ad essere stata identificata, dopo la scoperta dell'NGF, è stata il *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). Esso fu purificato dal cervello di maiale come un fattore di sopravvivenza per molte popolazioni neuronali non responsive all'NGF (*Barde et al., 1982*).

Il BDNF è una proteina che fa parte della famiglia delle neurotrofine ed è abbondantemente espressa nel sistema nervoso centrale e periferico, in particolare nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale (specialmente nell'area temporale e occipitale, nell'insula e nella corteccia motoria e sensitiva) e nell'amigdala (*Murer et al., 2001*). Dal punto di vista molecolare è una proteina omodimerica con un peso molecolare di 28 kDa, formante 2 foglietti β antiparalleli, contenenti un cluster di cisteina [Fig.10].

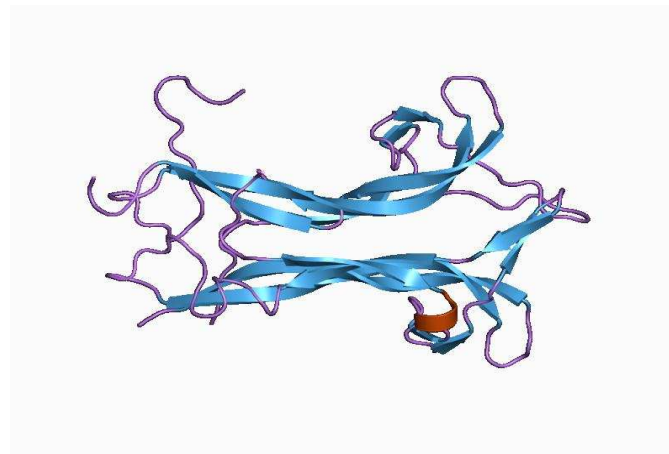


Fig10

Rappresentazione grafica della struttura molecolare del BDNF

La sua configurazione 3D è simile a quelle di altri fattori di crescita [transforming growth factor- β_2 , platelet derived growth factor, vascular endothelial growth factor (EGF)], il che suggerisce una probabile evoluzione comune (*Van Kesteren et al., 1998*).

Il BDNF può oltrepassare la barriera ematoencefalica in entrambe le direzioni. I livelli di BDNF circolanti nel sangue derivano dai neuroni, dalla glia e dalle cellule del sistema nervoso centrale (*Pan et al., 1998; Karege et al., 2002*).

E' stato descritto che nel sistema nervoso centrale il BDNF può essere espresso in alcune cellule non neuronali (*Yamamoto et al., 1996*) come l'endotelio vascolare e le cellule del muscolo liscio (*Donovan et al., 1995; Nakahashi et al., 2000*). Anche alcune cellule del sistema immunitario come i macrofagi attivati e i linfociti possono contribuire alla secrezione di BDNF (*Gielen et al., 2003*).

Il BDNF è presente già nel feto e la sua espressione raggiunge i livelli massimi dopo la nascita, promuovendo la crescita e il differenziamento neuronale (*Conover e Yancopoulos, 1997*).

Nel sistema nervoso adulto è coinvolto nella plasticità sinaptica e induce variazioni nella secrezione ed eccitabilità di alcuni neurotrasmettitori e neuropeptidi (*Lindholm et al., 1994; Kang e Schuman, 1995; Li et al., 1998; Schinder e Poo, 2000; Thoenen, 2000; Carter et al., 2002*), sembra avere un'azione protettiva nei confronti del neurone (*Lindvall et al. 1994*) e gioca un ruolo importante nell'apprendimento, nella memoria e nel comportamento (*Hall et al., 2000; Egan et al., 2003*). Inoltre una riduzione dell'espressione del BDNF è associata ad atrofia o morte neuronale in seguito all'invecchiamento o a causa di alcune disfunzioni neurologiche (*Murer et al., 2001*).

Il BDNF è sintetizzato, immagazzinato e rilasciato dai neuroni glutammatergici (*Lessman et al., 2003*). Nei principali neuroni dell'ippocampo, il BDNF appare immagazzinato nei processi dendritici in granuli secretori di tipo II, da cui è rilasciato in

seguito ad una stimolazione ad alta frequenza (HFS) (Blochl e Thoenen, 1996; Hartmann et al., 2001; Kohara et al., 2001; Balkowiec e Katz, 2002).

Nei neuroni ipotalamici il BDNF stimola la sintesi (Rage et al., 1999; Guerra-Crespo et al., 2001), il differenziamento (Loudes et al., 2000) e il rilascio degli ormoni (Marmigère et al., 2001). In quest'area inoltre l'espressione del BDNF è modulata da stimoli fisiologici (Aliaga et al., 2002; Givalois et al., 2004).

Alcune malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e di Parkinson sono associate ad una riduzione dei livelli di BDNF nel cervello (Conner et al., 1997; Parain et al., 1999) e livelli ridotti di BDNF nel plasma sono stati trovati anche nei soggetti depressi (Karege et al., 2002 a e b), schizofrenici (Toyooka et al., 2002), abulemici e anoressici (Nakazato et al., 2003; Monteleone et al., 2005). Al contrario i soggetti affetti da epilessia mostrano livelli di BDNF più elevati sia nel cervello che nel plasma (Ernfors et al., 1991). I livelli di BDNF diminuiscono anche con l'età e l'aumento di peso (Lommatzsch et al., 2005).

La versatilità del BDNF è sottolineata dal suo contributo in una vasta gamma di risposte di adattamento neuronale, incluso la *Long-Term Potentiation* (LTP), la *Long-Term Depression* (LTD) e certe forme di plasticità sinaptica a breve termine, come la regolazione omeostatica intrinseca dell'eccitabilità neuronale (Asztely et al., 2000; Ikegaya et al., 2002; Maffei, 2002).

Riassumendo si può dedurre che l'attività neuronale sia correlata ai livelli di espressione del BDNF. Infatti dalla letteratura precedentemente descritta si può dedurre che un'alta frequenza di stimolazione elettrica può indurre l'espressione del BDNF "in vitro" (Thompson et al., 2003; Patterson et al., 1999), suggerendo che è sufficiente solo un modesto aumento dell'attività neuronale per attivare i meccanismi che ne incrementano i livelli.

Interazioni tra estrogeno, progesterone e BDNF

Esistono numerosi studi che hanno come oggetto l'interazione tra gli ormoni steroidei, principalmente estradiolo e progesterone, e i fattori di crescita nel sistema nervoso centrale (Gibbs, 1999; Scharfman et al., 2003; Begliuomini et al., 2007). La maggior parte di queste interazioni può essere riassunta in tre concetti principali:

- 1) la convergenza dei segnali di trasduzione dell'estrogeno e dei fattori trofici;
- 2) l'induzione, da parte dell'estrogeno, della sintesi di specifici fattori trofici e viceversa;
- 3) la dipendenza reciproca degli effetti indotti dai fattori trofici e dall'estrogeno [Fig.11].

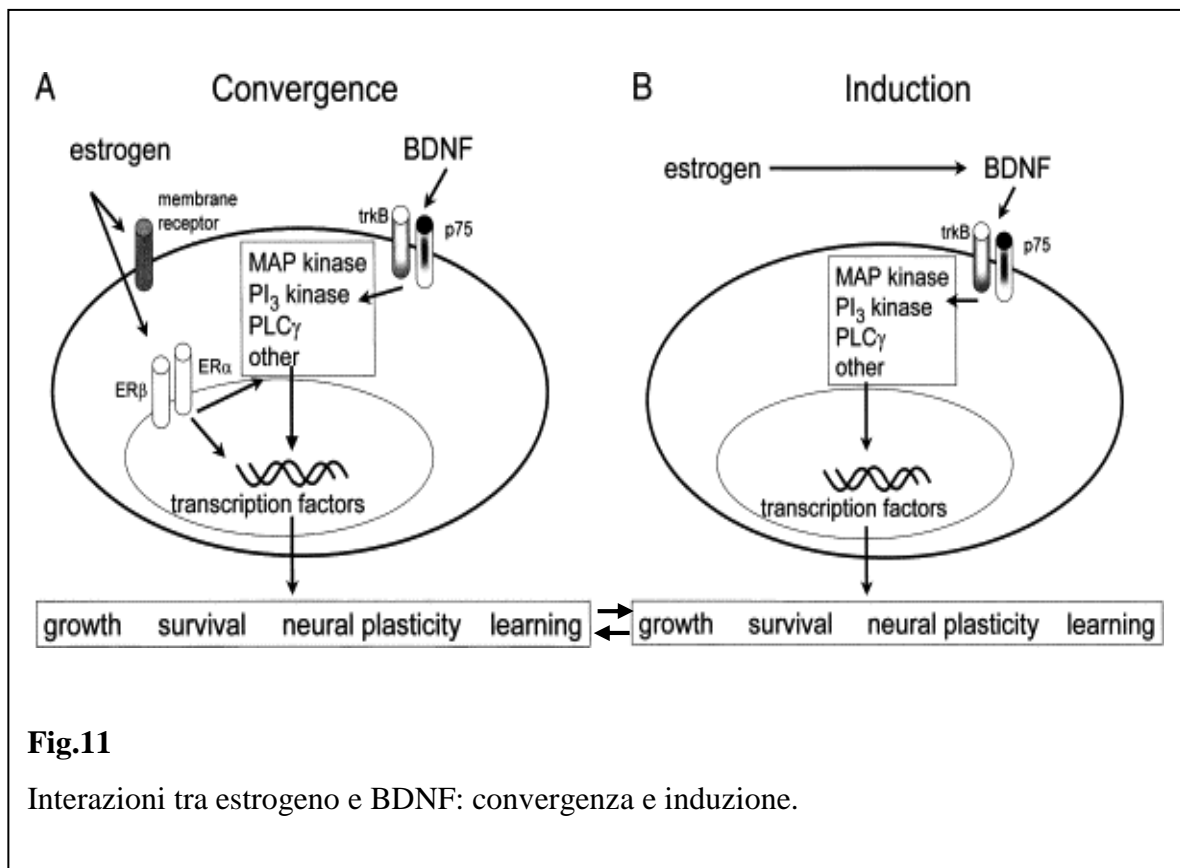


Fig.11

Interazioni tra estrogeno e BDNF: convergenza e induzione.

Gli effetti dell'estrogeno infatti comprendono sia alterazioni del comportamento (Sandstrom et al., 2004; Frick et al., 2004; Gibbs et al., 2005; Luine et al., 2003; Luine et al., 1998; Frye et al., 2005; Lacreuse et al., 2002; Rissman et al., 2002), che della struttura (morfologia, densità e numero delle spine dendritiche) e della fisiologia (potenziamento

dell'input glutamatergico nell'area CA1 dell'ippocampo) del neurone. Il BDNF è stato dimostrato esercitare, se non tutti, molti di questi effetti.

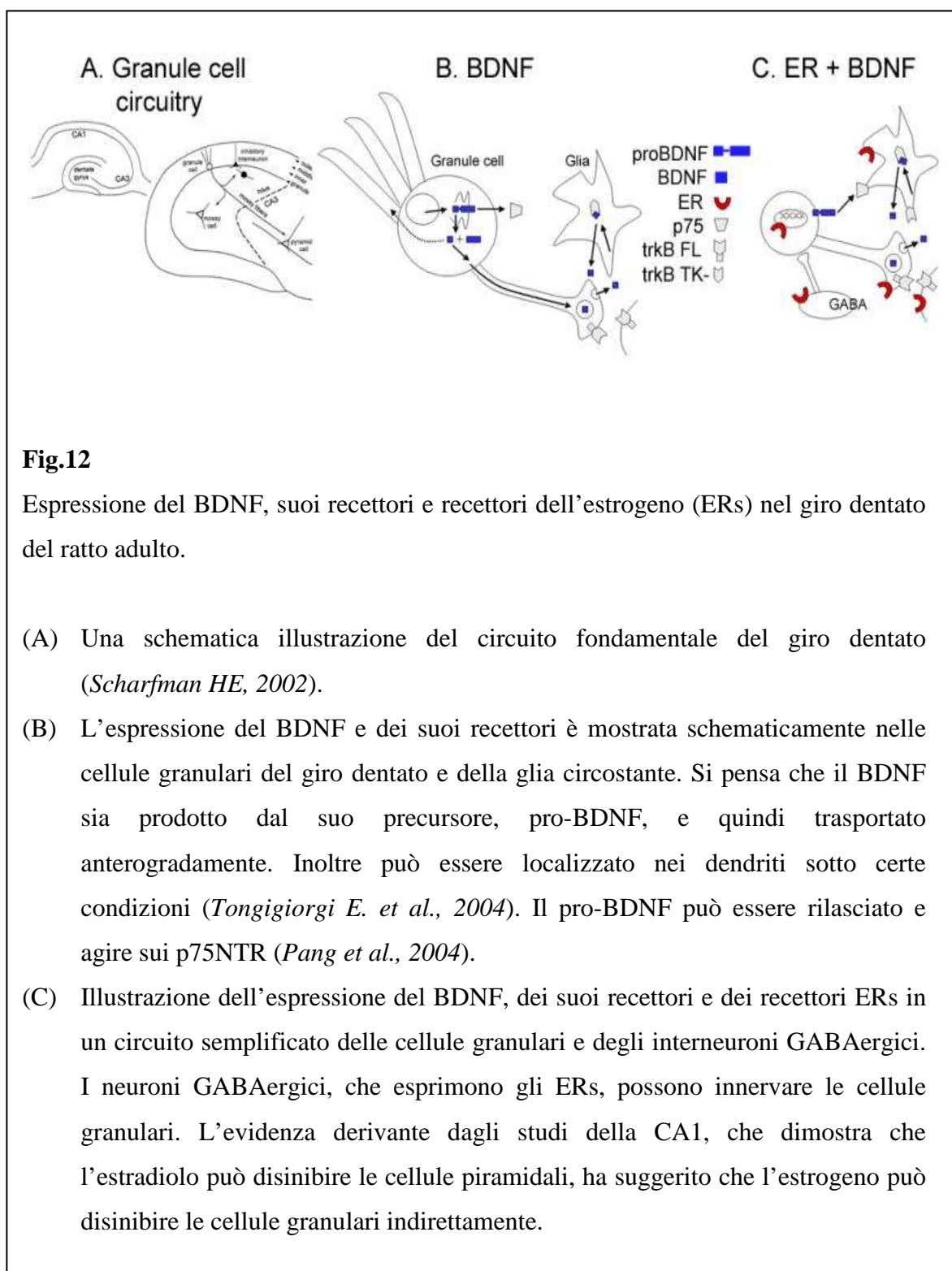
Entrambi hanno mostrato esercitare effetti altamente variabili, spesso facilitando le funzioni ippocampali. Sono noti, inoltre, per ridurre l'eccitotossicità neuronale e quindi promuovere la neuro-protezione. Entrambi promuovono la trasmissione glutamatergica (Woolley, 1998; Foy et al., 1999), la modulazione dei recettori NMDA e in modo specifico la subunità NR2B (Yamada et al., 2003; Adams et al., 2004), la facilitazione della memoria (Luine et al., 1997; Yamada et al., 2003; Tyler et al., 2002; Daniel et al., 1999), l'aumento delle spine dendritiche, del numero delle sinapsi (Tyler et al., 2002; Segal et al., 2001) e la promozione della neurogenesi nel giro dentato (Tanapat et al., 1999; Linnarsson et al., 2000).

Una relazione molto importante tra estrogeno e BDNF è costituita dalla via di trasduzione e dai fattori di trascrizione implicati nei loro effetti. Entrambi infatti mediano l'attivazione della protein-chinasi mitogenica (MAPK) (Yamada et al., 2003; Toran-Allerand et al., 1999; B et al., 2000), la fosforilazione del fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3-K), l'attivazione della protein-chinasi Ca²⁺-calmodulina-dipendente (CaMKII) (Sawai et al., 2002; Blanquet et al., 2003) e l'attivazione dell'elemento di risposta al c-AMP (CREB) (Ernfors et al., 2003; McEwen, 2001).

Le azioni dell'estrogeno nel SNC sono mediate da sistemi recettoriali simili a quelli rilevati negli organi bersaglio riproduttivi. La più importante componente dell'azione dell'estrogeno è mediata dalla via dei recettori nucleari, che in seguito al legame con l'ormone agiscono essi stessi come fattori di trascrizione e controllano in questo modo l'espressione di geni sensibili all'estrogeno. La localizzazione dei recettori per l'estrogeno (ER) nell'ippocampo è difficile da definire, ma sicuramente questi sono presenti in molti tipi di cellule.

Il BDNF invece è espresso in elevate concentrazioni in molte aree del SNC, fra le quali anche nell'ippocampo, dove l'estrogeno è riconosciuto avere effetti importanti. Nell'ippocampo di ratti adulti, l'mRNA che codifica per il BDNF è espresso in tutti i principali neuroni, per esempio nelle cellule granulari del giro dentato e nelle cellule piramidali ippocampali. È interessante osservare che il BDNF non è uniformemente tradotto, perché la più alta concentrazione appare essere localizzata nelle cellule granulari, con un'espressione relativamente debole nelle cellule piramidali (*Binder et al., 2001*). Nelle cellule granulari il BDNF è trasportato in maniera anterograda nell'assone (*Conner et al., 1997*).

La localizzazione ippocampale del recettore TrkB è stata largamente dimostrata (*Drake et al., 1999*) [Fig.8] e si è visto che questo si ritrova sia a livello neuronale, che nella glia (*Drake et al., 1999*) [Fig.12].



Il recettore p75 è presente sulle afferenze dei neuroni del setto mediale che innervano l'ippocampo (*Dougherty et al., 1999*).

Tuttavia l'estrogeno e il BDNF hanno molto più in comune della sola via di segnalazione. Infatti durante il ciclo mestruale sono state osservate variazioni significative dei livelli di BDNF (*Lommatzsch et al., 2005*), in particolare è stato osservato un alto livello di BDNF durante la fase luteale e follicolare con un andamento simile ai livelli di estrogeno (*Lommatzsch et al., 1999*) [Fig.13].

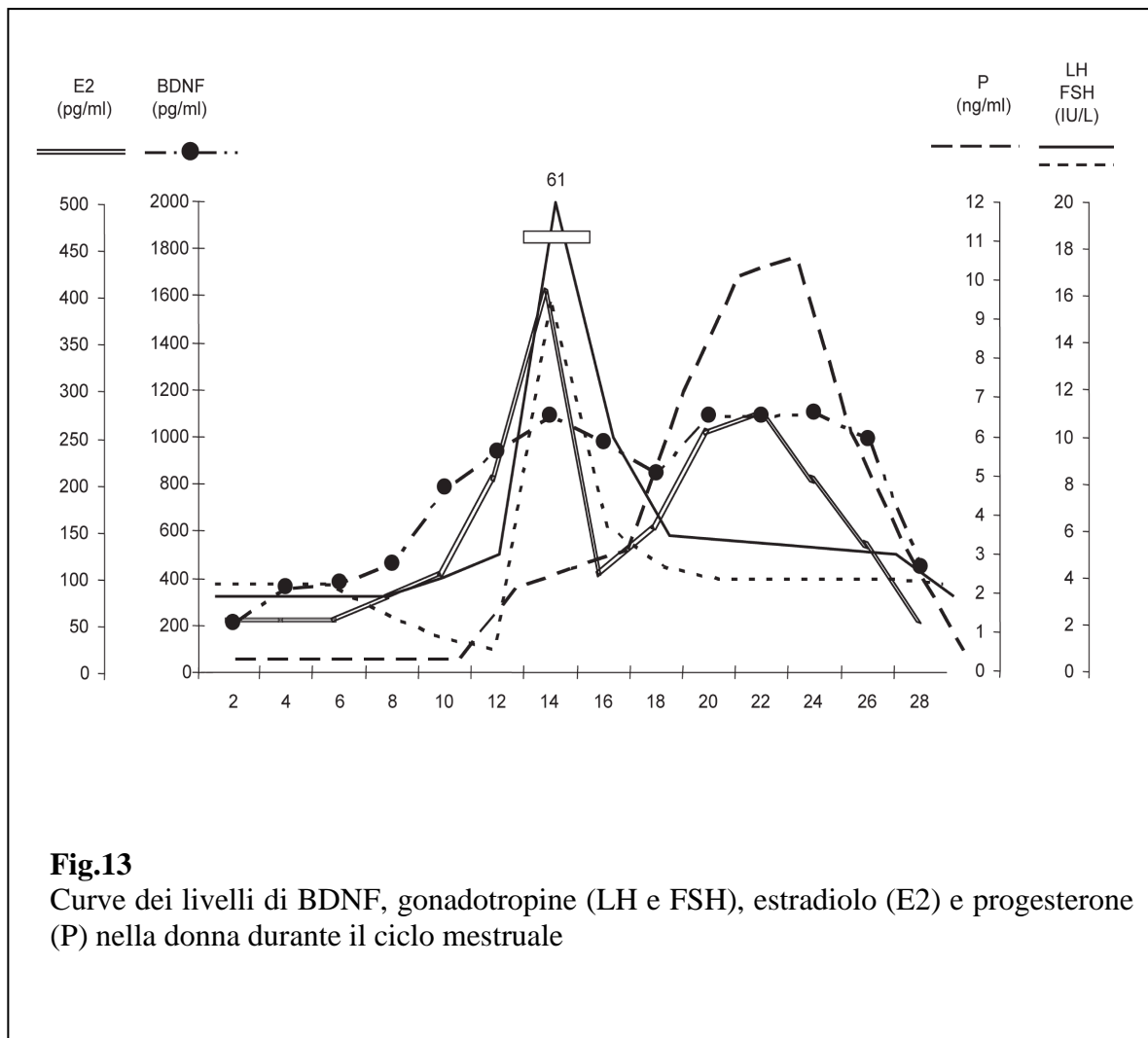


Fig.13

Curve dei livelli di BDNF, gonadotropine (LH e FSH), estradiolo (E2) e progesterone (P) nella donna durante il ciclo mestruale

Le somministrazioni di estradiolo nei ratti ovariectomizzati aumentano i livelli sia di mRNA per il BDNF che della proteina e questo suggerisce che ci sia una stretta correlazione funzionale fra il BDNF e l'estrogeno (*Gibbs et al., 1999; Scharfmdnn et al., 2003*).

Inoltre molti cambiamenti elettrofisiologici e funzionali dei neuroni ippocampali sono influenzati da entrambi. Per esempio, numerosi studi mostrano un aumento dell'apprendimento ippocampo-dipendente; ciò è stato anche dimostrato in ratti maschi, nei quali la manipolazione aumenta i livelli di estradiolo. Al contrario, l'apprendimento è più scarso quando i livelli di estradiolo sono bassi, per esempio in topi knock-out per l'aromatasi (*Martin et al., 2003*). Molti studi di apprendimento spaziale, che rappresenta un tipico comportamento ippocampo-dipendente, mostrano un miglioramento delle performance in seguito a somministrazione di estradiolo, ma anche altri tipi di memoria possono migliorare non solo in seguito agli effetti ippocampali, ma anche attraverso altri effetti ippocampali-indipendenti (*Sandstrom et al., 2004; Frick et al., 2002; Gibbs et al., 1999; Luine et al., 2003; Luine et al., 1998; Frye et al., 2005; Lacreuse et al., 2002; Rissman et al., 2002*). La relazione dose-risposta tra estradiolo e BDNF e gli effetti da essi generati appaiono essere non lineari, infatti dosi basse facilitano le risposte, mentre dosi alte le inibiscono.

Per quanto riguarda il potenziamento della trasmissione glutammatergica, focalizzando l'attenzione solo sull'area CA1 dell'ippocampo adulto, molti studi suggeriscono che l'estradiolo esogeno o il BDNF possano potenziare la trasmissione delle fibre collaterali di Schaffer e facilitare la LTP. Sia l'estradiolo che il BDNF esercitano le loro azioni nell'area CA1 dell'ippocampo attraverso la fosforilazione delle subunità NR1 e NR2 del recettore NMDA (*Smith et al., 2005; Foy et al., 1999; Bi R et al., 2003; Rudick et al., 2001; Zamani et al., 2004; Pozzo-Miller et al., 1999; Sun et al., 2001; Levine et al., 1998; Crozier et al., 1999*). Entrambi inoltre possono regolare le correnti al K^+/Ca^{2+} -

dipendenti nelle cellule piramidali dell'area CA1 (*Kumar et al., 2002; Kramar et al., 2004; Carrer et al., 2003*).

Numerosi studi indicano che sia l'estradiolo che il BDNF sono in grado di modificare la densità, la forma e la lunghezza delle spine dendritiche (*Murphy et al., 1998; Lee et al., 2004; Hao et al., 2003; Leranath et al., 2000; Leranath et al., 2002; Woolley et al., 1992; Woolley et al., 1990; Woolley et al., 1994; Alonso et al., 2004; Hartmann et al., 2004; Tyler et al., 2003*).

Entrambi inoltre sono in grado di aumentare il tasso di neurogenesi nel giro dentato (*Scharfman et al., 2005; Tanapat et al., 1999; Ormerod et al., 2004; Ormerod et al., 2003*).

Alcuni studi suggeriscono che l'influenza dell'estrogeno e del BDNF si estende anche nella glia (*Garcia-Ovejero et al., 2005; Rose et al., 2003*).

Da quanto detto si può dedurre che la sintesi del BDNF è indotta dall'estrogeno, e questo è supportato da studi che mostrano che esiste un ERE funzionale sul gene del BDNF (*Sohrabji et al., 1995*). L'estrogeno può indurre potenzialmente l'espressione dell'mRNA e della proteina BDNF nel cervello. In aggiunta si è visto che l'ovariectomizzazione riduce l'mRNA del BDNF e la terapia estrogenica sostitutiva lo ripristina (*Sohrabji et al., 1995; Singh et al., 1995; Liu et al., 2001; Berchtol et al., 2001; Cavus et al., 2003*). Tuttavia in alcune aree cerebrali, la somministrazione di estradiolo non determina aumento dei livelli di BDNF dopo l'ovariectomizzazione (*Jeziarski et al., 2000*). Sempre nell'ippocampo, alcuni ricercatori ritengono che la maggiore espressione del BDNF modulata dall'estrogeno si trovi nelle aree CA1 e CA3 (*Solum et al., 2002; Zhou et al., 2005*), altri invece ritengono che si trovi nel giro dentato (*Berchtol et al., 2001, Scharfman et al., 2003*).

Secondo alcuni studi non esiste necessariamente una relazione tra elevati livelli di proteina BDNF ed elevati livelli di estrogeno (*Gibbs et al., 1998*). Infatti in alcuni casi lo

stress può aumentare, ma anche diminuire la sintesi di BDNF (*Franklin et al., 2006; Marmigere et al., 2003; Murakami et al., 2005*), mentre negli animali giovani le interazioni tra estrogeno e BDNF possono essere molto diverse da quelle descritte negli adulti.

Un'altra correlazione tra livelli di estrogeno e BDNF è ben descritta da Scharfman (*Scharfaman et al., 2003*), il cui studio ha dimostrato che i livelli di BDNF nelle fibre muscolari sono elevati nel giorno del proestro, quando i livelli di estrogeno appaiono molto alti, mentre diminuiscono durante il metestro quando i livelli di estrogeno sono bassi.

In breve, questi studi suggeriscono che l'estradiolo può indurre l'espressione del BDNF sia in condizioni fisiologiche, come il ciclo estrale, che non fisiologiche, per esempio in seguito a ovariectomia. Tuttavia non è dimostrato sufficientemente che l'effetto dell'estradiolo sia lo stesso del BDNF.

LTP e plasticità sinaptica

La plasticità sinaptica può essere definita come un “cambiamento dipendente dall’esperienza” (*Bliss e Collingridge, 1993*). A livello cellulare è ormai dimostrato che il processo di codifica delle informazioni da parte del cervello implichi dei cambiamenti, dipendenti dall’attività, nella forza delle connessioni sinaptiche tra i neuroni. I cambiamenti stabili nella forza delle sinapsi sono di sicuro importanti nel deposito delle informazioni durante la formazione della memoria (*Morris, 2003*). Un meccanismo molto studiato a questo proposito è il potenziamento sinaptico a lungo termine (*Long Term Potentiation, LTP*), che consiste in un persistente incremento della forza sinaptica che può essere rapidamente indotto da una stimolazione ad alta frequenza (HFS) dell’impulso eccitatorio.

Tra i primi ad avanzare un’ipotesi sulle condizioni che provocano i cambiamenti sinaptici fu lo studioso canadese D. Hebb, il quale negli anni ‘40 sosteneva che “*quando un assone di una cellula A è abbastanza vicino ad una cellula B da poterla eccitare ripetutamente, oppure riesce ad attivarla in modo consistente, in una o in entrambe le cellule avviene un certo processo di crescita o cambiamento metabolico in modo che l’efficienza delle cellule stesse risulti aumentata*”.

Successivamente Bliss e collaboratori nel 1973 dimostrarono che la stimolazione ad alta frequenza delle fibre presinaptiche della via perforante dell’ippocampo di coniglio determinava un aumento della risposta da parte dei neuroni postsinaptici. Bliss chiamò questo effetto *Long Term Potentiation* a causa dell’aumento del potenziale post-sinaptico o della corrente per un periodo prolungato.

Il fenomeno della LTP si può suddividere in tre fasi: induzione, espressione e mantenimento.

Induzione della LTP

L'induzione si riferisce agli eventi iniziali che danno inizio al processo. La maggior parte dei sistemi nei quali la LTP è stata studiata utilizzano il glutammato come neurotrasmettitore ed i recettori che esso attiva. I recettori per il glutammato si dividono in due tipi: i recettori metabotropici (mGluR), che sono accoppiati a proteine G che a loro volta possono attivare fosfolipasi C (PLC) o inibire l'adenilato ciclasi, e i recettori ionotropici, che formano canali ionici, e che a loro volta si suddividono in recettori che rispondono in modo ottimale all'N-metil-D-aspartato (NMDA) e quelli che rispondono all'acido kainico (KA) o all'acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA). Inoltre i recettori NMDA, al potenziale di riposo, sono bloccati da ioni Mg^{2+} , e possono attivarsi solo se in concomitanza del legame del glutammato c'è anche una depolarizzazione locale della membrana.

Le sinapsi attive rilasciano il glutammato, il quale va a legarsi sia al recettore AMPA, inducendo un'iniziale depolarizzazione locale della membrana, sia al recettore NMDA, provocando un rapido aumento del Ca^{2+} nelle spine dendritiche del neurone postsinaptico. Il Ca^{2+} all'interno della cellula è in grado di attivare i canali al Ca^{2+} -voltage dipendenti presenti nelle vescicole citoplasmatiche e quindi di mobilitare ulteriore Ca^{2+} dai depositi intracellulari.

Un altro meccanismo di induzione della LTP è mediato dai recettori metabotropici, che a differenza di quelli ionotropici possono localizzarsi sia a livello postsinaptico che presinaptico. Le fosfolipasi C attivate da questi recettori scindono i fosfolipidi di membrana per formare diacilglicerolo (DAG) e inositolo 1,4,5, trifosfato (IP3); il DAG modula l'attività del canale attraverso una PKC mentre l'IP3 mobilita il Ca^{2+} dai magazzini intracellulari favorendone il rilascio.

Espressione della LTP

Una volta iniziata la LTP è in grado di indurre sia un aumento del rilascio del neurotrasmettitore da parte del neurone presinaptico sia un'umentata recettività a livello postsinaptico.

Mantenimento della LTP

La LTP evocata da una stimolazione afferente ad alta frequenza (HSF-LTP) è tipicamente divisa in una fase precoce e una tardiva.

La fase precoce è di breve durata (1-2 h), è dipendente da modificazioni covalenti di varie proteine già presenti nella cellula e dalla mobilitazione delle proteine verso la sinapsi, e non richiede la sintesi di nuove proteine.

La fase ritardata, più duratura, richiede la sintesi “*ex novo*” di mRNA e quindi la formazione di nuove proteine (*Otani e Abraham, 1989; Matthies et al., 1990; Nguyen et al., 1994; Nguyen e Kandel, 1996; Davis et al., 2000; Raymond et al., 2000; Kandel, 2001; Kelleher et al., 2004b*).

Sebbene i meccanismi molecolari che regolano l'espressione e il mantenimento della LTP non siano ancora del tutto chiariti, il pensiero attuale è che la HSF-LTP tardiva richieda l'attivazione del segnale extracellulare (ERK), la conseguente fosforilazione ERK-dipendente del fattore di trascrizione nucleare di legame al Ca^{2+} e al c-AMP (CREB), e la successiva trascrizione dei geni sotto il controllo di CREB (*Impey et al., 1996, 1998; Davis et al., 2000*). L'attivazione di ERK, una protein-chinasi appartenente alla famiglia delle MAPK (chinasi mitogeniche), dovuta al legame del BDNF ai suoi recettori TrkB comporta la fosforilazione della Ser133 di CREB (*Impey et al., 1998; Davis et al., 2000*). CREB indurrebbe l'espressione di geni precoci (IEGs), quali ad esempio *c-fos* e *c-jun*, il cui prodotto potrebbe a sua volta indurre l'espressione di geni tardivi che potrebbero codificare le proteine responsabili dei cambiamenti a livello sinaptico.

Numerosi studi hanno dimostrato che una varietà di IEGs codificanti fattori di trascrizione e proteine non attivatrici della trascrizione sono attivate conseguentemente all'induzione dell'LTP grazie all'attivazione ERK-dipendente di CREB (Cole et al., 1989; Wisden et al., 1990; Abraham et al., 1993; Meberg et al., 1993; Qian et al., 1993; Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Williams et al., 1995; Lanahan et al., 1997).

Altri fattori di trascrizione della famiglia degli IEGs, come Arc e zif268, sono implicati nell'LTP tardivo e nella memoria a lungo termine (Guzosky et al., 2000; Jones et al., 2001).

Arc (Activity-Regulated Cytoskeleton protein) è l'unico mRNA conosciuto che rapidamente traffica nei processi dendritici dopo l'induzione della LTP, mentre zif268 regola la trascrizione di geni tardivi. Usando l'iniezione intra-ippocampale dell'oligonucleotide antisenso di Arc si è evidenziato che Arc è richiesto per il consolidamento, ma non per l'acquisizione, di informazioni nei test di memoria ippocampo-dipendenti (Guzowski et al., 2000). Ying e collaboratori (2002) esaminarono l'espressione di Arc e zif268 successiva alla LTP indotta dal BDNF. L'espressione sia dell'mRNA di Arc sia della proteina risultarono entrambe aumentate, mentre l'espressione di zif268 rimase immutata.

Gli *immediated early genes* (IEGs) giocano un ruolo importante nella plasticità neuronale e quindi nell'LTP (Clayton, 2000). Esistono due classi differenti di IEGs: i fattori di trascrizione e gli effettori degli IEGs. Tra gli effettori degli IEG, uno codifica per la proteina Arc (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Vi sono numerose evidenze che dimostrano come attraverso l'aumento dell'espressione di Arc sia possibile distinguere i neuroni e le sinapsi che mostrano modificazioni della funzione e della struttura attività-dipendenti (Steward e Worley, 2001). Per esempio dopo la stimolazione sinaptica o in seguito a test di apprendimento comportamentale, l'mRNA di Arc nell'ippocampo è rapidamente indotto e si distribuisce nei dendriti per facilitare le modificazioni sinapsi-

specifiche. La disregolazione dell'espressione di Arc ottenuta usando oligonucleotidi antisenso causa deficit sia nell'LTP sia nei test di apprendimento comportamentale (*Guzowski et al., 2000*). Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione di Arc nella corteccia e in altre regioni cerebrali è regolata dalla 5-idrossi-triptamina (serotonina). In particolare i livelli dell'mRNA di Arc aumentano in modo regione-specifico in seguito al trattamento con sostanze che aumentano la concentrazione di serotonina, quali i farmaci SSRI, (inibitori del reuptake della serotonina), e gli agonisti dei recettori 5-HT₂ (*Pei et al., 2000*). L'espressione di Arc è inoltre regolata dalla noradrenalina e dalla dopamina (*Fosnaugh et al., 1995; Kodama et al., 1998; Cirelli e Tononi, 2000; Tan et al., 2000*).

È stato ormai dimostrato che la depressione è associata ad una carenza nella plasticità sinaptica e gli antidepressivi possono migliorare o rimpiazzare i processi anormali (*Grahame-Smith, 1997; Manji et al., 2001; Duman, 2002*). I farmaci antidepressivi che hanno come bersaglio i neuroni monoaminergici possono anche aumentare l'espressione di Arc; infatti Pei et al. (2003) dimostrano che il trattamento cronico con paroxetina, imipramina e venlafaxina determina un aumento dell'espressione dell'mRNA di Arc se paragonato ai ratti di controllo trattati con la soluzione salina in maniera regione-specifica.

L'obiettivo dello studio di Molteni e collaboratori (2008) è stato invece quello di comprendere in che modo la trascrizione e la traduzione di Arc vengano modificate in risposta al trattamento in acuto e in cronico con un nuovo antidepressivo, la duloxetina. I risultati di questo studio dimostrarono un limitato aumento dei livelli dell'mRNA di Arc in alcune zone del cervello dopo somministrazione acuta di duloxetina, mentre in seguito alla somministrazione cronica è stato dimostrato un marcato aumento dell'espressione di Arc nella corteccia frontale. Questi cambiamenti osservati dopo la prolungata esposizione alla duloxetina sono fortemente correlati ai livelli di mRNA del BDNF (*Calabrese et al., 2007*).

Esperimenti che coinvolgono l'inibizione del BDNF endogeno e il segnale associato ai recettori tirosin-chinasici TrkB suggeriscono che il BDNF è richiesto per l'induzione dell'LTP tardivo che determina cambiamenti duraturi nell'efficacia delle sinapsi ippocampali (*Patternson et al., 1996; Figurov et al., 1996; Kang et al., 1997; Korte et al., 1998; Chen et al., 1999; Minichiello et al., 1999*). Schumann e collaboratori hanno dimostrato che il BDNF promuove la trasmissione a lungo termine dalle fibre collaterali di Schaffer alle sinapsi della CA1 dell'ippocampo (*Kang e Schuman, 1995*). Il BDNF stimola la sintesi di proteine nei dendriti a partire da mRNA già esistente (*Kang e Schuman, 1996; Aakalu et al., 2001*).

Spine dendritiche

Struttura

Le spine dendritiche sono minuscole protrusioni che emergono dai dendriti dei neuroni; sono caratterizzate da un collo e da una testa a forma di bulbo capace di ricevere input da parte di sinapsi eccitatorie e produrre una risposta postsinaptica (*Hering e Shang, 2001*).

Le spine dendritiche costituiscono il principale sito d'azione dei segnali eccitatori nella maggior parte dei neuroni. I neuroni che possiedono spine dendritiche sono principalmente di tipo glutammatergico (per esempio neuroni piramidali) o GABAergico (neuroni di Purkinje), mentre alcune classi di neuroni non ne possiedono, come per esempio gli interneuroni GABAergici (*Hering e Sheng, 2001*).

La lunghezza di una spina dendritica in genere varia tra i 0,5 e i 2 μm , ma può raggiungere i 6 μm nella regione CA3 dell'ippocampo (*Chicurel et al. 1992*); il volume varia da meno di 0.01 μm^3 a 0.8 μm^3 (*Harris 1999*), mentre la densità oscilla tra 1 e 10 spine/ μm di dendrite maturo (*Sorra e Harris, 2000*). Attraverso dettagliati studi anatomici su tessuto cerebrale fissato, in base alla loro forma le spine dendritiche vengono classificate in sottili (thin), tozze (stubby), a fungo (mushroom) e a forma di coppa (cup-shaped) (*Harris et al. 1992; Chang et al. 1984*) [Fig. 14].

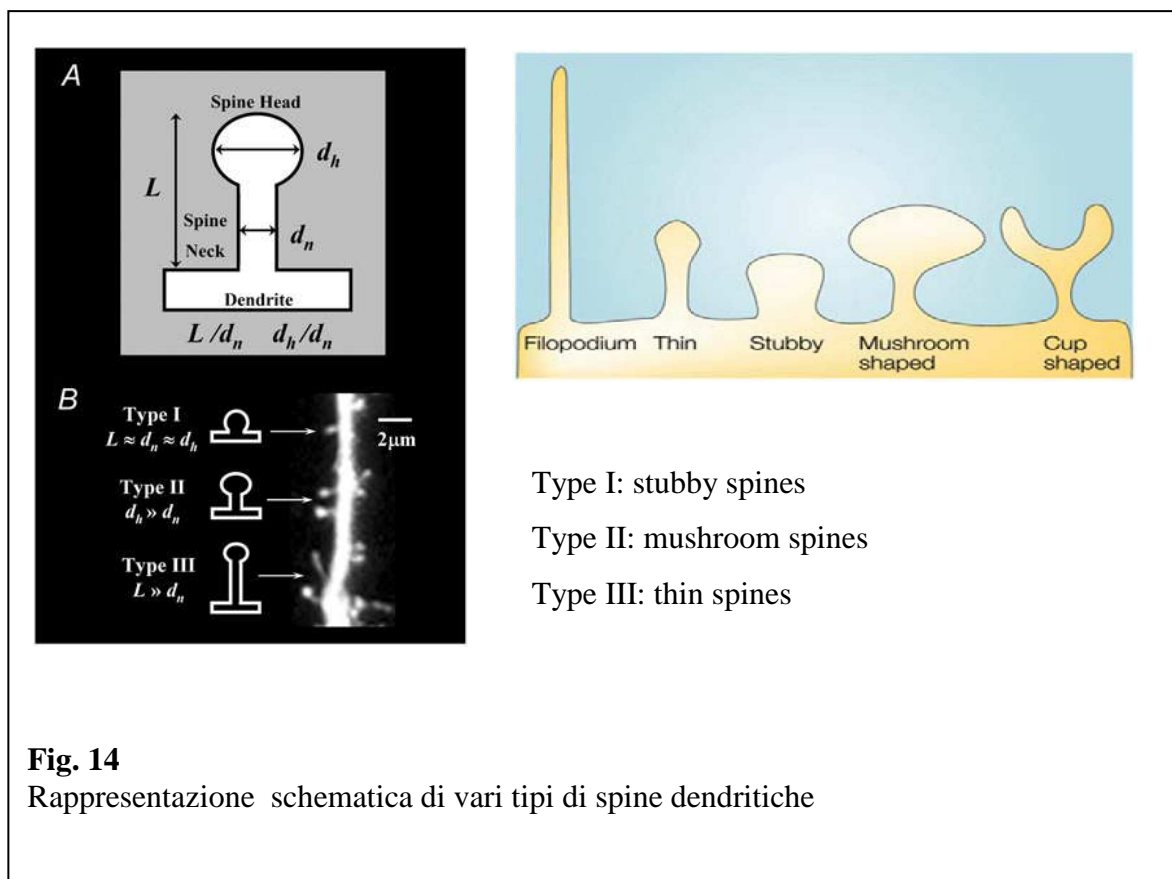


Fig. 14

Rappresentazione schematica di vari tipi di spine dendritiche

La forma delle spine può quindi variare sia per la lunghezza e lo spessore del collo, sia in base alla forma e alla dimensione della testa. Nel cervello adulto la maggior parte delle spine si trovano nella forma “thin”. Le spine “thin” hanno una lunghezza superiore al diametro del collo della spina e terminano con una piccola testa (inferiore a 0.6 μm di diametro). Le spine “stubby” sono corte e larghe, e non presentano il collo. Le spine “mushroom” hanno un collo stretto e una grande testa irregolare ($>0.6 \mu\text{m}$ di diametro). Nell’area CA1 e nel giro dentato dell’ippocampo maturo questi tipi di spine dendritiche hanno un’unica sinapsi sulla loro testa. Esistono anche spine ramificate (branched) che presentano più teste che emergono da un’origine comune. In queste aree ogni testa delle spine ramificate è collegata con un diverso assone presinaptico mentre altre teste non hanno un partner presinaptico.

Classificare le spine in base alla loro forma si è dimostrato utile a garantire che l’intera gamma di morfologie possa essere rappresentata attraverso ricostruzioni

tridimensionali e per determinare se si verificano variazioni morfologiche per mezzo di manipolazioni sperimentali (Kirov *et al.*, 1999; Sorra e Harris, 1998; Chicurel e Harris, 1992; Harris *et al.*, 1992; Harris e Stevens, 1989). Tuttavia la classificazione arbitraria delle spine in queste quattro categorie non tiene conto della grande eterogeneità della loro morfologia che emerge anche su un singolo dendrite (Sorra e Harris, 2000). Studi di imaging in vivo hanno rivelato che le spine sono elementi molto dinamici; nonostante la loro forma tenda a stabilizzarsi con la maturazione (Holtmaat *et al.* 2005), e una piccola proporzione di esse è caratterizzata da un continuo turnover: alcuni studi hanno infatti mostrato che le spine di tipo “thin” sono in grado di sorgere e sparire in pochi giorni, mentre le “mushroom” possono mantenersi per diversi mesi (Holtmaat *et al.* 2005; Zuo *et al.* 2005; Majewska *et al.* 2006).

I filopodi costituiscono una particolare forma di spina dendritica caratterizzata da un collo molto lungo e sottile e dall'assenza della testa, sono abbondantemente presenti nei neuroni in via di sviluppo ma possono trovarsi anche nel cervello adulto in situazioni particolari, per esempio in seguito all'induzione della plasticità, ad ischemia o durante la rigenerazione dopo un danno neuronale. I filopodi dendritici sono strutture estremamente mobili e flessibili in grado di cambiare velocemente la loro conformazione, che dura solo alcuni minuti (Parnass *et al.* 2000; Lendvai *et al.* 2000). Il cambiamento della forma è determinato da un rimodellamento del citoscheletro di actina e l'attività di protusione actina-dipendente. Grazie alla loro motilità i filopodi sono adatti per l'esplorazione dello spazio attorno ai dendriti. Essi prendono ripetutamente contatti con gli assoni vicini, tuttavia solo un sottoinsieme selezionato di questi contatti viene stabilizzato nel giro di pochi minuti attraverso la generazione di un segnale dato dalla variazione di concentrazione del calcio; inoltre i filopodi sono in grado di discriminare tra gli assoni con cui contraggono una sinapsi, e infatti non stabiliscono contatti con gli assoni di neuroni inibitori (Lohmann *et al.* 2008); ciò suggerisce che la capacità di riconoscere gli assoni

adatti per instaurare un collegamento è dovuta all'espressione o al riconoscimento di specifici segnali molecolari.

Si pensa che i filopodi dendritici possano essere morfologicamente e strutturalmente trasformati in spine dendritiche; infatti durante la prima settimana di vita postnatale emergono e interagiscono con gli assoni per formare le prime sinapsi; durante la seconda settimana cominciano poi a prevalere le spine di tipo “thin”, “stubby” e “mushroom” (*Harris et al. 1999*)

Con lo sviluppo successivo gli alberi sinaptici e le spine “stubby” diminuiscono di numero e la maggior parte delle sinapsi si trova sulle spine “thin” e “mushroom” (*Fiala et al. 1998*). Le sinapsi inizialmente si formano a partire da spine dinamiche simili a filopodi che successivamente vengono trasformati in spine stabili in modo quasi coincidente con la formazione delle specializzazioni postsinaptiche (*Okabe et al. 2001; Marrs et al. 2001*). È stato inoltre osservato che le spine “stubby” e altri tipi di spine possono originare dai filopodi in neuroni ippocampali in via di sviluppo (*Parnass et al. 2000*). Nel medesimo studio è stata evidenziata anche la trasformazione opposta, cioè il passaggio da spina stabile a filopodo. Sembra che i filopodi possano trasformarsi in spine senza essere prima riassorbiti dall'albero sinaptico. Molto probabilmente la trasformazione di un filopodo in una spina è un processo reversibile controllato da fattori locali come l'attività sinaptica.

Oltre che per forma e dimensione, le spine dendritiche si differenziano anche per gli organelli che contengono e per molecole specifiche. In generale, le spine di grandi dimensioni formano in proporzione sinapsi più estese e contengono un maggior numero di organuli. Analisi effettuate al microscopio elettronico hanno messo in evidenza un ispessimento più denso della superficie della spina localizzato sotto la membrana della testa; esso è caratterizzato dalla presenza di numerosi organelli citoplasmatici e viene definito “densità post sinaptica” (PSD). La PSD occupa circa il 10% della superficie della spina ed è esattamente allineata con la zona attiva presinaptica. Poiché la dimensione della

testa delle spine è proporzionale alla superficie del PSD, al numero dei recettori postsinaptici (*Nusser et al., 1998*) e al numero delle vescicole presinaptiche legate (*Schikorski et al., 1997*), la crescita della testa delle spine è probabilmente correlata a un rafforzamento della trasmissione sinaptica.

La maggior parte delle sinapsi ha un unico e continuo PSD per spina, ma alcuni PSD si rivelano discontinui o perforati, e possono essere ulteriormente classificati come “*fenestrati*” , “*a ferro di cavallo*” o “*segmentati*”. Il PSD contiene recettori per il glutammato di tipo AMPA e NMDA (*Nusser et al. 1998; Desmond et al. 1998*).

Uno dei principali organelli presenti all'interno della spina è il reticolo endoplasmatico liscio (SER); esso ha una forma allungata e schiacciata, è costituito da grandi cisterne e si trova in alcune spine in base alla dimensione della spina stessa (*Spacek e Harris, 1997*). Il SER probabilmente regola la concentrazione intracellulare di calcio nella spina, immagazzinandolo e rilasciandolo in risposta ad uno stimolo sinaptico (*Sabatini et al., 2001; Svoboda, 1999*). Alcune spine presentano un SER più complesso chiamato “*apparato della spina*” che è spesso associato alla presenza di poliribosomi e del reticolo endoplasmatico rugoso (*Steward et al., 1996, 1998*). La funzione dell'apparato della spina non è ancora chiaro. Tuttavia la sua ultrastruttura suggerisce che possa essere coinvolto nella sintesi di proteine legate alla membrana o a proteine di trasporto, in modo simile al reticolo endoplasmatico rugoso (RER) o al complesso di Golgi nel soma cellulare (*Spacek e Harris, 1997*). Nelle spine dendritiche, soprattutto in quelle di grandi dimensioni, sono state trovate anche vescicole rivestite, endosomi e corpi multivescicolari. I mitocondri sono generalmente assenti nella maggior parte delle spine dendritiche, anche se sono abbondanti nei dendriti. Nell'ippocampo i mitocondri sono stati trovati solamente nelle grandi spine dendritiche dell'area CA3 (*Chicurel e Harris, 1992*). A generare l'energia necessaria per la trasduzione del segnale nella spina è l'ATP che può diffondere

dai mitocondri presenti nel dendrite; in alternativa l'ATP può essere prodotto grazie alla glicolisi direttamente nella sinapsi (*Wu et al., 1997*).

Le spine dendritiche ippocampali hanno un citoscheletro costituito da actina che si distingue dal citoscheletro dendritico per l'assenza di microtubuli e filamenti intermedi (*Kaeck et al., 1997; Markham e Fifkova, 1986; Cohen et al., 1985; Matus et al., 1982*). Il citoscheletro delle spine partecipa a rapidi cambiamenti nella forma, che presumibilmente alterano la funzione sinaptica.

Le spine dendritiche contengono una complessa miscela di ioni, lipidi, proteine come per esempio molecole di segnalazione e di adesione cellulare, recettori per i neurotrasmettitori, canali ionici, proteine del citoscheletro e diversi enzimi (*Sorra e Harris, 2000*).

Plasticità delle spine dendritiche

Eterogenee per forma e dimensioni, le spine dendritiche non sono elementi statici, ma nel cervello adulto la loro morfologia cambia continuamente in funzione dell'attività neuronale, dell'esperienza e dell'apprendimento, riflettendo così la natura plastica delle connessioni sinaptiche (*Matus 2000; Lendvai et al. 2000; Trachtenberg et al. 2002; Zuo et al. 2005; Holtmaat et al. 2005*). La capacità di crescita e modellamento delle connessioni è tipica dello sviluppo (*Shatz, 1990*), ma persiste anche nell'adulto (*Gilbert e Wiesel, 1992*), e viene definita *plasticità neuronale*.

Gli studi che hanno esaminato gli effetti dell'esperienza sensoriale sulla plasticità sinaptica hanno mostrato cambiamenti sia nel numero che nella morfologia delle spine dendritiche; ratti stabulati in un ambiente arricchito hanno mostrato un aumento nel numero, nella dimensione e nella densità delle spine dendritiche (*Diamond et al. 1975*;

Leggio et al. 2005). Al contrario una riduzione delle esperienze sensoriali mediata da un allevamento al buio riduce la densità delle spine nella corteccia visiva, effetto parzialmente revertito dalla successiva esposizione alla luce (*Wallace e Bear, 2004*). Un altro studio (*Geinisman et al. 2000*) ha mostrato che l'apprendimento è in grado di modificare la forma delle spine nell'ippocampo.

Le sinapsi ippocampali e corticali subiscono modificazioni strutturali per dimensioni e forma in seguito a LTP “*in vitro*” e in seguito all'esperienza “*in vivo*” (*Matsuzaki et al. 2004; Holtmaat et al. 2006; Harvey et al. 2007*); inoltre le spine che si formano possono dar vita a nuove sinapsi funzionali ed eventualmente rimpiazzare le spine non attive (*Engert et al. 1999*). La LTP induce modificazioni del numero e della morfologia delle spine in regioni importanti per l'apprendimento, come l'ippocampo e la corteccia. Pare che l'aumento del numero delle spine sia dovuto a una nascita di nuove spine dendritiche piuttosto che al formarsi di queste dalla divisione di spine già esistenti (*Fiala et al., 2002*).

Grande importanza per quanto riguarda gli effetti sulle spine dendritiche rivestono anche le neurotrofine in generale, data la loro azione sulle sinapsi eccitatorie (*Poo, 2001; Tyler et al., 2002 a,b; Vicario-Abejon et al., 2002*); in modo particolare il BDNF è un importante candidato nel mediare i cambiamenti attività dipendenti delle spine dendritiche nel sistema nervoso centrale.

Una struttura anomala delle spine è spesso associata a vari disturbi neurologici, come la sindrome dell'X fragile, la sindrome di Down o di Rett (*Kaufmann et al. 2000*).

Gli ormoni sessuali sono in grado di alterare la densità delle spine dendritiche; le femmine di ratto infatti mostrano un maggior numero di spine rispetto ai maschi nella regione CA1 dell'ippocampo; inoltre la densità delle spine cambia anche nelle varie fasi del ciclo estrale (*Mong et al. 2001; Shors et al. 2001; Woolley et al. 1992; Yankova et al. 2001*). La densità delle spine dendritiche risulta essere aumentata nell'ippocampo di ratti

maschi in seguito a un evento stressante acuto, ma è ridotta nell'ippocampo di ratti femmina (*Shors et al. 2001*).

Di notevole interesse è anche l'influenza che la maternità e gli ormoni della gravidanza hanno per quanto riguarda la plasticità neuronale. È stato dimostrato che la gravidanza e gli ormoni che in questa fase vengono prodotti stimolano la proliferazione delle spine dendritiche nella regione CA1 dell'ippocampo femminile. Inoltre quest'incremento nel numero delle spine dendritiche sembra mantenersi stabile anche nel cervello delle femmine che sono nel periodo dell'allattamento, il cui profilo ormonale è differente se paragonato a quello di femmine nelle fasi terminali della gravidanza. Stabilito l'importante ruolo che l'ippocampo ha sulla memoria e sull'apprendimento, e l'influenza che le spine dendritiche hanno per quanto riguarda la regolazione molecolare del fenomeno dell'allattamento, gli studi ottenuti suggeriscono un miglioramento nel caratteristico comportamento che viene attuato dalle femmine durante la maternità. Sembra quindi che vengano migliorati i processi di apprendimento e memoria, in modo particolare la memoria spaziale (*Kinsley et al., 1999; Lambert et al., 2005; Tomizawa et al., 2003*), e un miglioramento si nota anche per quanto riguarda la reattività all'ambiente (*Wartella et al., 2003*); tutto questo avrebbe una notevole importanza nel contesto in cui la madre sviluppa tutta una serie di comportamenti specifici mirati alla cura e alla protezione della prole.

Le funzioni delle spine dendritiche

Le spine dendritiche probabilmente si sono evolute per sostenere il vasto numero di sinapsi che si trovano nei singoli neuroni. I Platelmini (Planaria) sono i più semplici organismi che possiedono simmetria bilaterale e un cervello primitivo. Diversi tipi di neuroni di Planaria possiedono spine dendritiche. Anche i neuroni di altri invertebrati mostrano delle strutture simili alle spine dendritiche. Per questo motivo è presumibile che le spine apparvero molto prima dello sviluppo del cervello dei mammiferi (*Reuter e Gustafsson, 1995; Sarnat e Netsky, 1985; Keenan et al., 1981*). Le spine dendritiche consentono ai dendriti di aumentare la loro superficie di sinapsi con l'assone; in pratica, esse consentono l'incremento della densità sinaptica.

Nel sistema nervoso centrale la maggior parte degli input eccitatori glutamatergici sono ricevuti dalle spine dendritiche dei neuroni postsinaptici. Le spine dendritiche ippocampali differiscono dalle spine presenti in altre aree del cervello (*Groves et al., 1994; de Zeeuw et al., 1990; Gerfen, 1988; Spacek e Hartmann, 1983*) e raramente presentano sinapsi inibitorie o modulatorie peptidergiche (*Trommald e Hulleberg, 1997; Harris e Stevens, 1989*). Le sinapsi modulatorie infatti tendono ad essere localizzate sui vicini alberi dendritici o sul soma dei neuroni dell'ippocampo.

Molti modelli biofisici suggeriscono che il collo delle spine dendritiche possa rallentare il trasferimento di cariche dalla sinapsi al dendrite genitore (*Segev e Rall, 1988, 1998*). Quindi vi è un potenziale più grande sul dorso della testa per un periodo transitorio dopo l'attivazione sinaptica che facilita l'apertura dei canali voltaggio-dipendenti. La maggior parte delle spine non sono lunghe e sottili abbastanza per impedire totalmente il trasferimento delle cariche dalla sinapsi al dendrite madre. Per questo motivo alcuni studiosi pensano che la funzione primaria delle spine dendritiche sia quella di fornire un micro compartimento in cui far avvenire alcune reazioni chimiche postsinaptiche, come

per esempio quelle che richiedono un'elevata concentrazione di calcio (*Svoboda et al., 1996; Harris e Stevens, 1989*).

Esperimenti di imaging hanno dimostrato che le spine dendritiche compartimentalizzano il calcio in modo tale che le variazioni intracellulari della sua concentrazione non si diffondono da una sinapsi attiva alle vicine sinapsi inattive. La forma e le dimensioni delle spine contribuiscono alle differenze della cinetica del calcio, le quali poi si traducono in diversi eventi di segnalazione sinaptica. Tali variazioni nella concentrazione del calcio localizzate nelle spine dendritiche sono il risultato del flusso ionico attraverso canali voltaggio-dipendenti o ligando-dipendenti (per esempio recettori NMDA) o del rilascio di calcio dai depositi intracellulari (SER). A seconda della fonte da cui deriva il calcio o del cambiamento di concentrazione dello stesso vengono evocati diversi meccanismi di segnalazione. Prove recenti suggeriscono che una concentrazione elevata di calcio è sufficiente a modificare la lunghezza delle spine.

Le spine possono agire come compartimenti chimici semiautonmi poiché sono separate dall'albero del dendrite attraverso un "collo" che spesso è molto sottile. La geometria del collo delle spine può controllare la cinetica e la grandezza della risposta postsinaptica del calcio.

Un'altra caratteristica utile delle spine è che il volume delle loro testa è abbastanza ridotto da permettere cambiamenti notevoli nei livelli di calcio intrasinali in risposta all'apertura di un piccolo numero di recettori o canali (*Sorra e Harris, 2000*).

Tuttavia il significato funzionale della plasticità delle spine non è ancora del tutto chiaro.

Neurogenesi

La gravidanza e il post partum costituiscono il periodo di massima plasticità sia a livello neuronale che comportamentale. Infatti, come già detto in precedenza, la gravidanza, il parto e l'allattamento sono accompagnati da drastiche fluttuazioni nei livelli dei neurosteroidi (*Stern e Levine, 1974; Garland et al., 1987*). Suscita quindi molto interesse il fatto che sia l'estradiolo che il corticosterone possano regolare anche la neurogenesi nell'adulto (*Cameron e Gould, 1994; Tanapat et al., 1999; Ormerod e Galea, 2001*).

La neurogenesi nel cervello adulto è un fenomeno che è stato descritto molto recentemente. Il fatto che le cellule neuronali o i loro diretti precursori possano dividersi è stato un argomento molto controverso e discusso per anni in neurobiologia. Joseph Altman per primo, grazie a studi di autoradiografia e all'utilizzo della timidina triziata, ipotizzò che nel cervello adulto alcune cellule in divisione fossero in grado di differenziarsi in cellule con una morfologia simile ai neuroni (*Altman et al., 1965*).

Oggi è universalmente dimostrato che la neurogenesi nell'adulto avviene in molte specie di mammiferi, incluso l'uomo, in due aree principali: la zona subventricolare del ventricolo laterale e la zona subgranulare del giro dentato dell'ippocampo (*Altman et al. 1967; Gould, 2007*).

Del ventricolo laterale le cellule di nuova formazione migrano e si integrano nei circuiti del bulbo olfattivo. Durante questa fase è importante il ruolo delle cellule gliali che avvolgono le cellule e le veicolano verso il bulbo olfattivo. Una volta raggiunto il bulbo, le cellule si differenziano in 2 tipi neuronali principali: cellule neuronali periglomerulari e cellule neuronali mitrali.

Nella zona subgranulare dell'ippocampo la migrazione avviene invece a distanze molto minori. Le cellule staminali proliferano nella zona subgranulare, lo strato più interno del giro dentato dell'ippocampo, migrano all'interno dello strato granulare e poi si differenziano in cellule granulari che possono integrarsi nei vari circuiti ippocampali.

Il fenomeno della neurogenesi è composto da almeno quattro fasi distinte: proliferazione cellulare, differenziamento, migrazione e sopravvivenza.

Una gran parte dei neuroni neoformati muore entro le prime due settimane (*Cameron et al. 1993*), ma particolari condizioni o l'esposizione a differenti sostanze, come gli ormoni steroidei, possono aumentarne o ridurne la sopravvivenza: ad esempio, l'estradiolo è in grado di incrementare inizialmente, ma successivamente di sopprimere, la proliferazione cellulare nelle femmine di ratto adulte (*Ormerod et al., 2003*). Sempre l'estradiolo inoltre altera la sopravvivenza cellulare in maniera indipendente dalla proliferazione (*Ormerod et al., 2004*). Al contrario elevati livelli di corticosterone sopprimono sia la proliferazione che la sopravvivenza cellulare in ratti maschi adulti (*Cameron e Gould, 1994*). Ciò suggerisce che l'ultimo periodo della gravidanza e l'allattamento, che sono accompagnati da cambiamenti nei livelli di estradiolo e corticosterone, possano alterare la neurogenesi nell'ippocampo delle madri.

La maternità può essere inoltre interpretata come un periodo di arricchimento ambientale, dove l'arricchimento è costituito dalla presenza dei figli; questa forma di arricchimento può avere un ruolo nell'alterare la neurogenesi nel periodo successivo al parto, proprio come un ambiente arricchito è in grado di aumentare la neurogenesi nei maschi e nelle femmine di ratto (*van Praag et al., 1999; Brown et al., 2003; Olson et al., 2006*).

I fattori che incidono sulla proliferazione cellulare possono agire sia sopprimendo che inducendo la mitosi nei neuroni precursori, mentre i fattori che incidono sulla sopravvivenza possono promuovere o compromettere il differenziamento e/o la

maturazione del neurone. Quindi il numero di nuovi neuroni può essere incrementato non solo attraverso un aumento della proliferazione, ma anche attraverso un aumento della sopravvivenza neuronale, due fenomeni che possono essere indipendenti tra loro. Per esempio, l'esposizione cronica alla fluoxetina aumenta la proliferazione cellulare ma non ha effetti sulla sopravvivenza (*Malberg et al. 2000*), mentre la stabulazione in un ambiente arricchito aumenta la sopravvivenza cellulare ma non ha effetti significativi sulla proliferazione (*Olson et al. 2006*).

La proliferazione cellulare può essere studiata usando analoghi esogeni della timidina, come la bromo-deossiuridina (BrdU), che ha la capacità di incorporarsi nel DNA delle cellule in divisione; attraverso l'uso di anticorpi specifici diretti contro la BrdU è possibile poi evidenziare le cellule nelle quali la molecola si è incorporata. Attraverso questa tecnica è stato possibile mettere in evidenza la neurogenesi anche nell'ippocampo umano. In questo caso la BrdU non è stata iniettata a scopo sperimentale ma, dal momento che è una molecola che si incorpora nel DNA delle cellule in proliferazione di tutto l'organismo, è stata utilizzata per monitorare la progressione dei tumori in soggetti affetti da carcinoma. Chiaramente, dal momento che ha la capacità di distribuirsi anche nel cervello, la BrdU ha rappresentato un ottimo marcatore per l'identificazione delle cellule in neurogenesi.

Nel 1998 Eriksson e collaboratori (*Eriksson et al., 1998*) dimostrarono per la prima volta che anche nell'ippocampo adulto era possibile mettere in evidenza cellule in neurogenesi, e questo fu effettuato grazie all'utilizzo sia della BrdU che di markers neuronali che presentavano una co-localizzazione a livello del giro dentato dell'ippocampo, dimostrando così la presenza del processo neurogenetico.

Una singola iniezione di BrdU seguita da perfusione 2 ore dopo permette di individuare i precursori che sintetizzano il DNA, mentre la perfusione dopo 24 ore, che corrispondono ad un completo ciclo cellulare, permette di rivelare le cellule figlie

(Cameron *et al.*, 2001). Perfondere l'animale a partire da 25 ore dopo l'iniezione di BrdU permette di rivelare la sopravvivenza delle cellule figlie. La sopravvivenza può essere studiata usando marcatori neuronali endogeni come la doublecortin, che marca le cellule approssimativamente di 1-14 giorni, oppure marcando le cellule con BrdU e NeuN, che marca i neuroni maturi (Brown *et al.*, 2003).

Un numero sempre crescente di studi sta cercando di fare luce sulle funzioni della neurogenesi nell'ippocampo adulto. Alcune teorie sostengono che la neurogenesi sia coinvolta in alcune forme di apprendimento e memoria ippocampo-dipendenti. Per esempio la compromissione della neurogenesi attraverso tecniche di ablazione ha fornito qualche prova che la riduzione di neurogenesi nell'adulto possa compromettere l'apprendimento contestuale, indebolire la memoria spaziale a lungo termine e danneggiare alcune forme di apprendimento spaziale (Shors *et al.*, 2002; Winocur *et al.*, 2006). Quindi la neurogenesi nell'adulto può avere nell'ippocampo numerose funzioni riguardo la memoria a lungo termine e il consolidamento di informazioni acquisite rapidamente (Pawluski *et al.* 2009). Tuttavia, nonostante il rapporto apparente tra neurogenesi e apprendimento ippocampo-dipendente, la formazione di un gran numero di nuovi neuroni non è necessariamente un fattore positivo. Nonostante esistano numerosi studi che hanno evidenziato correlazioni positive tra la neurogenesi nell'adulto e la memoria e l'apprendimento (Nilsson *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 1999) ci sono altrettanti studi che dimostrano che un tasso troppo alto di neurogenesi a livello ippocampale sia dannoso per i comportamenti ippocampo-dipendenti. Per esempio l'epilessia stimola la neurogenesi nell'adulto (Jessberger *et al.*, 2005) ma riduce anche le prestazioni nelle mansioni ippocampo-dipendenti (Lopes da Silva *et al.*, 1986). Uno studio recente ha dimostrato che l'aumento della neurogenesi ippocampale indotto da epilessia compromette la capacità di riconoscimento di un oggetto (Jessberger *et al.*, 2007). Quindi è probabile che ci sia un tasso ottimale di neurogenesi al di sopra o al di sotto del quale l'apprendimento e la

memoria vengono compromessi. Quest'idea è stata recentemente dimostrata da un modello teorico che dimostra che livelli molto alti di proliferazione cellulare destabilizzano l'attività neuronale dell'ippocampo causando interferenze nelle corrette funzioni del giro dentato (*Butz et al. 2006*). Una ragione per cui alti livelli di neurogenesi possono compromettere queste funzionalità è che i neuroni giovani sono altamente eccitabili (*Schmidt-Hieber et al., 2004; Snyder et al., 2001*) e in quanto tali possono creare interferenze rendendo difficile distinguere un segnale eccitatorio (*Parsons et al., 2007*).

Recenti studi hanno messo in evidenza una stretta correlazione tra le funzioni di alcuni steroidi neuroattivi durante il ciclo estrale e la neurogenesi (*Galea et al., 2006; Tanapat et al., 1999*). Per esempio alti livelli di estrogeni sono positivamente correlati con la proliferazione cellulare e sono negativamente correlati con la morte cellulare (*Tanapat et al., 1999*). Le femmine di ratto adulto hanno circa il 50% in più di nuove cellule e poche cellule picnotiche nel giro dentato dell'ippocampo durante il proestro, in cui i livelli di estrogeno sono molto alti, rispetto agli animali in diestro ed estro quando i livelli di estradiolo sono molto bassi (*Tanapat et al. 1999*). E' importante sottolineare che l'aumento della neurogenesi osservato durante il proestro è transitorio, infatti non ci sono differenze nella sopravvivenza cellulare nelle femmine trattate con BrdU nelle diverse fasi del ciclo estrale (*Tanapat et al., 1999*).

Molti degli effetti fisiologici e comportamentali sono modulati dal progesterone i cui livelli variano durante il ciclo estrale raggiungendo il picco insieme all'estrogeno durante il proestro (*Butcher et al., 1974*). Il ruolo specifico del progesterone nella neurogenesi ippocampale non è molto chiaro, infatti sembrerebbe mediare gli effetti dell'estradiolo. Tanapat e i suoi colleghi (2005) hanno mostrato che la somministrazione di progesterone 48 ore dopo l'iniezione di 10 mg di estradiolo determina una riduzione della proliferazione cellulare indotta dall'estradiolo nell'ippocampo di ratte ovariectomizzate. Inoltre un'alta dose di estradiolo benzoato somministrato 3 giorni dopo ovariectomia,

quando ormai i livelli di estradiolo e progesterone sono molto bassi, non è in grado di determinare un aumento della neurogenesi (*Pawluski et al., 2009*). Questi due steroidi nel loro insieme suggeriscono che il progesterone può alterare in maniera significativa l'influenza dell'estrogeno nella neurogenesi (*Pawluski et al., 2009*).

L'influenza del progesterone da solo in vivo non è stata per il momento studiata. È stato osservato che in vitro può aumentare la proliferazione cellulare (*Wong et al., 2005*), ma ci sono delle ottime ragioni per pensare che anche il progesterone da solo possa influenzare la neurogenesi nell'ippocampo in vivo. Per esempio è stato trovato nello strato subgranulare dell'ippocampo l'mRNA che codifica per il recettore per il progesterone (*Hagihara et al., 1992*) e che i livelli di questo mRNA aumentano dopo trattamento con estradiolo ma diminuiscono con il progesterone (*Guerra-Araiza et al., 2003*). Sembra tuttavia ormai chiaro che entrambi, estrogeno e progesterone, abbiano un ruolo importante nel modulare la neurogenesi e la sopravvivenza cellulare nel giro dentato dell'ippocampo.

Materiali e metodi

Animali

Per gli esperimenti ho utilizzato femmine di ratti Sprague-Dowley CD (Charles Rivers, Como), con peso corporeo di circa 180-200 grammi, mantenuti con un ciclo luce-buio di 12 ore, a temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidità (65%) costanti, con la disponibilità *ad libitum* di acqua e cibo.

La fase specifica del ciclo estrale delle ratte è stata determinata attraverso l'analisi quotidiana degli strisci vaginali effettuati fra le ore 9:00 e le ore 10:00 per circa 2-3 settimane. Il ciclo estrale delle ratte dura quattro giorni, ed esse presentano ogni giorno una fase diversa del ciclo; le fasi vengono chiamate diestro 1, diestro 2, proestro ed estro. Per gli esperimenti sono state utilizzate solo le ratte che hanno mostrato un ciclo estrale regolare durante le 2-3 settimane.

Il giorno dell'accoppiamento un ratto maschio e una femmina sono stati stabulati nella stessa gabbia per un giorno; l'accoppiamento è stato verificato la mattina seguente in base alla presenza del tappo spermatico nella gabbia. Questo giorno è stato considerato il giorno 0 di gravidanza.

Dopo l'accoppiamento le femmine sono state separate dai maschi e sono state stabulate in gruppi di 4-5 per gabbia fino al giorno dell'utilizzo (gruppo gravide) o fino al giorno prima del parto (gruppo post-partum), queste ultime sono state poi stabulate in gabbie singole fino al giorno dell'utilizzo. Ad un altro gruppo di ratte sono stati tolti i cuccioli 7 giorni dopo il parto e sono state lasciate nelle loro gabbie per altri 3, 7 o 14 giorni. Pertanto queste ratte sono state sacrificate 10, 14 o 21 giorni dopo il parto. Gli animali sono stati sacrificati al mattino fra le ore 9:00 e le ore 10:00 e durante l'estro per i controlli.

Trattamento farmacologico

Trattamento con finasteride

La finasteride (25mg/kg) è stata sciolta con una miscela formata da 20% di etanolo assoluto e 80% di olio di mais ed è stata iniettata sottocute in un volume di 3ml/kg. Gli animali sono stati trattati per 6 giorni (dal giorno 12 al 18 di gravidanza) una volta al giorno (ore 10:00), e sacrificati 24 ore dopo l'ultima somministrazione del farmaco (giorno 19 di gravidanza). Gli animali di controllo hanno ricevuto la stessa dose di solvente.

Trattamento con clomifene

Le pastiglie di clomifene (5mg/kg) sono state triturate e sciolte in alcune gocce di Tween-80 e portate a volume con H₂O; sono state somministrate *per os* in un volume di 3ml/kg. Gli animali di controllo hanno ricevuto la stessa quantità di solvente. Gli animali sono stati trattati per 3 giorni (dal giorno 15 al 18 di gravidanza), una volta al giorno (ore 10:00), e sacrificati 24 ore dopo l'ultima somministrazione del farmaco (giorno 19 di gravidanza).

Western Blot

Il giorno dell'esperimento gli animali sono stati sacrificati e gli ippocampi sono stati rapidamente estratti dal cervello ed omogenati al polytron in 5 ml di SDS 2%. L'omogenato è stato aliquotato e le aliquote sono state conservate a -20°C. Prima di utilizzare i campioni è stata determinata la concentrazione delle proteine con il metodo di Lowry (*Lowry et al., 1951*).

Immunoblot

Le proteine, in aliquote da 20 µg, sono state denaturate per 5 minuti a 95°C in presenza di un buffer contenente SDS al 2% e β-mercaptoetanolo.

Successivamente sono state separate attraverso un gel di poliacrilammide-SDS al 12% e trasferite elettroforeticamente in membrane di PVDF. Le membrane sono state saturate per 1 ora a temperatura ambiente con latte magro in polvere al 5% (W/V) sciolto in tampone TBS-T (20mM Tris; 37mM HCl; 0,1% di Tween 20). In seguito le membrane sono state incubate per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario specifico per le proteine oggetto di studio: per il fattore neurotrofico BDNF e per la proteina Arc sono stati utilizzati rispettivamente un anticorpo primario di coniglio alla concentrazione 1:500 e uno di topo alla concentrazione 1:250 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); per le proteine GluR1 e GluR2 sono stati utilizzati rispettivamente un'anticorpo primario di coniglio e uno di ratto entrambi alla concentrazione 1:1000 (Millipore, MA, USA). Come standard interno è stato considerato l'enzima gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), misurato attraverso lo specifico anticorpo primario fatto in topo alla concentrazione 1:1000. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti con tampone TBS-T contenente latte magro in polvere al 5%. La

mattina successiva, dopo alcuni lavaggi fatti con il tampone TBS-T, le membrane sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario specifico per le immunoglobuline di tipo G di coniglio o di topo coniugato alla perossidasi (entrambi diluiti 1:10.000 in TBS-T + latte 5%, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

L'immunocomplesso è stato rilevato con il metodo della chemiluminescenza (*ECL-Plus Amersham, Little Chalfont, Bucks, UK*).

Autoradiografia e analisi di immagine

Al termine della rilevazione dell'immunocomplesso, le bande relative alle varie proteine sono state visualizzate mediante uno strumento chiamato Gelians 600 (Perkin Elmer).

La variazione dell'espressione delle proteine è stata determinata misurando la densità ottica delle bande. Tale strumento è calibrato per individuare i valori saturati, in modo tale che tutte le misure risultino comprese in un intervallo lineare. I dati sono stati normalizzati dividendo la densità ottica di ciascuna banda specifica delle proteine BDNF, Arc, GluR1 e GluR2 per quella corrispondente della proteina GAPDH. Pertanto la quantità delle proteine è stata espressa in unità arbitrarie, e non ha consentito di determinare il valore assoluto delle concentrazioni delle proteine, bensì le sole variazioni percentuali dei singoli gruppi sperimentali rispetto a quelli di controllo.

Long Term Potentiation

Fettine di ippocampo

Dopo anestesia tramite inalazione di cloroformio, l'animale è stato sacrificato mediante decapitazione e l'encefalo è stato rapidamente rimosso e immerso in una soluzione cerebrospinale artificiale ghiacciata aCSF contenente: NaCl 126 mM, KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosio 10 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7.3, saturata con 95% O₂ / 5% CO₂). Le fettine coronali ippocampali di 400 µm sono state tagliate mediante un vibratomo (VT 1200S, Leica) e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente prima di iniziare le registrazioni elettrofisiologiche.

Registrazioni elettrofisiologiche e induzione della LTP

Le fettine sono state trasferite in una camera di registrazione costantemente perfusa da aCSF con un flusso di circa 2ml/min a temperatura costante (34°C). Le registrazioni dei potenziali di campo sono state ottenute dai dendriti dei neuroni localizzati nel giro dentato dell'ippocampo in seguito alla stimolazione della via perforante, e sono state effettuate tramite un amplificatore Axoclamp-2B (Axon Instruments, Union City, CA). I microelettrodi utilizzati per le registrazioni di Field Potentials sono capillari di borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA, con filamento interno; OD 1.5 µm). Gli studi di Field Potential sono stati eseguiti per valutare se l'effetto dell'LTP potesse essere differente nei vari gruppi sperimentali. L'LTP è stata indotta applicando un treno di 100 stimolazioni ad una frequenza di 250 Hz.

Tutti i dati sono stati espressi come la media \pm SEM (errore standard della media) degli ultimi 10 minuti dopo un ora dall'applicazione dello stimolo tetanico e la

significatività statistica è stata valutata mediante l'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal t-test post hoc (l'analisi è stata eseguita con il programma Prism 5.0, GraphPad, San Diego, CA). Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato il limite di accettazione della significatività statistica.

Registrazione delle correnti eccitatorie postsinaptiche in miniatura glutamatergiche (mEPSCs)

Le fettine di ippocampo sono state trasferite in una camera di registrazione costantemente perfusa con aCSF con un flusso di circa 2ml/min a temperatura ambiente. Le registrazioni elettrofisiologiche in modalità patch clamp whole cell sono state effettuate nelle cellule granulari del giro dentato utilizzando un amplificatore Axopatch 200-B (Axon Instruments, Union City, CA) e un microscopio a contrasto interferenziale. I microelettrodi utilizzati sono capillari di borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA, con filamento interno; OD 1.5 μm), sono stati preparati con un puller verticale (Sutter Instruments) e hanno una resistenza compresa tra i 4 e i 6 Mohm. Le correnti eccitatorie postsinaptiche in miniatura glutamatergiche spontanee sono state registrate al potenziale di -65mV, con una soluzione interna contenente 140mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes-CsOH (pH 7.3), 2 mM adenosina trifosfato e 5 mM QX-314 e una soluzione esterna composta da ACSF contenente 20 μM bicucullina methiodide e lidocaina (500 μM). La resistenza di accesso varia tra 20 e 40 Mohm; quando la resistenza è scesa al di sotto del 20% durante un esperimento, la registrazione è stata scartata.

Impregnazione argantica di Golgi

I tessuti utilizzati per l'analisi della densità delle spine dendritiche sono stati colorati attraverso la tecnica dell'impregnazione cromoargantica di Golgi modificata da Del Rio Hortega.

Una fetta di cervello fresco appena prelevato dall'animale e tagliato allo spessore di 1mm è stata immersa inizialmente in una soluzione fissativa composta da bicromato di potassio al 10% e cloralio idrato al 6% disciolti in H₂O e miscelata in parti uguali ad una soluzione di paraformaldeide all'8%. Il tessuto è rimasto immerso in questa soluzione per 4 giorni, e ogni giorno la soluzione è stata preparata fresca e sostituita. La fissazione è stata effettuata a temperatura ambiente e al buio, in quanto la soluzione è fotosensibile. Al quinto giorno il fissativo è stato eliminato, le fette sono state lavate brevemente con acqua distillata, e il tessuto è stato immerso in più soluzioni di nitrato d'argento a concentrazioni crescenti: 0.25%, 0.5%, 0.75%, 0.1% e 1.5%. Il tessuto è rimasto immerso 5 minuti in ogni soluzione, dopo di che è stato lasciato per 3 giorni nella soluzione all'1.5%, al buio e a temperatura ambiente.

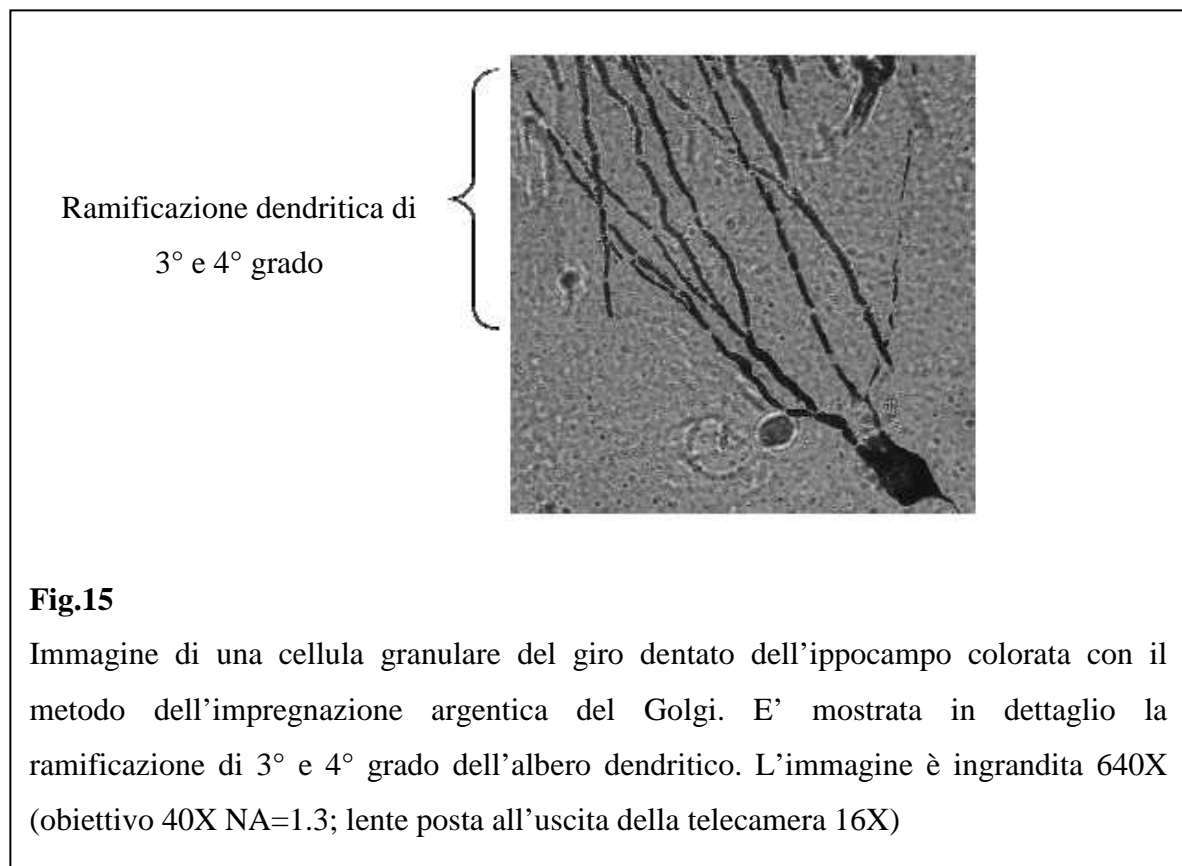
Come risultato è stata ottenuta la precipitazione selettiva di un sale, il *cromato d'argento*, che ha colorato di nero il corpo cellulare del neurone e tutti i suoi prolungamenti fino alle diramazioni più estreme. Caratteristica della reazione è la sua parzialità, per cui soltanto una bassa percentuale delle cellule ha assunto la colorazione bruna.

Il tessuto è stato quindi ripulito con l'utilizzo di un pennello dai cristalli di cromato d'argento ed è stato tagliato al vibratomo. Sono state fatte fettine dello spessore di 50 µm che sono state essiccate e disidratate mediante la scala degli alcoli e infine montate con un vetrino coprioggetto ed Eukitt.

Analisi e conta delle spine al microscopio

Le fettine sono state analizzate con un microscopio invertito in campo chiaro (Zeiss, Axio Observer Z.1). Le immagini sono state acquisite con una telecamera ad alta risoluzione (Zeiss AxioCam MR-m) e sono state analizzate per mezzo del computer e di un software per l'analisi delle immagini (Zeiss, AxioVision). Per la conta e l'identificazione delle spine sono state adottate le seguenti procedure: nell'immagine intera dell'ippocampo sono stati scelti i neuroni ben separati dagli altri, in cui era possibile seguire i processi che partono dal corpo cellulare che si trova nello strato granulare del giro dentato dell'ippocampo e che penetrano fino alla porzione distale dello strato molecolare dell'ippocampo. Il neurone è stato acquisito ad un ingrandimento di 640X (obiettivo 40X con NA=1.6 ad immersione in olio e 16X ingrandimento della lente posta all'uscita della telecamera).

Le spine sono state analizzate e contate solo nei bracci di 3° e 4° grado, quindi nei dendriti posti nella parte più distale dello strato molecolare [Fig.15].

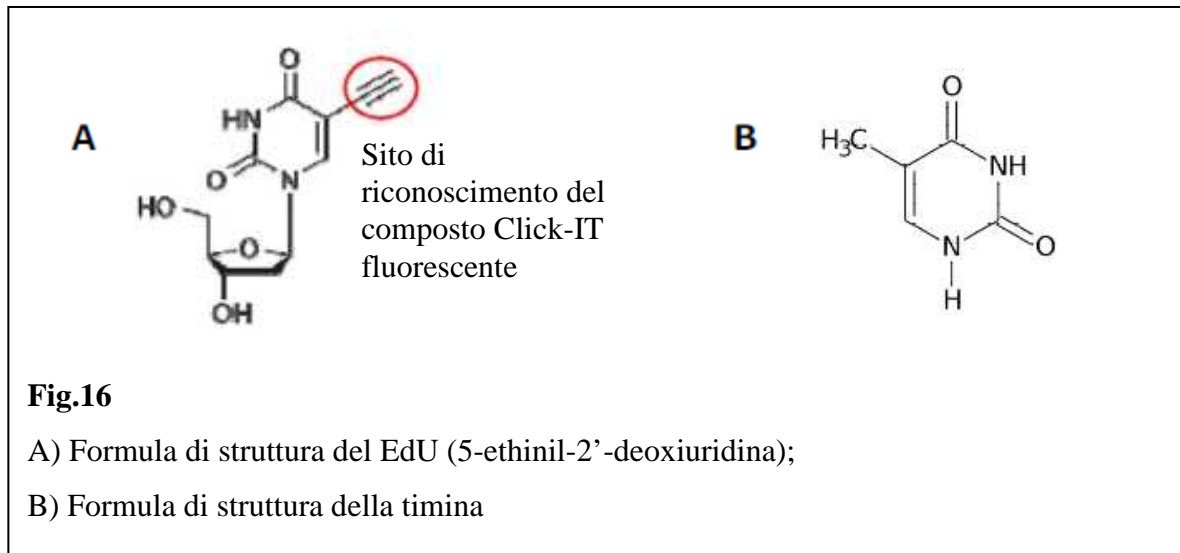


Le spine sono state acquisite ad un ingrandimento 1600X (100X obiettivo con NA=1.3 ad immersione in olio e 16X la lente posta all'uscita della telecamera).

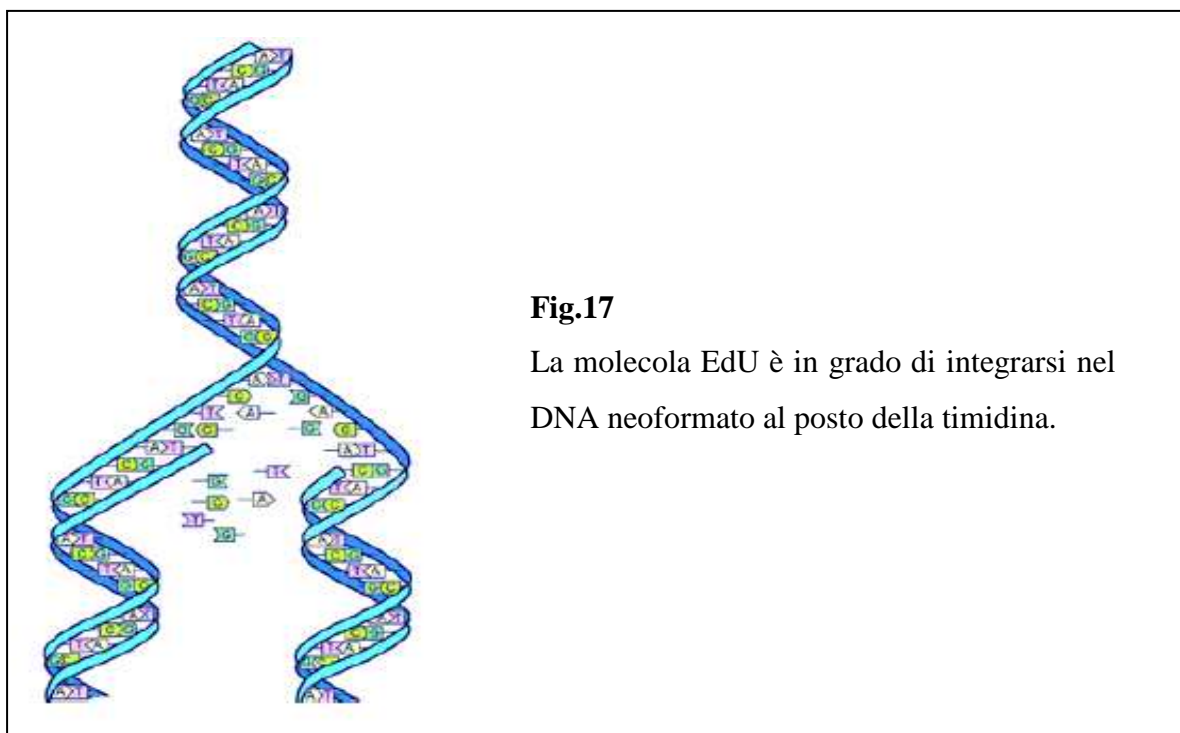
L'analisi delle spine dendritiche è stata fatta contando le spine totali che compaiono in un unico piano focale. Le spine sono state inoltre analizzate con un'acquisizione lungo l'asse z per verificare più in dettaglio se ognuna possedesse almeno una testa nella parte apicale. Sono state considerate spine tutte le protrusioni dei dendriti che terminano con una piccola testa. Le spine non sono state differenziate in base alla loro forma, ma è stata presa in considerazione la percentuale di filopodi presenti. I filopodi sono protrusioni lunghe e sottili che terminano senza testa. Tutte le spine sono state analizzate su porzioni di dendriti lunghi almeno 10 μm . Sono stati analizzati 7 animali per gruppo sperimentale e per ogni animale sono state analizzate circa 40 porzioni di dendriti.

Neurogenesi

La tecnica da me utilizzata per lo studio della neurogenesi nell'adulto è quella che utilizza la molecola EdU (5-ethinil-2'-deoksiuridine) [Fig.16].



L'EdU è una molecola analoga alla timina, per cui può essere incorporata nel DNA al posto della timina durante la replicazione, quindi durante la fase S del ciclo di divisione cellulare [Fig.17].



Per questo motivo l'EdU può essere utilizzato come marker per individuare le cellule di nuova proliferazione.

Trattamento con EdU

Il composto EdU (200 mg/kg, Invitrogen) è stato sciolto con soluzione fisiologica e tween-80 e in seguito iniettato in peritoneo. Gli animali sono stati trattati una volta sola 24 ore prima del sacrificio: i controlli sono stati trattati il giorno del proestro, le ratte gravide il 20° giorno di gravidanza, le ratte post-partum 1 e 20 giorni dopo il parto; infine sono state sacrificate anche le mamme private dei cuccioli dopo 7 giorni dal parto.

Preparazione del tessuto

Prima di essere sacrificate le ratte sono state anestetizzate profondamente con equithesin (3 ml/Kg, costituito da una miscela di 1g di pentobarbital sodico, 4.251g di cloralio idrato, 2.125g MgSO₄, 12 ml EtOH, 43.6 ml di glicole e acqua distillata fino ad arrivare ad un volume di 100 ml). I tessuti sono stati quindi fissati con paraformaldeide 4% (w/v) disciolta in tampone fosfato 0,1M (costituito da NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄, pH 7,4) tramite perfusione intracardiaca: al ratto è stato aperto il torace ed è stato praticato un taglio nell'atrio destro per permettere la fuoriuscita del sangue e dei tamponi, è stato infilato l'ago nel ventricolo sinistro sino ad arrivare all'aorta ascendente, ed è cominciata la perfusione, inizialmente con tampone fosfato (circa 100 ml) per eliminare il sangue dai tessuti. Dopo aver perfuso il tampone fosfato, senza interrompere mai il flusso, è stata iniettata la paraformaldeide (circa 250 ml). Infine è stato prelevato il cervello dell'animale e questo è stato postfissato immergendolo per 4 ore a 4°C in paraformaldeide. Successivamente il

tessuto è stato immerso per una notte in una soluzione di tampone saccarosio al 20%, quindi è stato conservato in tampone fosfato e saccarosio al 30% sino al giorno del taglio. Questo passaggio ha permesso l'eliminazione della paraformaldeide in eccesso ed inoltre ha protetto il tessuto dalla formazione di ghiaccio durante la conservazione delle fettine a -20°C.

Il cervello è stato poi tagliato mediante un vibratomo. Sono state tagliate fette sagittali di 50 µm di spessore, che sono state deposte singolarmente nei pozzetti di una piastra multiwells ed utilizzate per la reazione di immunostochimica.

Immunoistochimica

Il giorno dell'esperimento le fettine sono state lavate con tampone PBS (10 mM di Na₂HPO₄, 140mM di NaCl, 2 mM KH₂PO₄ 3 mM KCl) e incubate per 1h con tampone PBS più Triton X-100 allo 0.2% (PBS-T) in modo da permeabilizzare le membrane cellulari. Successivamente sono state incubate con PBS + 5% di sieroalbumina bovina per 1 ora in modo da bloccare i siti immunoreattivi non specifici. Le fettine sono state quindi incubate per 30 minuti con la soluzione di Click-IT (Invitrogen). Trascorso questo tempo le fettine sono state lavate per 3 volte con tampone PBS-T + siero albumina bovina al 5% in modo da eliminare la soluzione di Click-IT in eccesso.

Per poter localizzare nel giro dentato dell'ippocampo le cellule marcate con EdU, tutti i neuroni sono stati marcati con il colorante Hoechst 33342. Pertanto le fettine sono state incubate per 30 minuti con una soluzione di 3 ng/ml di Hoechst 33342 preparata in PBS-T. Questo composto si lega alla timidina ed adenina del DNA, per cui è in grado di marcare i nuclei di tutte le cellule; inoltre è un composto fluorescente, e può essere visualizzato con un microscopio a fluorescenza.

Al termine dell'incubazione, le fettine sono state lavate con tampone PBS, distese nel vetrino portaoggetto ed è stato montato il vetrino coprioggetto con una goccia di glicerolo.

Analisi delle immagini al microscopio confocale e conta delle cellule marcate

Le fettine sono state visualizzate al microscopio confocale (Leica TCS SP5X AOBS). Le immagini acquisite sono state analizzate mediante un programma per l'analisi delle immagini (Leica Application Suite). Tutte le immagini sono state acquisite con un obiettivo 40X (NA= 1.3).

Le cellule di nuova formazione sono state visualizzate in verde, in quanto il fluorocromo associato al complesso dell'Edu è Alexa Fluor 488, che viene eccitato alla lunghezza d'onda di 488nm e presenta un'emissione massima a 520nm.

Tutti i neuroni della fettina invece sono stati visualizzati in blu, in quanto l'Hoechst 33342 viene eccitato a 360nm ed emette in misura ottimale a 470nm.

Le immagini acquisite separatamente per ciascuno dei due fluorocromi sono state poi sovrapposte, in modo da poter localizzare le cellule in proliferazione esclusivamente in corrispondenza dello strato subgranulare del giro dentato dell'ippocampo, scartando tutte quelle che eventualmente si trovano nel resto della fettina.

Per la conta delle cellule marcate è stato utilizzato il *principio di Cavalieri*: il tessuto è stato tagliato interamente ma è stata processata solo una fetta ogni 10; nelle immagini acquisite è stato contornato il giro dentato in modo da definire l'area che, riferita allo spessore della porzione analizzata (50 µm), ha permesso di calcolarne il volume; infine sono state contate tutte le cellule marcate con BrdU nelle fette di tessuto analizzate. Il numero totale di cellule in neurogenesi presenti all'interno dell'intero tessuto è stato quindi ottenuto attraverso la seguente equazione:

$$N = 1/ssf \times 1/asf \times 1/hsf \times \Sigma C$$

in cui:

- *ssf (section sampling fraction)* rappresenta la frazione delle fettine di tessuto analizzate;
- *asf (area sampling fraction)* rappresenta l'area della sezione della fettina analizzata;
- *hsf (height sampling fraction)* rappresenta lo spessore della fettina;

- ΣC rappresenta la somma delle cellule marcate contate in tutte le fettine analizzate.

In questo modo è stato possibile ottenere il numero di cellule marcate con EdU/mm³ di tessuto.

Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati effettuati su almeno 7 animali diversi per gruppo sperimentale.

I dati sono espressi come la media \pm SEM e sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA). La comparazione multipla delle medie è stata fatta utilizzando il test "post hoc" seguito dallo scheffè.

Risultati

Determinazione dei livelli di BDNF durante la gravidanza e dopo il parto

Nella mia tesi ho voluto studiare i livelli di espressione della proteina BDNF nell'ippocampo di ratto durante la gravidanza (15, 19, 21 giorni), durante l'allattamento (2, 7, 10, 14, 21, giorni dopo il parto) e dopo lo svezzamento dei cuccioli (28 e 42 giorni il parto). Inoltre ho voluto studiare l'espressione di questa proteina anche in un gruppo di animali a cui sono stati tolti i piccoli 7 giorni dopo il parto e sacrificate dopo 3, 7, 14 giorni, quindi 10, 14 e 21 dopo giorni il parto. Tutti i risultati ottenuti sono stati comparati a quelli delle femmine nullipare in estro.

L'espressione di questa proteina è stata esaminata per mezzo del Western Blot usando un anticorpo specifico che riconosce un epitopo presente in una porzione interna alla proteina BDNF. Inizialmente è stata valutata, mediante la tecnica del Western Blot, la selettività di questo anticorpo verso queste 2 proteine [Fig.18].

L'anticorpo utilizzato è in grado di marcare diverse bande: la più pesante, la cui massa è stata stimata in 32 kDa, corrisponde a quella del proBDNF, e quella più leggera è di 14 kDa e corrisponde alla proteina BDNF matura. Fra queste due bande ne compaiono altre (28, 20, 16 kDa,) che corrispondono a dei clivaggi intermedi del proBDNF [Fig.18A]. Per il mio studio ho analizzato solo le bande corrispondenti al BDNF. La specificità dell'anticorpo è stata studiata depositando in un pozzetto del gel la proteina purificata di BDNF. In questo caso è stata osservata una sola banda corrispondente a 16 kDa [Fig.18B]. Nessuna immunoreattività è stata associata nella colonna corrispondente all'incubazione della membrana con l'anticorpo primario preincubato con il frammento di peptide usato come antigene [Fig. 18C].

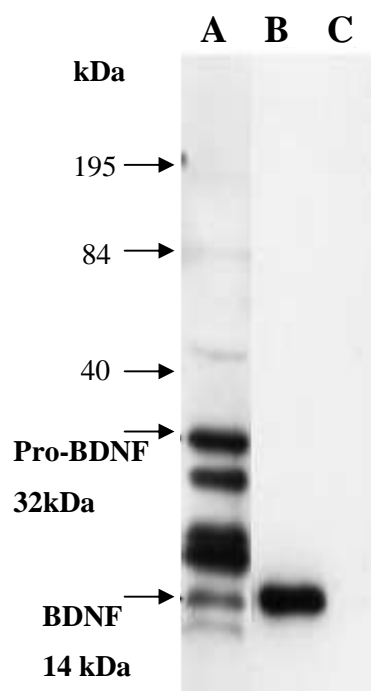


Fig.18

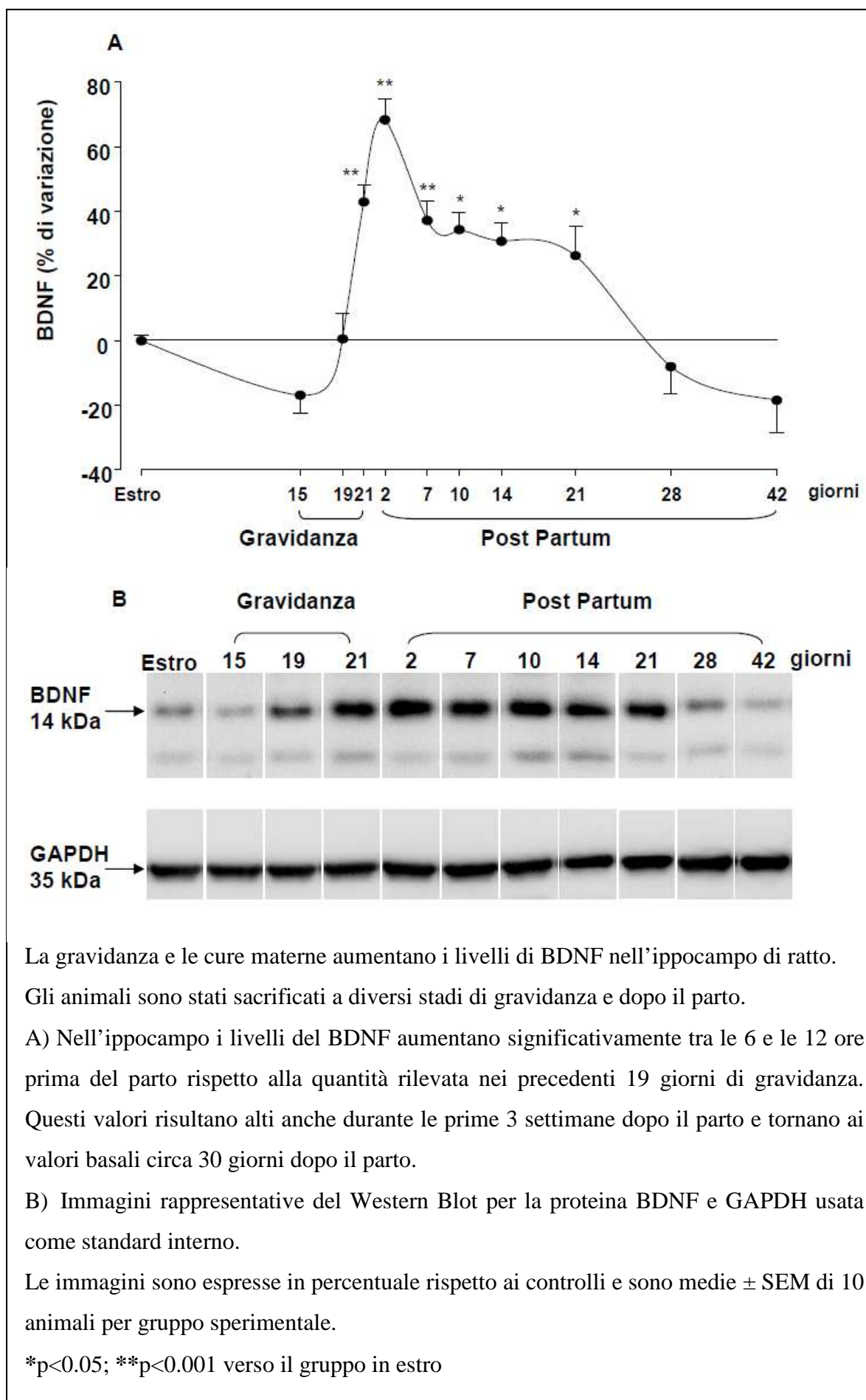
Analisi mediante la tecnica del Western Blot sulla specificità dell'anticorpo per la proteina BDNF.

Frazioni di 20 µg di proteina di ippocampo di ratto sono state separate mediante elettroforesi su gel SDS-poliacrilammide al 15%.

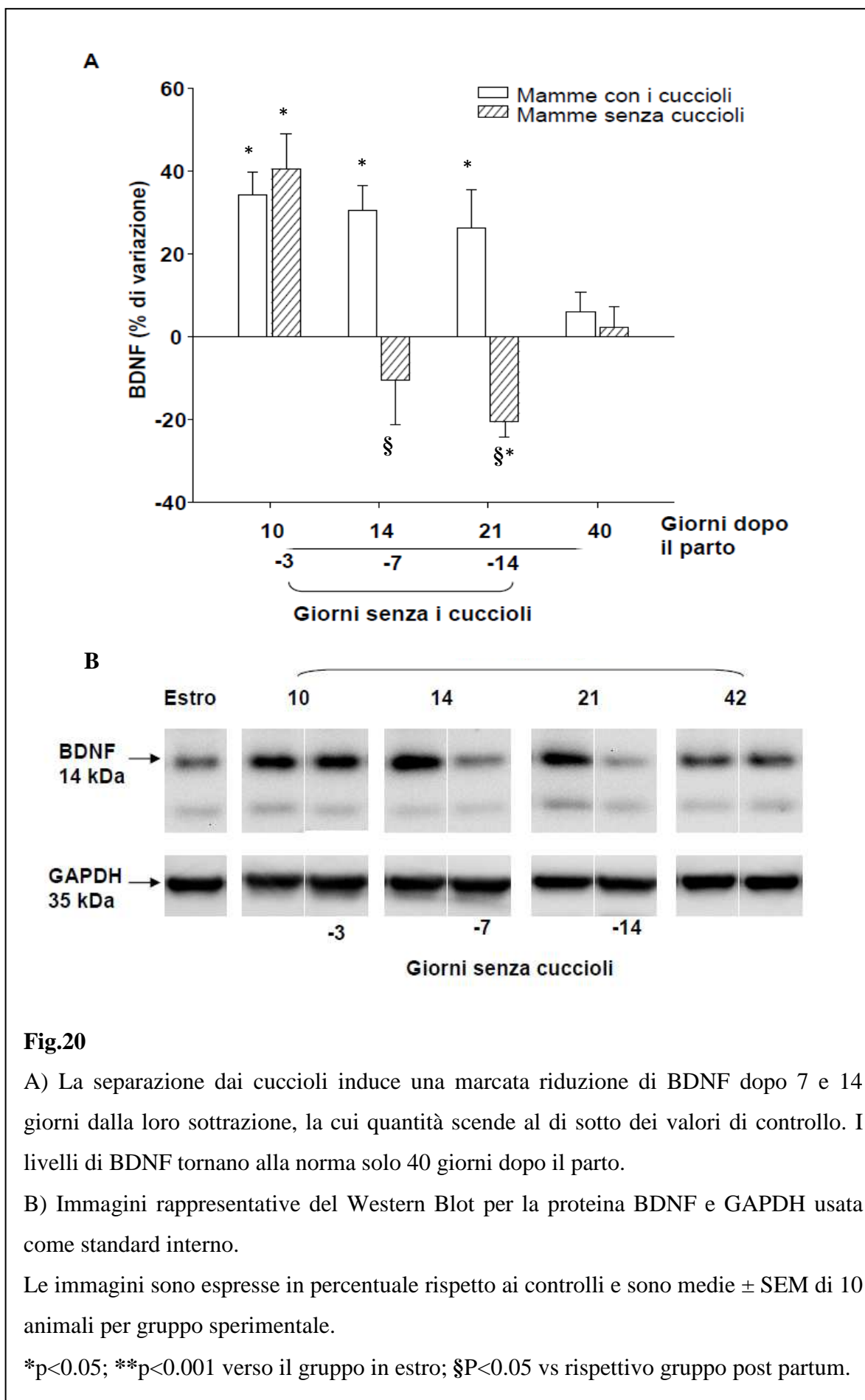
L'analisi per l'immunoblot è stata determinata mediante un anticorpo specifico per la proteina BDNF.

- La colonna A rappresenta la reazione anticorpale completa;
- Nella colonna B è stato caricato 1 µg di proteina BDNF e poi incubato con entrambi gli anticorpi I e II;
- Nella colonna C è stato preincubato con un frammento di BDNF usato per immunizzare il coniglio.

Come mostra la figura 19, la gravidanza non modifica i livelli di espressione del BDNF nell'ippocampo, infatti i livelli di questa proteina risultano significativamente aumentati solo al termine della gravidanza (21° giorno) proprio in prossimità del parto e rimangono elevati, rispetto alle ratte in estro, anche per tutto il periodo dell'allattamento, per tornare ai livelli basali 28 giorni dopo il parto [Figg.19 A e B].



I livelli di BDNF diminuiscono invece nelle madri a cui sono stati sottratti i cuccioli, e precisamente in quelle sacrificate dopo 7 giorni, i cui livelli ritornano simili a quelli degli animali in estro, e in quelle sacrificate dopo 14 giorni i cui livelli si riducono ulteriormente e risultano essere significativamente più bassi rispetto agli animali in estro. I livelli di BDNF non subiscono variazioni negli animali sacrificati 3 giorni dopo la sottrazione della cucciolata [Figg.20 A e B].



Determinazione dei livelli della proteina Arc durante la gravidanza e dopo il parto

Ci sono evidenze in letteratura che dimostrano che variazioni nei livelli di espressione del BDNF sono accompagnati da variazioni nei livelli di espressione della proteina Arc. Perciò per testare questa ipotesi ho studiato i livelli di espressione della proteina Arc nell'ippocampo di ratto negli stessi gruppi sperimentali considerati per la proteina BDNF, e cioè durante la gravidanza (15, 19, 21 giorni), l'allattamento (2, 7, 10, 14, 21 giorni dopo il parto), dopo lo svezzamento dei cuccioli (28 e 42 giorni il parto) e in un gruppo di mamme a cui sono stati tolti i cuccioli 7 giorni dopo il parto e sacrificate dopo 3, 7, 14 giorni, cioè 10, 14 e 21 giorni dopo il parto. Tutti i risultati ottenuti sono stati comparati a quelli delle femmine nullipare in estro. Per questo studio è stata usata la tecnica del Western Blot e un anticorpo diretto contro la proteina Arc, che riconosce un epitopo nel frammento carbossiterminale 1-300 dell'intera proteina.

L'anticorpo è in grado di riconoscere una singola banda proteica la cui massa molecolare è di 55 kDa, corrispondente perfettamente a quella della proteina Arc [Fig.21A].

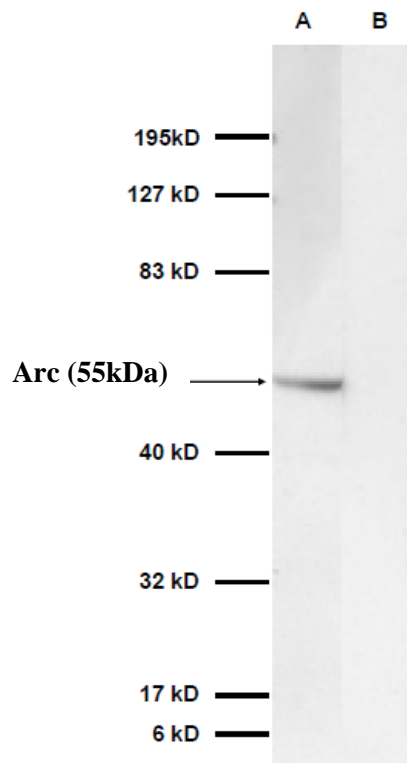


Fig.21

Analisi mediante la tecnica del Western Blot sulla specificità dell'anticorpo per la proteina Arc.

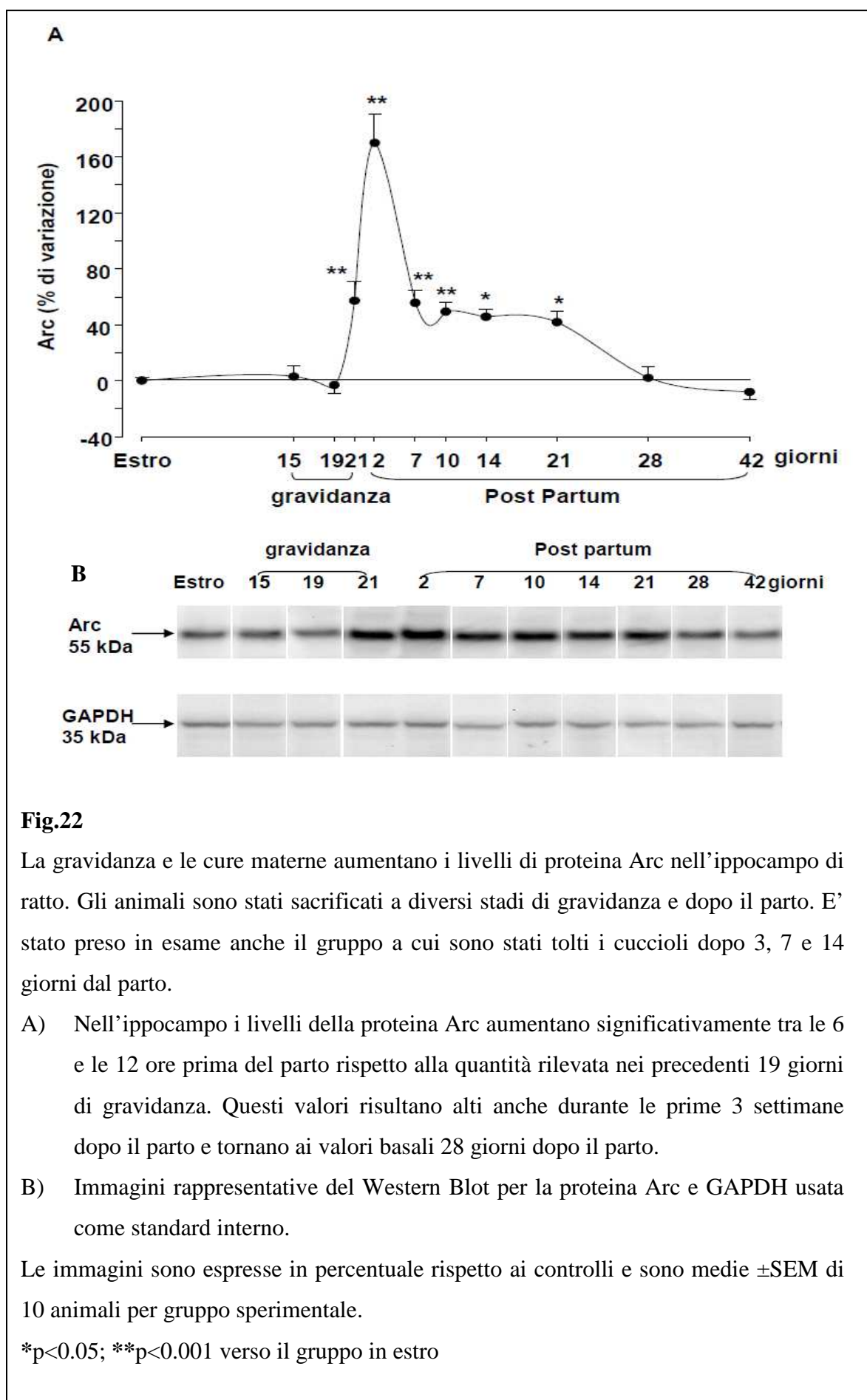
Una frazione di 20 ug di proteina di ippocampo di ratto è stata separata mediante elettroforesi su gel SDS-poliacrilammide al 15%.

L'analisi per l'immunoblot è stata determinata mediante un anticorpo specifico per la proteina Arc.

- La colonna A rappresenta la reazione anticorpale completa;
- Nella colonna B l'anticorpo I è stato preincubato con un frammento della proteina Arc usato per immunizzare il topo.

Anche in questo caso la massima immunoreattività è stata associata nella colonna corrispondente all'incubazione della membrana con l'anticorpo primario preincubato con l'antigene [Fig.21B].

Nell'ippocampo i livelli di proteina Arc non variano nei primi 19 giorni di gravidanza. Parallelamente a quanto osservato per il BDNF, la proteina Arc aumenta significativamente immediatamente prima del parto, continua ad aumentare a 2-7 giorni dopo il parto e rimane elevata per tutto il periodo dell'allattamento fino al 21° giorno dopo il parto [Figg.22 A e B].



I livelli di questa proteina rimangono significativamente elevati negli animali privati dei cuccioli 3 giorni dopo il parto, ma diminuiscono negli animali privati dei cuccioli 7 giorni dopo il parto raggiungendo livelli simili agli animali di controllo; i livelli si riducono ulteriormente nel gruppo di animali privato dei cuccioli per 14 giorni [Fig.23 A eB].

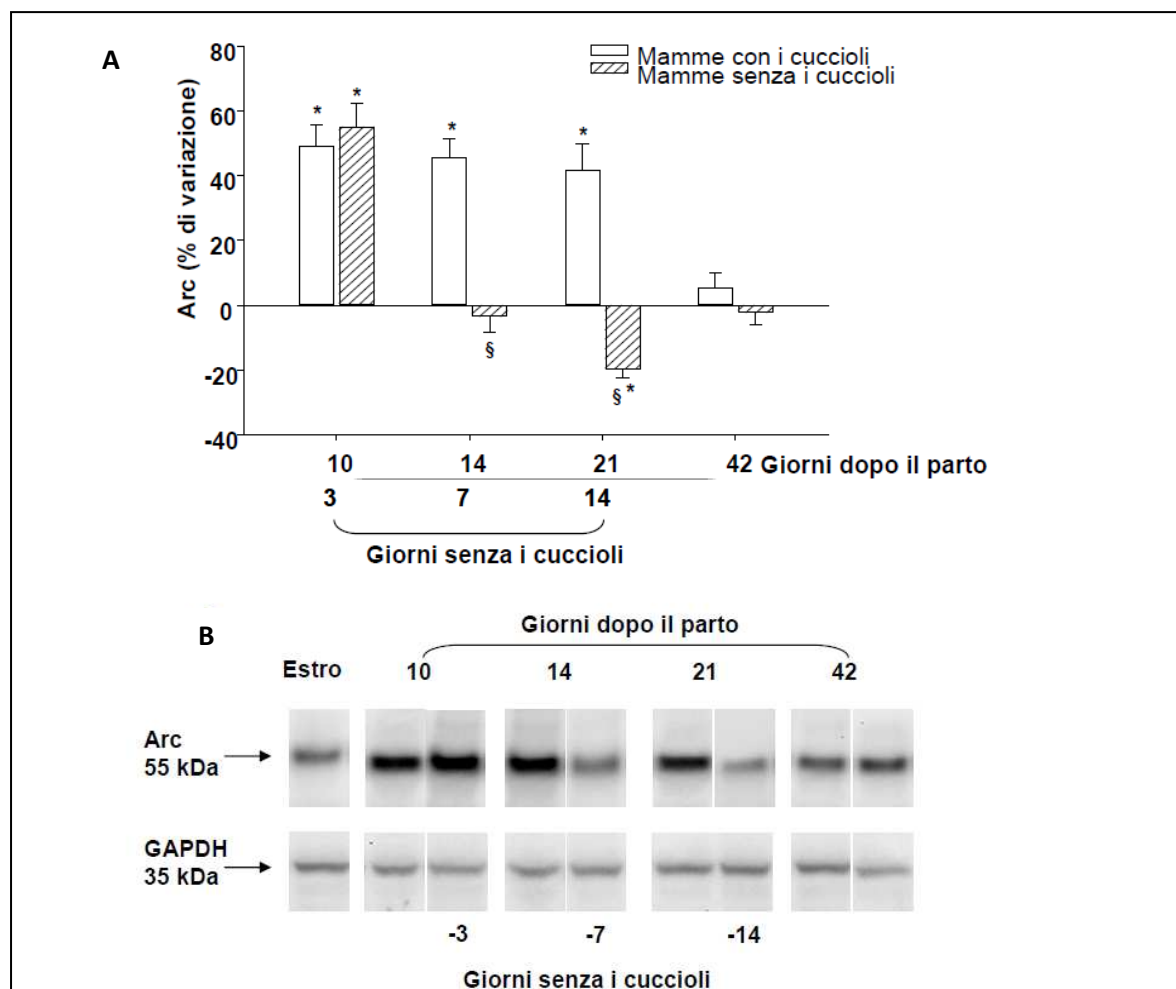


Fig.23

- A) La separazione dai cuccioli induce una marcata riduzione della proteina Arc dopo 7 e 14 giorni dalla loro sottrazione, la cui quantità scende al di sotto dei valori di controllo. I livelli di proteina Arc tornano alla norma solo 35 giorni dopo la separazione.
- B) Immagini rappresentative del Western Blot per la proteina Arc e GAPDH usata come standard interno.

Le immagini sono espresse in percentuale rispetto ai controlli e sono medie \pm SEM di 10 animali per gruppo sperimentale.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ verso il gruppo in estro; § $P < 0.05$ vs rispettivo gruppo post partum.

Determinazione dei livelli di BDNF e Arc negli animali trattati con finasteride e clomifene

Per verificare se l'effetto osservato nei livelli di espressione della proteina BDNF durante la gravidanza e dopo il parto fossero dovute ai metaboliti del progesterone e dell'estrogeno, gli animali sono stati trattati per 6 giorni con finasteride (dal 15° al 19° giorno di gravidanza) o per 3 giorni con clomifene (dal 16° al 19° giorno). I risultati ottenuti mostrano che il trattamento con finasteride o clomifene non è in grado di bloccare le variazioni dei livelli di BDNF e Arc nell'ippocampo di ratto, immediatamente prima o dopo il parto [Fig.24 A e B].

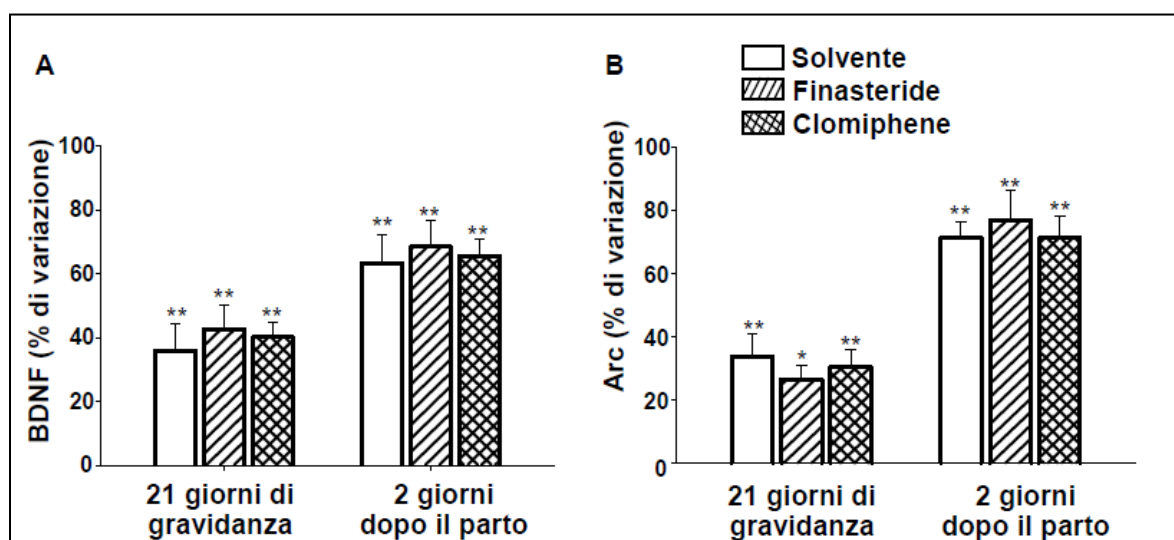


Fig.24

Rappresentazione grafica della determinazione semiquantitativa dei livelli di espressione delle proteine BDNF (A) e Arc (B) nell'ippocampo di ratto ottenute dalle analisi delle immagini attraverso il Western Blot.

Gli animali sono stati trattati per 6 giorni (dal 12 al 18 giorno di gravidanza) con finasteride (25mg/kg) o per 3 giorni (dal 15 al 18 giorno di gravidanza) con clomifene (5mg/kg).

Gli animali sono stati sacrificati al 21 giorno di gravidanza o 2 giorni dopo il parto.

Le immagini sono espresse in percentuale rispetto ai controlli e sono medie \pm SEM di 8 animali per gruppo sperimentale. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ verso il gruppo in estro.

La Long Term Potentiation durante la gravidanza e dopo il parto

Nel giro dentato dell'ippocampo di ratto abbiamo osservato un significativo potenziamento sinaptico a lungo termine alla fine della gravidanza (21° giorno), e l'effetto si mantiene durante le prime 3 settimane dopo il parto [fig. 25 A e B]; questo effetto viene revertito dalla separazione della prole per 14 giorni.

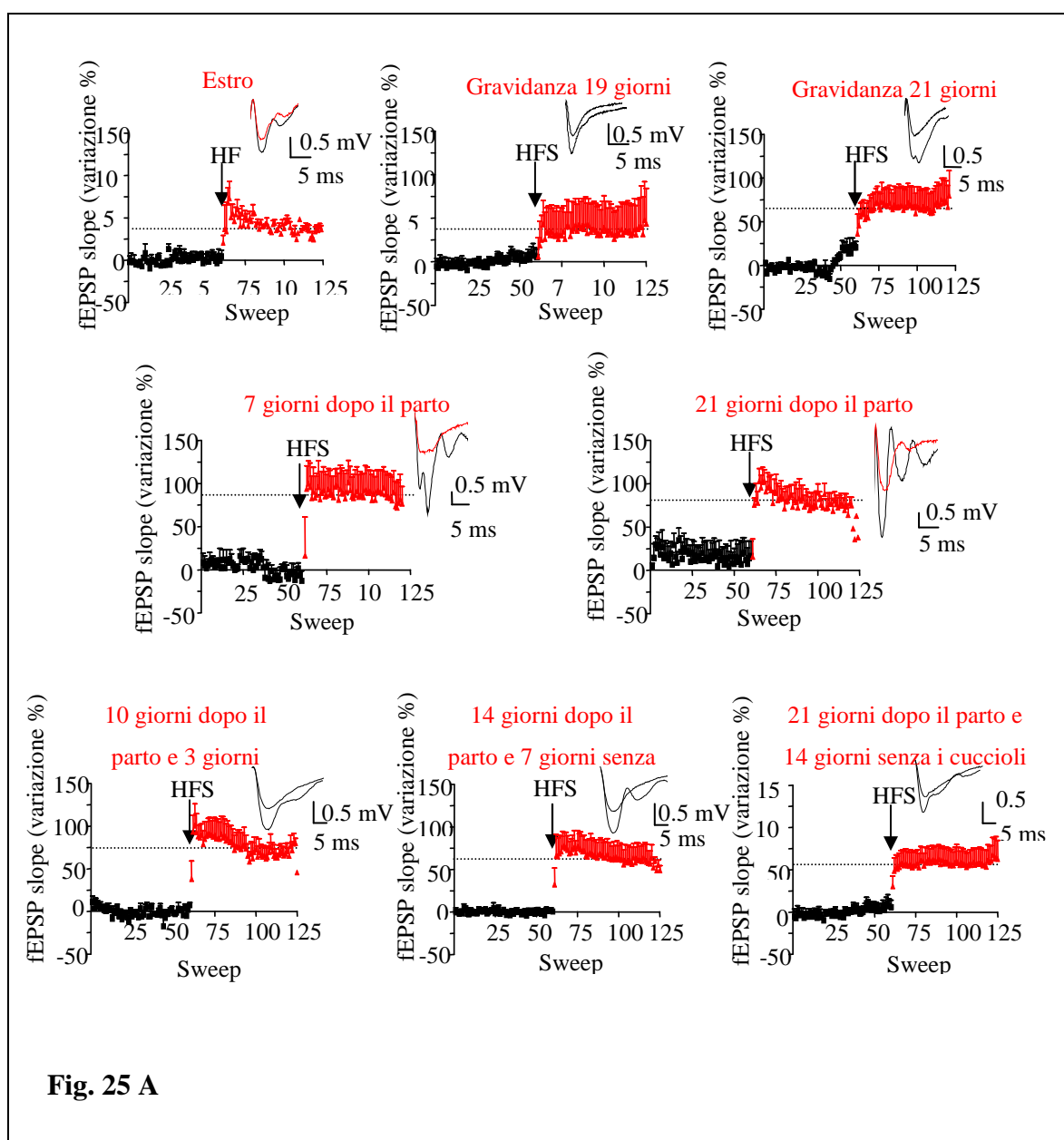
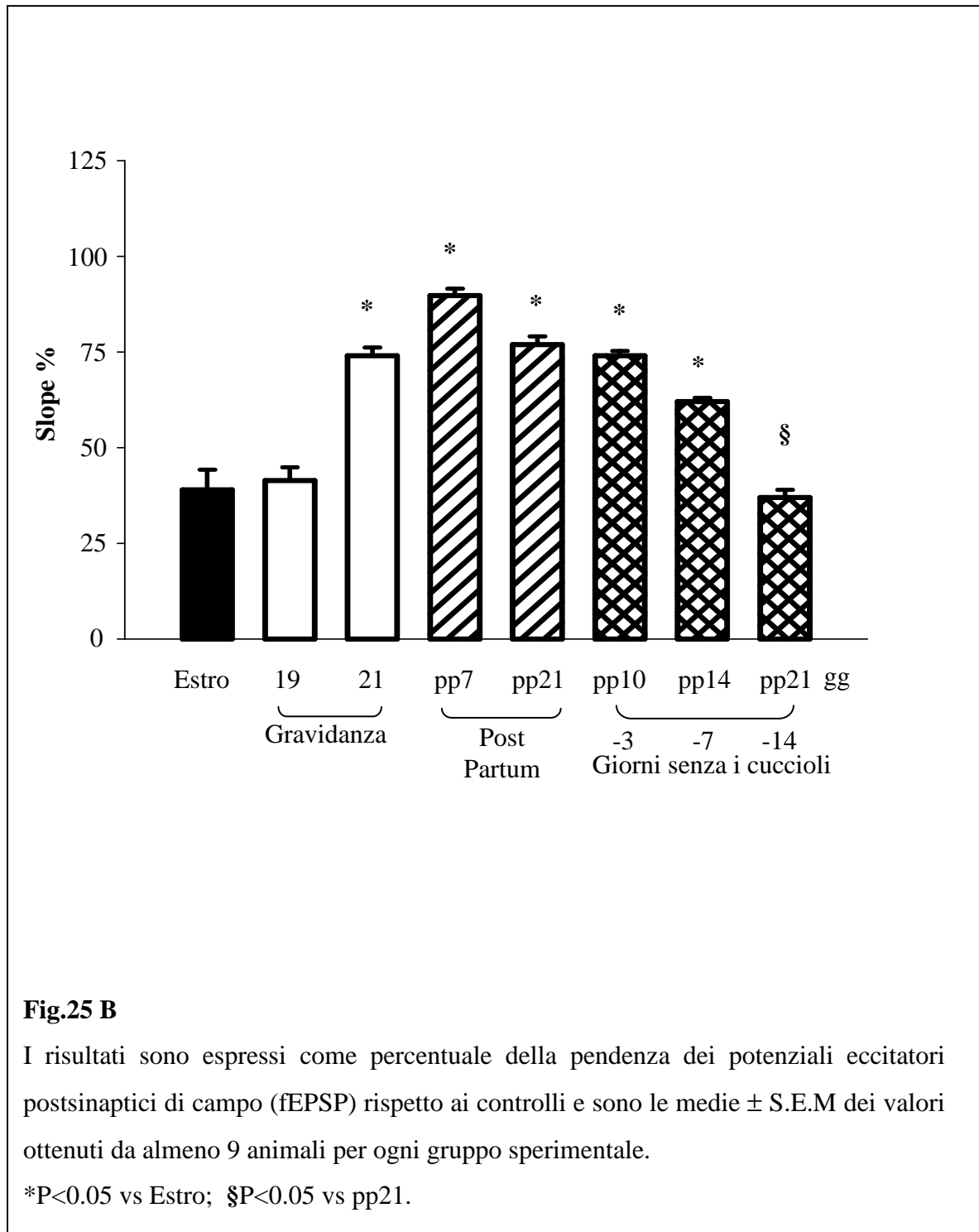


Fig. 25 A

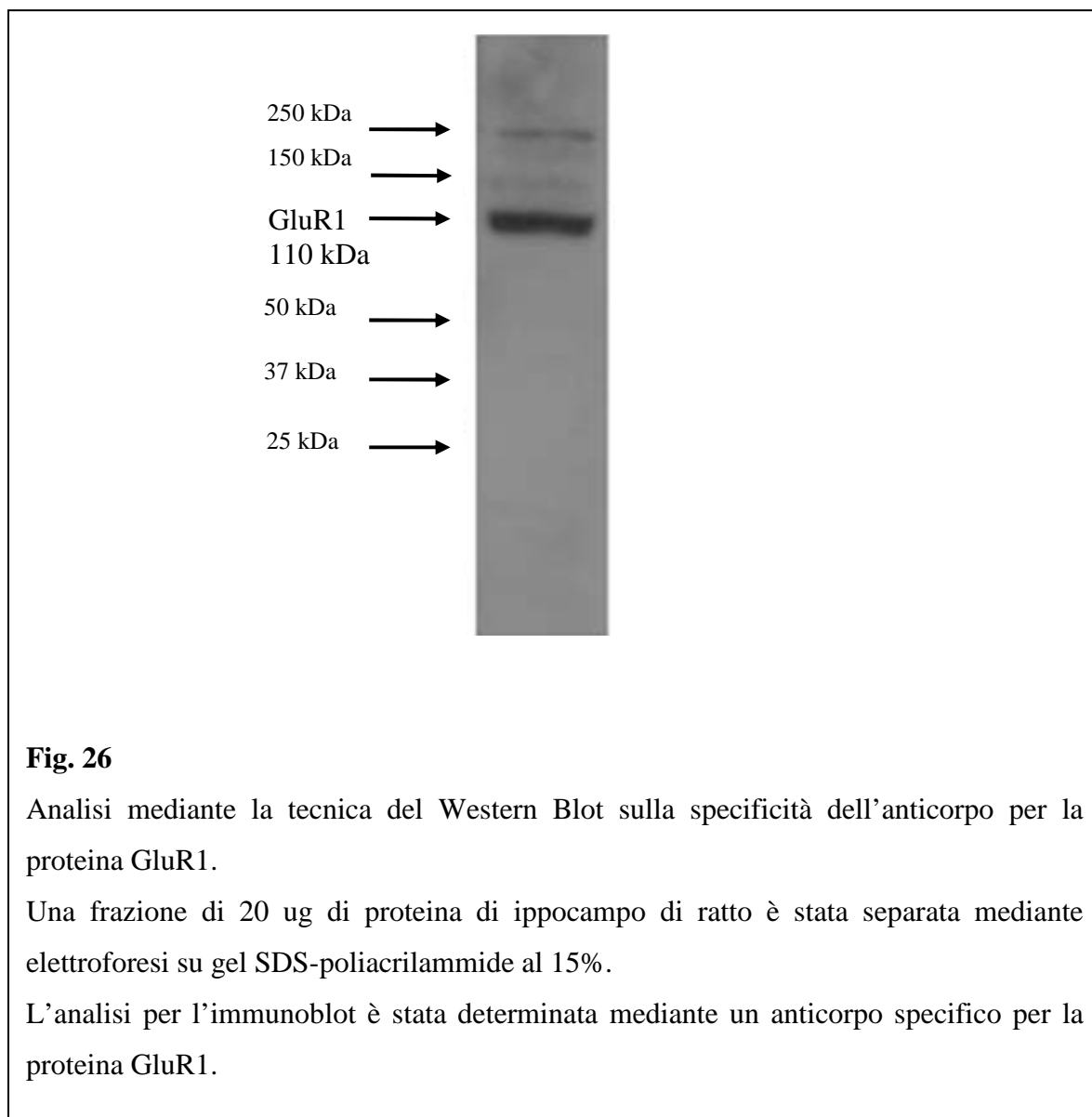


Determinazione dei livelli delle proteina GluR1 e GluR2 durante la gravidanza e dopo il parto

I recettori per il glutammato vengono classificati in ionotropici e metabotropici, e questi a loro volta vengono suddivisi in base al loro agonista preferenziale (NMDA, AMPA o acido kainico). Esistono 4 tipi di subunità diverse che possono costituire il recettore AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4), e la combinazione tetrameric o pentamerica di queste subunità, che possono formare complessi sia omomerici che eteromerici, contribuisce alla diversità funzionale del recettore. I recettori AMPA sono permeabili al Na⁺ e al K⁺ tuttavia è stato dimostrato che alcuni di questi recettori possono essere permeabili anche al Ca²⁺, come nel caso dei recettori omomerici costituiti dalle subunità GluR1, GluR3 e GluR4, mentre i recettori omomerici costituiti dalla subunità GluR2 sono impermeabili al Ca²⁺; infine nei recettori eteromerici la presenza o meno della subunità GluR2 risulta decisiva per la permeabilità del recettore al Ca²⁺, probabilmente perchè questa subunità presenta caratteristiche strutturali che bloccano il passaggio dello ione attraverso il recettore (Seeburg, 1993; Hollmann e Heinemann, 1994; Jonas e Burnashev, 1995).

Per poter approfondire lo studio sulle correnti eccitatorie postsinaptiche in miniatura glutamatergiche ho valutato l'espressione di 2 sottotipi del recettore AMPA per il glutammato, GluR1 e GluR2, nelle ratte durante la gravidanza (15, 19, 21 giorni), l'allattamento (2, 7, 10, 14, 21 giorni dopo il parto), dopo lo svezzamento dei cuccioli (28 e 42 giorni il parto) e in un gruppo di mamme a cui sono stati tolti i cuccioli 7 giorni dopo il parto e sacrificate dopo 3, 7, 14 giorni, cioè 10, 14 e 21 giorni dopo il parto

L'anticorpo utilizzato contro la proteina GluR1 è in grado di riconoscere una singola banda proteica la cui massa molecolare è di circa 110 kDa, corrispondente a quella della proteina GluR1 [Fig.26].



Nell'ippocampo di ratto i livelli della proteina GluR1 aumentano significativamente rispetto alle ratte in estro in prossimità del parto ma tornano ai livelli basali immediatamente dopo; durante il periodo dell'allattamento invece i valori aumentano nuovamente in modo significativo e tornano definitivamente ai livelli basali 4 settimane dopo il parto [figg.27 A e B]. La sottrazione dei cuccioli 7 giorni dopo il parto induce blande riduzioni non significative rispetto ai rispettivi controlli post partum, e solo la sottrazione dei cuccioli per 14 giorni riporta i valori ai livelli basali [figg.28 Ae B].

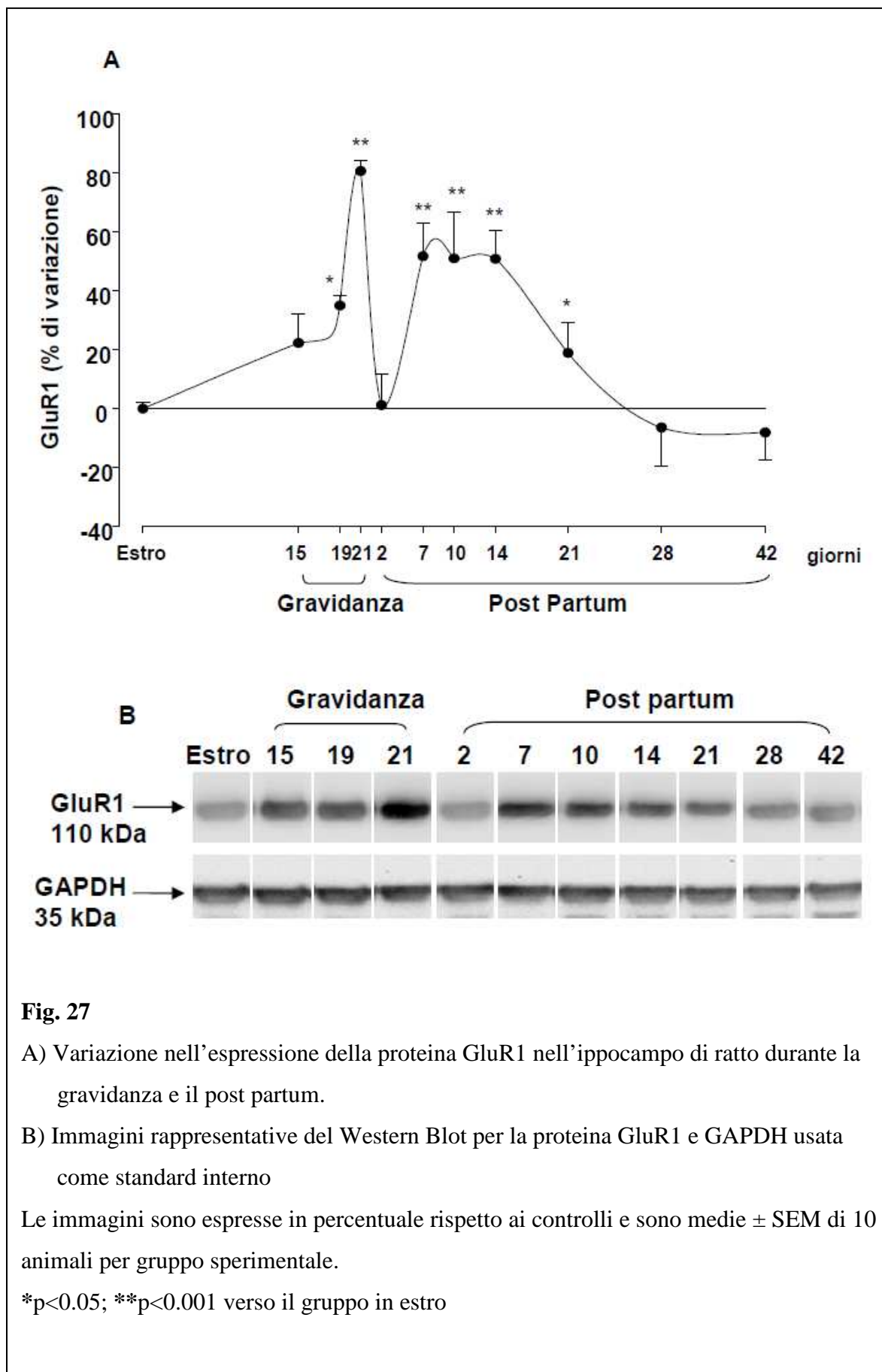


Fig. 27

A) Variazione nell'espressione della proteina GluR1 nell'ippocampo di ratto durante la gravidanza e il post partum.

B) Immagini rappresentative del Western Blot per la proteina GluR1 e GAPDH usata come standard interno

Le immagini sono espresse in percentuale rispetto ai controlli e sono medie \pm SEM di 10 animali per gruppo sperimentale.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ verso il gruppo in estro

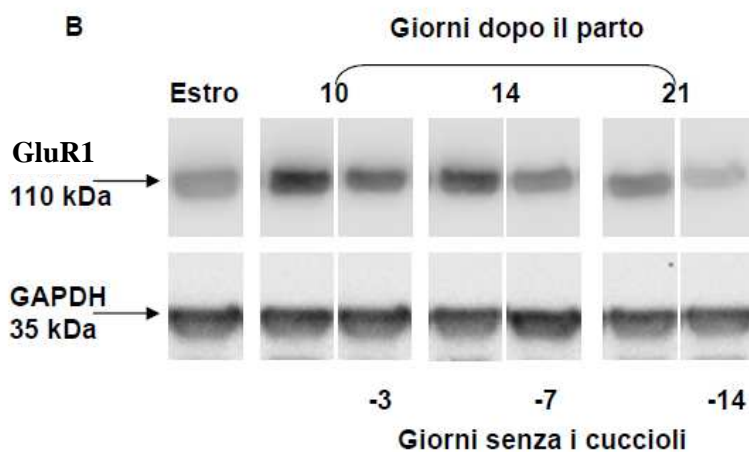
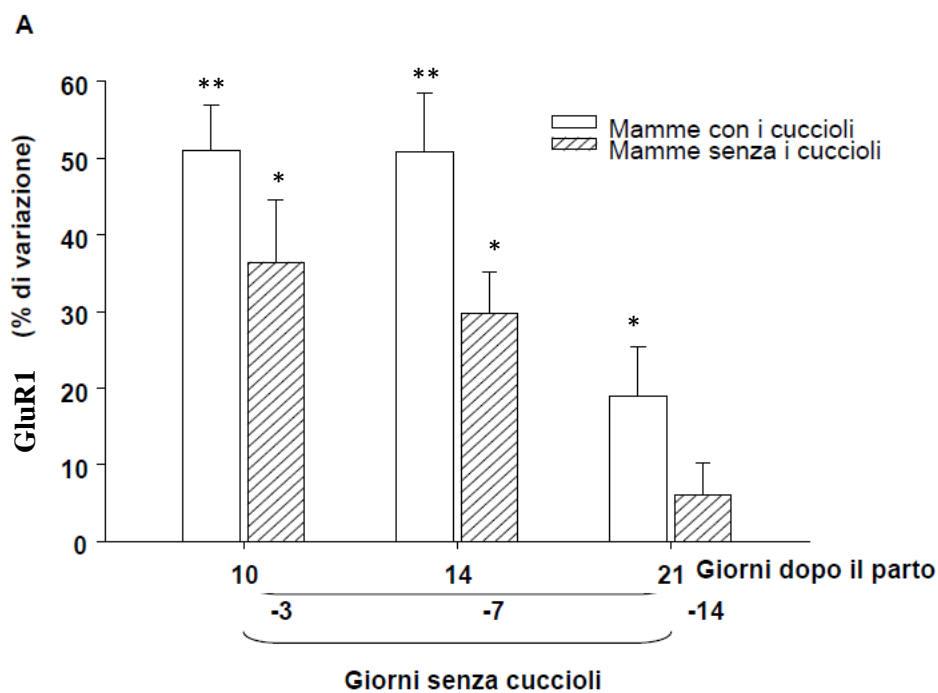


Fig. 28

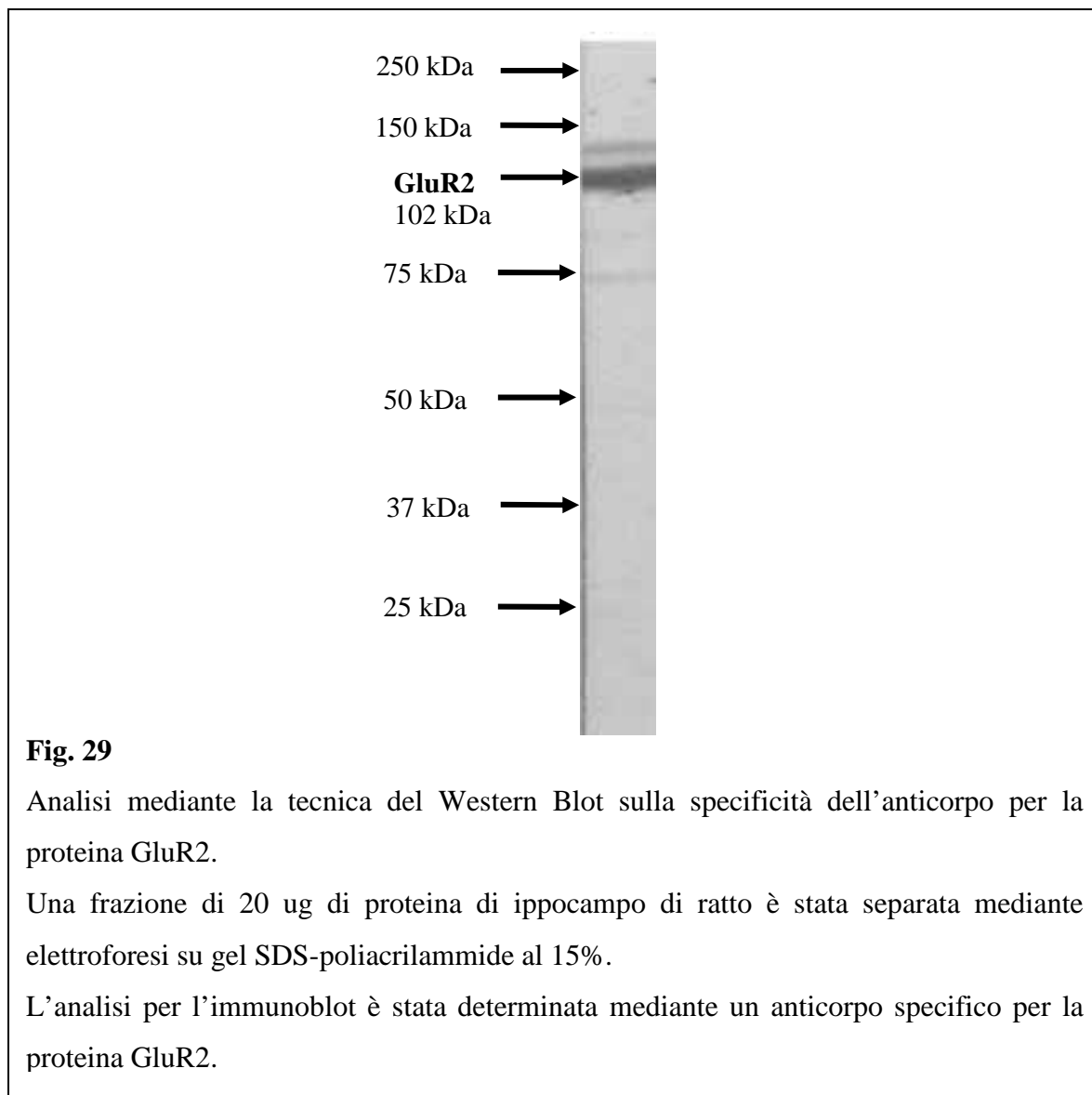
A) Variazione nell'espressione della proteina GluR1 nell'ippocampo di ratto nelle mamme private dei cuccioli

B) Immagini rappresentative del Western Blot per la proteina GluR1 e GAPDH usata come standard interno

Le immagini sono espresse in percentuale rispetto ai controlli e sono medie \pm SEM di 10 animali per gruppo sperimentale.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ verso il gruppo in estro.

L'anticorpo utilizzato contro la proteina GluR2 è in grado di riconoscere una singola banda proteica la cui massa molecolare è di 102 kDa, corrispondente perfettamente a quella della proteina GluR2 [Fig.29].



Nell'ippocampo di ratto l'espressione della proteina GluR2 aumenta drasticamente immediatamente prima del parto, ma 2 giorni dopo il parto i valori tornano ai livelli basali dell'estro. Durante le 3 settimane di allattamento è stata riscontrata una riduzione significativa nell'espressione della proteina GluR2 rispetto all'estro, e i valori sono tornati definitivamente ai livelli basali 4 settimane dopo il parto [figg.30 A e B]. La sottrazione dei cuccioli incrementa ulteriormente la riduzione dei livelli della proteina GluR2 rispetto ai controlli [figg.31 A e B].

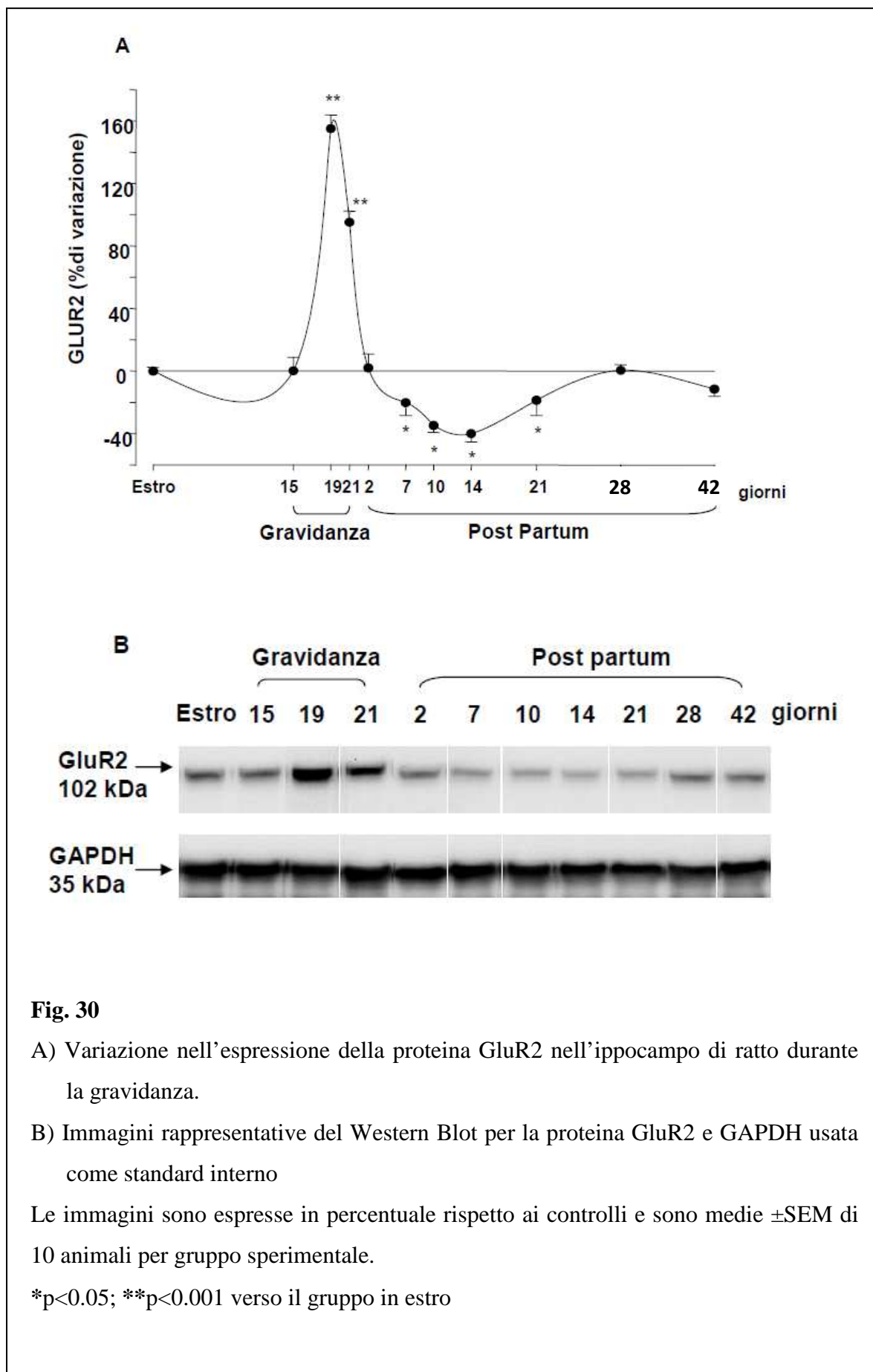


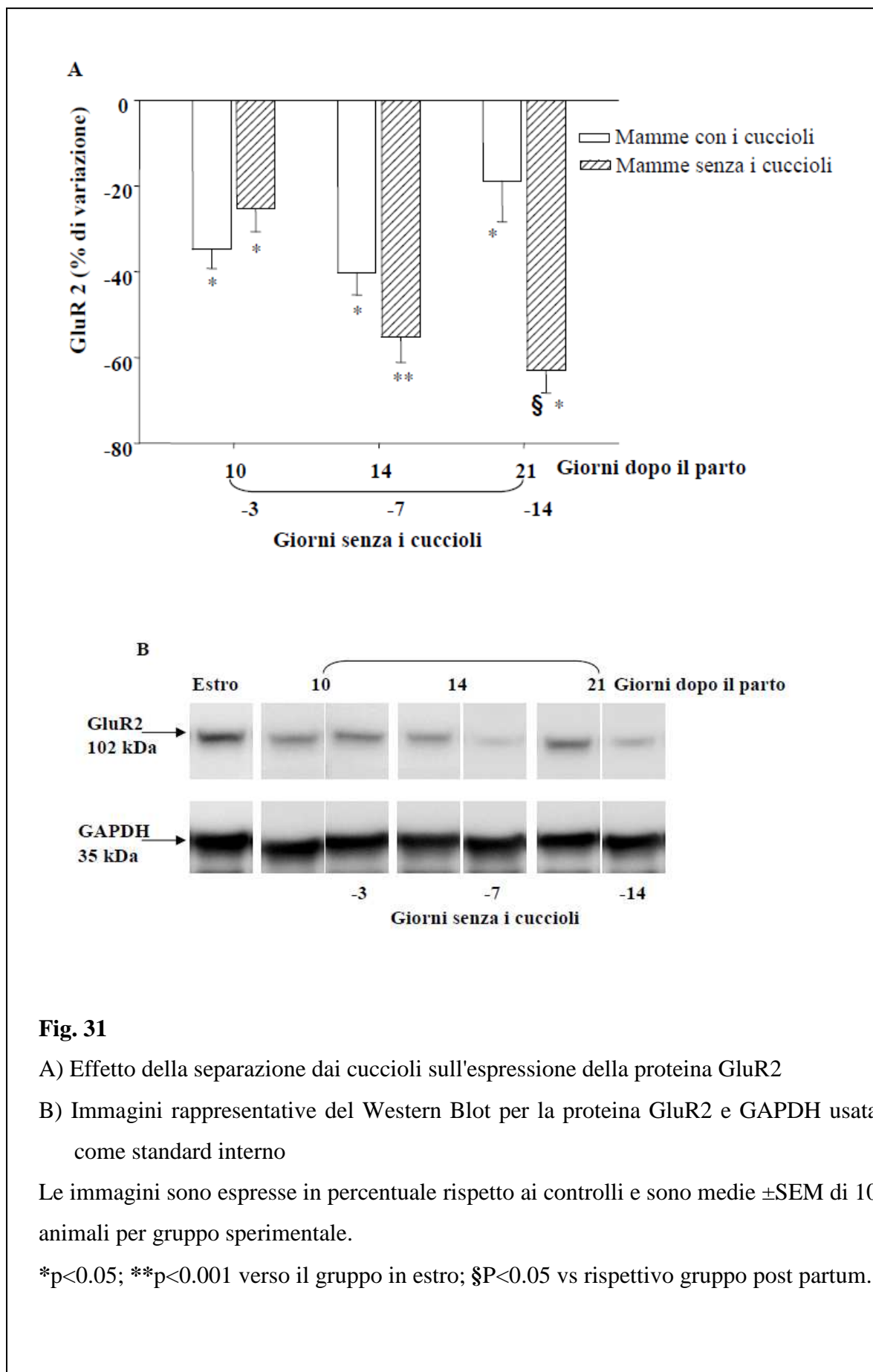
Fig. 30

A) Variazione nell'espressione della proteina GluR2 nell'ippocampo di ratto durante la gravidanza.

B) Immagini rappresentative del Western Blot per la proteina GluR2 e GAPDH usata come standard interno

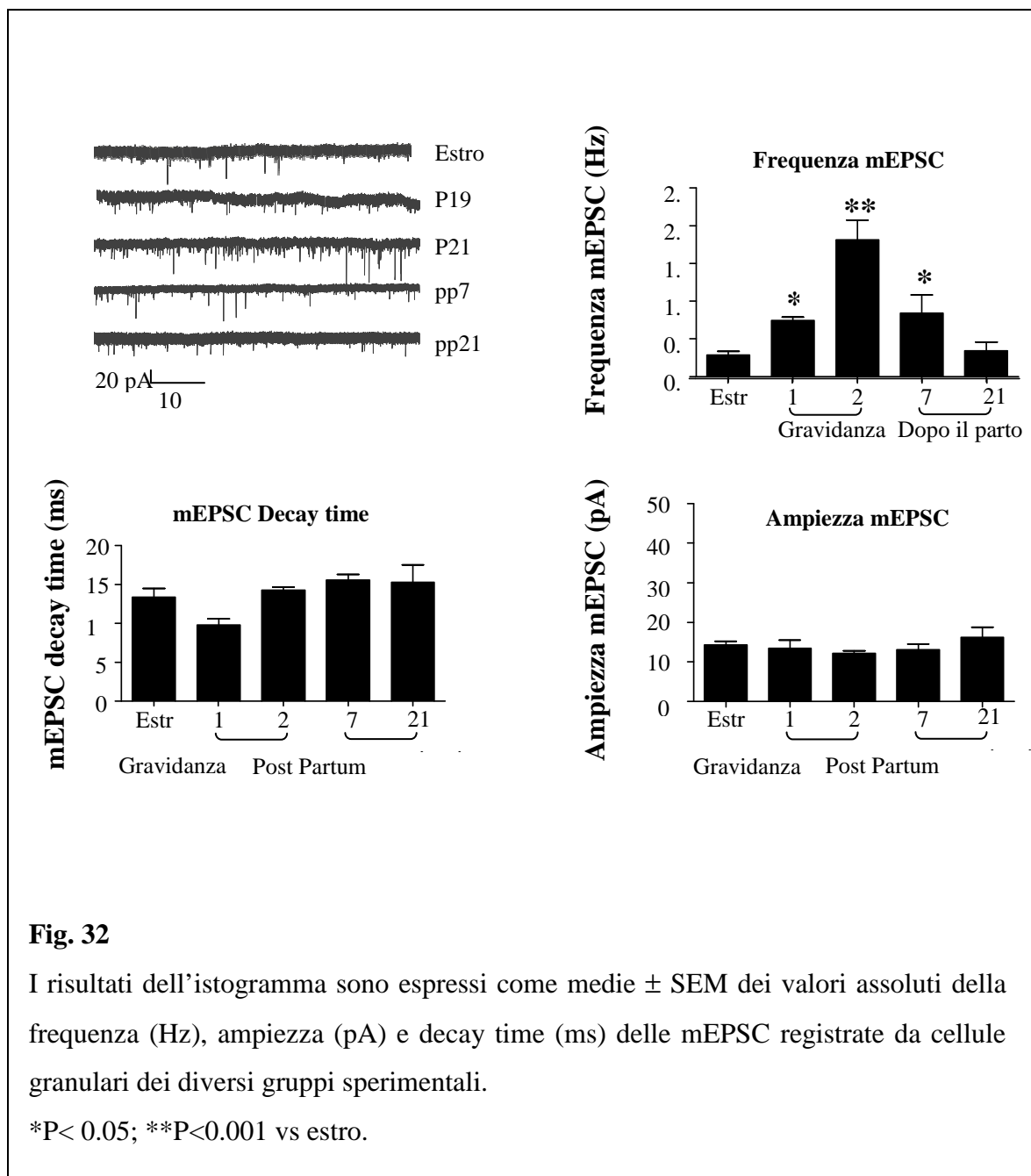
Le immagini sono espresse in percentuale rispetto ai controlli e sono medie \pm SEM di 10 animali per gruppo sperimentale.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ verso il gruppo in estro



Cambiamenti nelle correnti eccitatorie postsinaptiche in miniatura glutamatergiche (mEPSCs) nelle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza e dopo il parto

La frequenza delle correnti eccitatorie postsinaptiche in miniatura (mEPSCs) glutamatergiche nelle cellule granulari del giro dentato del ratto, misurate attraverso la tecnica del patch clamp in modalità whole cell, aumenta marcatamente al termine della gravidanza e dopo il parto in confronto alle ratte in fase di estro [fig.32]. In particolare al 19° giorno di gravidanza l'incremento è pari al 162% e al 21° raggiunge il 542%, mentre 7 giorni dopo il parto la frequenza è ancora incrementata per un valore pari al 197%. Solo 21 giorni dopo il parto l'effetto non è più significativo (+21%). Questi dati suggeriscono che durante la gravidanza e dopo il parto la probabilità di rilascio presinaptico del glutamato risulta incrementata. L'ampiezza e il decay time delle mEPSCs non subiscono variazioni significative e ciò indica che la funzione dei recettori postsinaptici per il glutamato non viene alterata durante la gravidanza e dopo il parto.



Le spine dendritiche durante la gravidanza e dopo il parto

Data l'importanza delle cure materne nel modulare la plasticità cerebrale ho voluto studiare lo sviluppo delle spine dendritiche durante la gravidanza (15, 19 e 21 giorni), dopo il parto (2, 7, 10, 14 e 21 giorni), dopo lo svezzamento dei cuccioli (28 e 42 giorni il parto) e nel gruppo di animali privato della cucciolata 7 giorni dopo il parto e sacrificati 3, 7 e 14 giorni dopo la separazione.

Durante la gravidanza la densità delle spine dendritiche totali nello strato molecolare dell'ippocampo aumenta gradualmente, ma solo al 21° giorno di gravidanza l'aumento è significativo rispetto al gruppo delle ratte in estro [figg. 33, 34]. Questi valori risultano aumentati anche durante le prime 3 settimane dopo il parto, cioè per tutto il periodo dell'allattamento, e tornano ai valori basali solo 4 settimane dopo il parto, ossia dopo lo svezzamento.

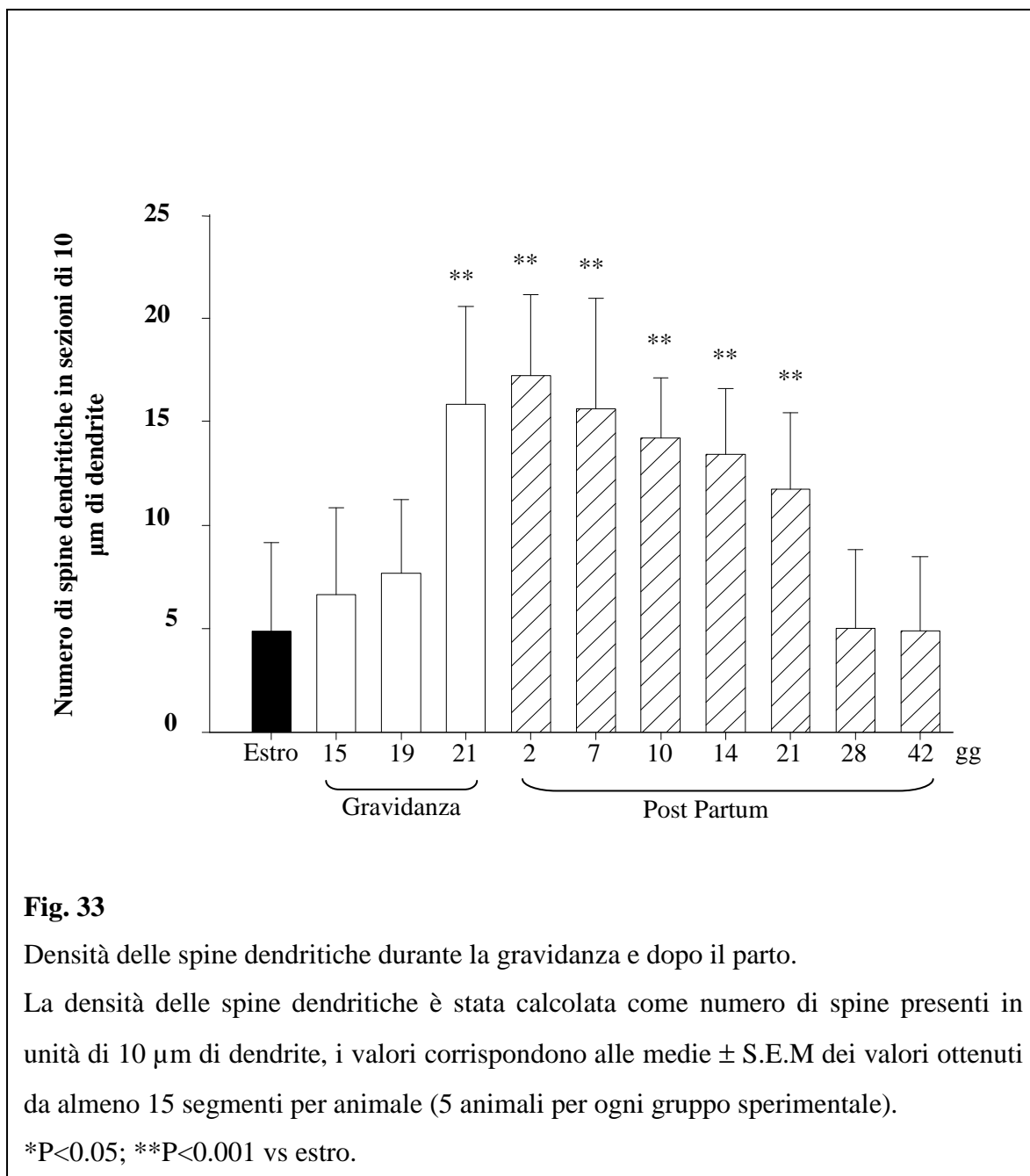


Fig. 33

Densità delle spine dendritiche durante la gravidanza e dopo il parto.

La densità delle spine dendritiche è stata calcolata come numero di spine presenti in unità di 10 μm di dendrite, i valori corrispondono alle medie \pm S.E.M dei valori ottenuti da almeno 15 segmenti per animale (5 animali per ogni gruppo sperimentale).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ vs estro.

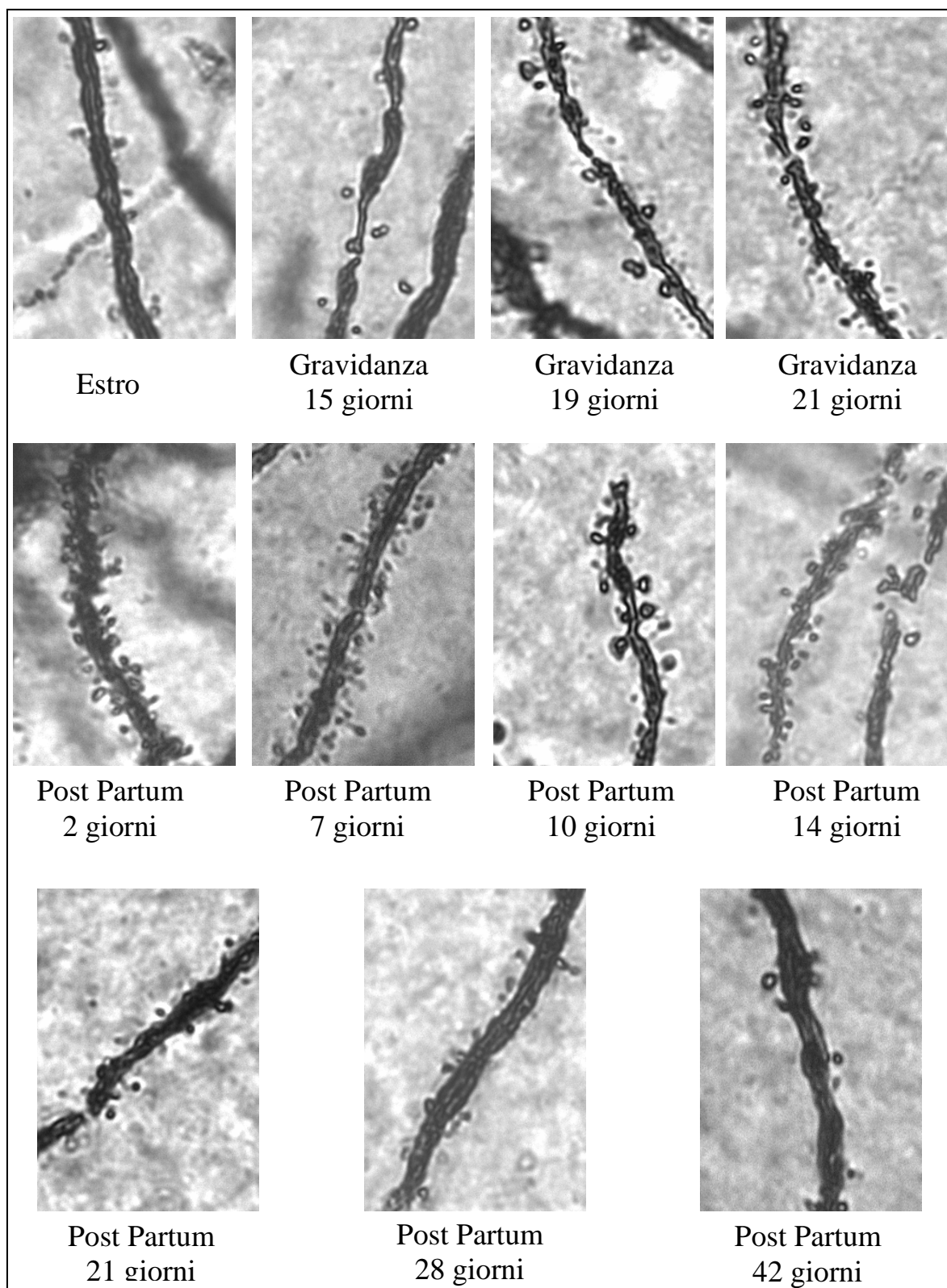


Fig. 34

Immagini rappresentative della densità delle spine dendritiche durante la gravidanza e dopo il parto. Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 100X (NA=1.3).

Al contrario la sottrazione improvvisa dei cuccioli determina una riduzione del numero totale di spine ed un aumento della percentuale dei filopodi nei confronti delle spine attive [Figg.35-37 e Tab.1].

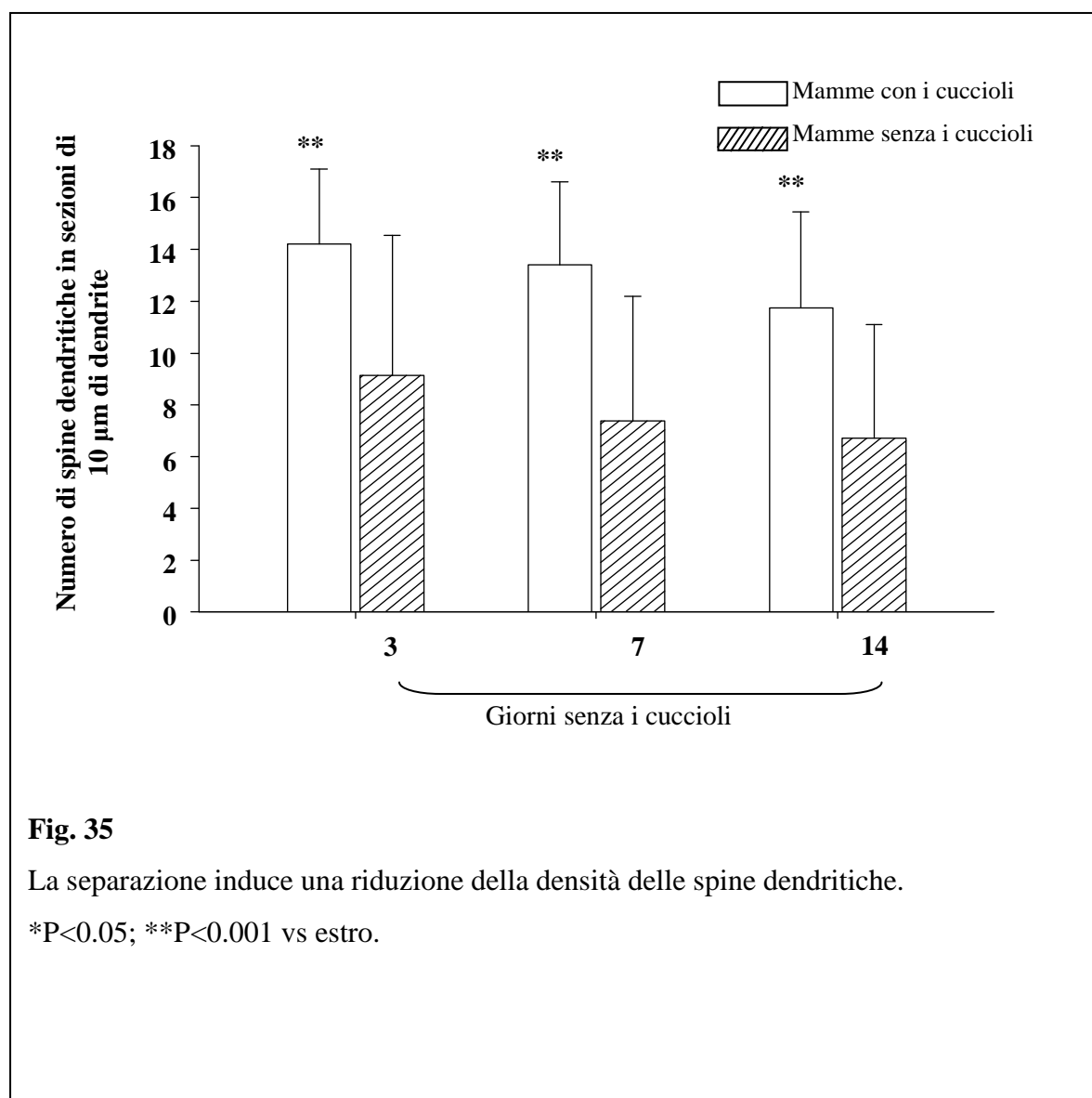
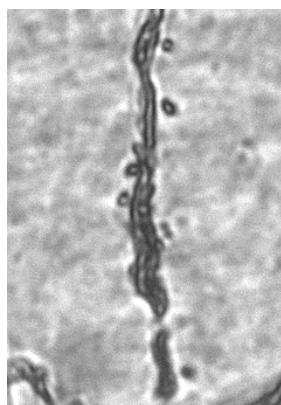


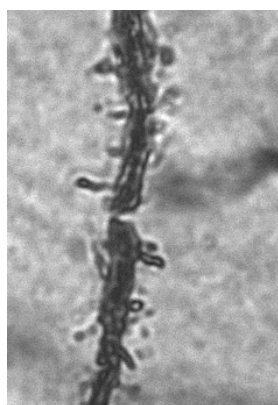
Fig. 35

La separazione induce una riduzione della densità delle spine dendritiche.

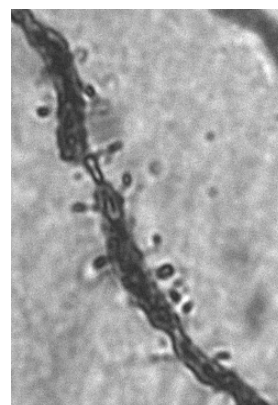
*P<0.05; **P<0.001 vs estro.



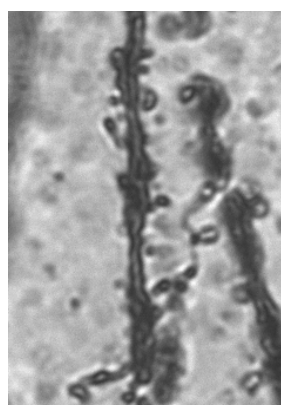
Estro



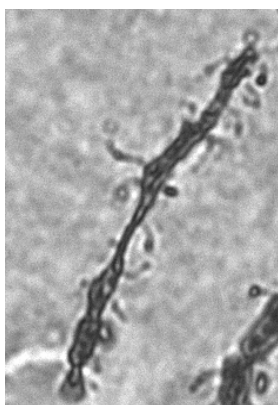
Post Partum
10 giorni



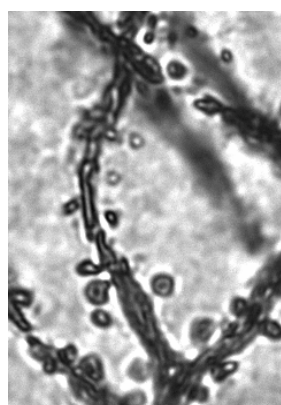
Post Partum 10 giorni
3 senza cuccioli



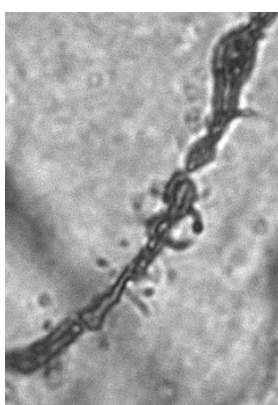
Post Partum
14 giorni



Post Partum 10 giorni
7 senza cuccioli



Post Partum
21 giorni



Post Partum 21 giorni
14 senza cuccioli

Fig. 36

Immagini rappresentative della densità delle spine dendritiche nelle madri private dei propri cuccioli. Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 100X (NA=1.3).

Nel mio studio ho fatto inoltre una distinzione tra le spine attive e i filopodi, che costituiscono una tipologia di spina non funzionante al momento del sacrificio dell'animale, e i dati ottenuti hanno mostrato che al termine della gravidanza e durante l'allattamento, oltre ad un aumento del numero totale di spine, si osserva anche un aumento significativo della percentuale di spine attive rispetto ai filopodi [tab.1].

Gruppi	N spine/10µm	% spine	% filopodi
estro	4,88 ± 5,3	84,13	15,87
gravide 15 gg	6,66 ± 6,2	81,91	18,09
gravide 19 gg	7,66 ± 4,6	89,58	10,42
gravide 21 gg	15,84 ± 5,7**	91,08**	8,92**
post partum 2 gg	17,22 ± 3,9**	91,14**	8,86**
post partum 7 gg	15,63 ± 6,3**	91,9**	8,1**
post partum 10 gg senza cuccioli da 3 gg	9,31 ± 5,4	86,87	13,12
post partum 14 gg senza cuccioli da 7 gg	7,38 ± 6,8	84,57	15,42
post partum 21 gg	11,74 ± 3,7	93,21	6,79
post partum 21 gg senza cuccioli da 14 gg	6,71 ± 4,4*	78,19*	21,81*

Tab. 1

I valori indicano la densità delle spine dendritiche per ogni gruppo sperimentale e la percentuale di spine attive e filopodi. La sottrazione dei cuccioli per 14 giorni provoca un aumento significativo della percentuale dei filopodi rispetto alle spine funzionalmente attive. $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs estro

Proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo di ratto durante la gravidanza e dopo il parto

Nel mio studio ho voluto valutare la proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo al 21° giorno di gravidanza, 2 e 21 giorni dopo il parto e in un gruppo di mamme sacrificate 21 giorni dopo il parto ma private della cucciolata 14 giorni prima.

Per marcare le cellule di nuova formazione ho utilizzato un kit commerciale della ditta Invitrogen che si basa sull'utilizzo di una molecola chiamata EdU, un analogo della timidina che si intercala nel DNA durante la replicazione cellulare, e di un sistema rivelatore chiamato Click-IT. Queste cellule sono visualizzate in colore verde. Tutti i neuroni invece sono stati marcati con Hoechst 33342 e sono stati visualizzati in blu.

I risultati ottenuti hanno mostrato che al termine della gravidanza la proliferazione cellulare aumenta in modo significativo rispetto agli animali in estro. Al contrario, dopo il parto si ha una diminuzione significativa della proliferazione. Nel gruppo di ratte private della loro cucciolata la proliferazione cellulare non sembra essere modificata in maniera significativa rispetto agli animali in estro [Figg.37,38].

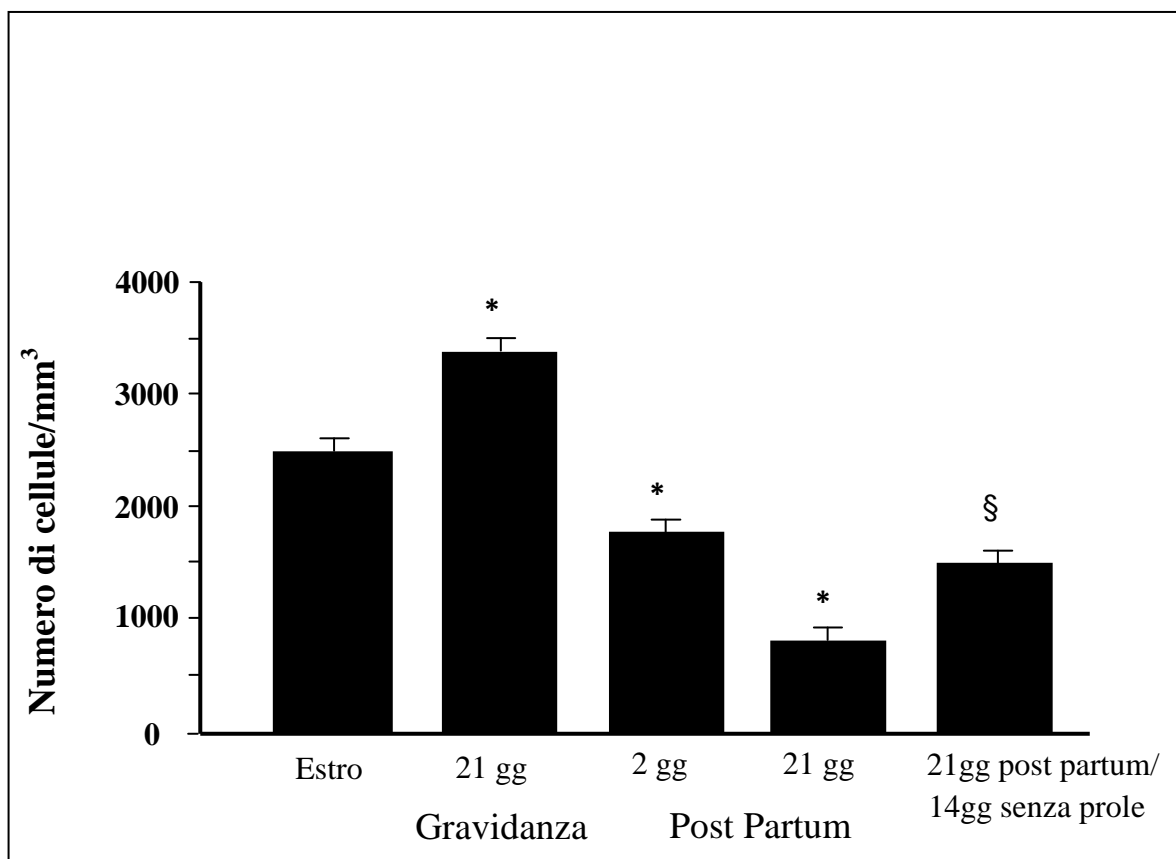


Fig. 37

Tabella che mostra la determinazione quantitativa delle cellule marcate con EdU/mm².

I risultati rappresentano la media \pm S.E.M. dei valori di almeno 7 animali per gruppo sperimentale. Sono state analizzate 20 fettine per animale.

I risultati sono espressi come numero di cellule/mm³.

* P < 0.05 vs Estro; § P < 0.05 vs 21gg post partum

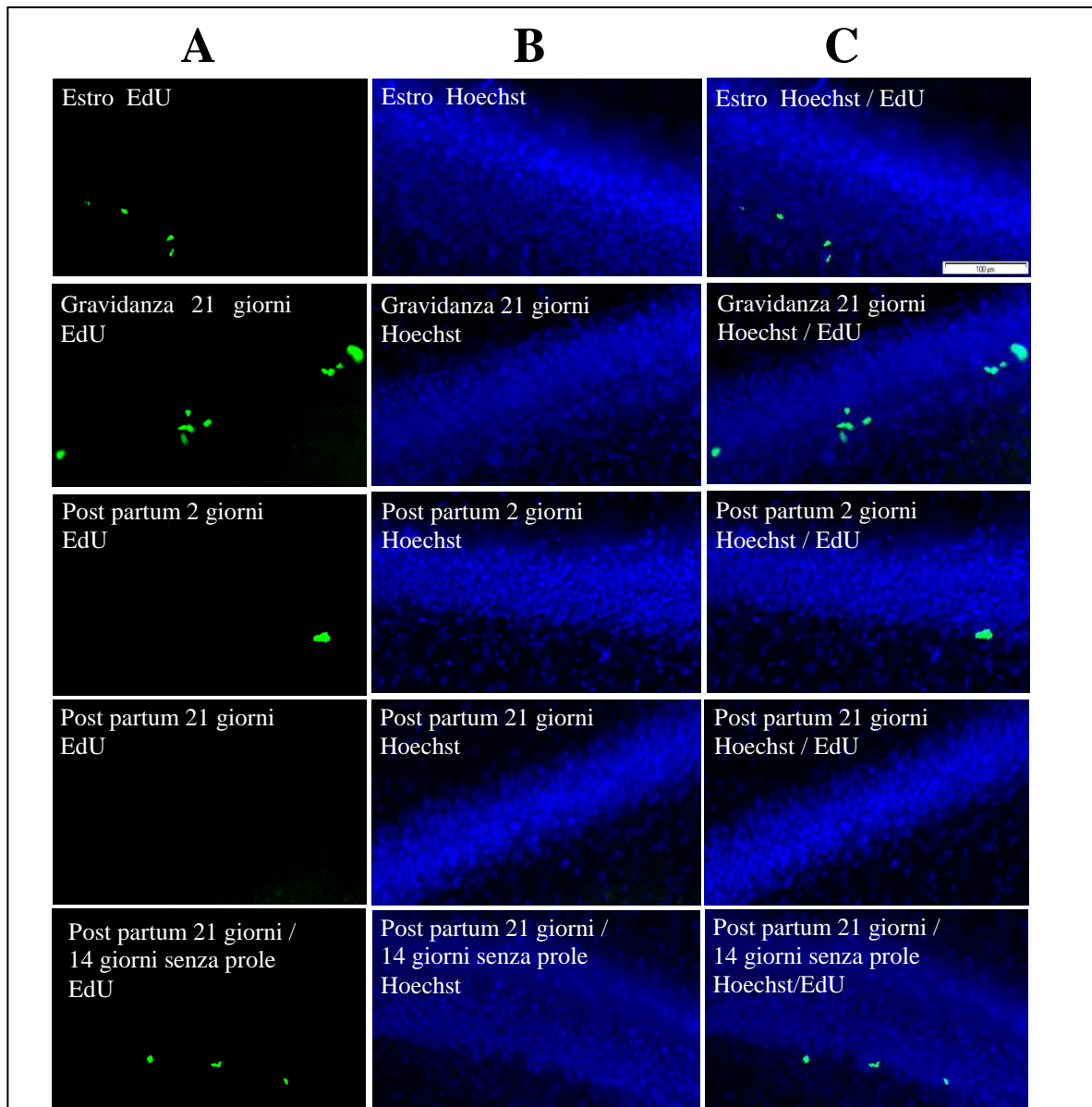


Fig. 38

La proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo aumenta al termine della gravidanza e si riduce dopo il parto.

Colonna A) marcatura con EdU/Alexa Fluor 488 delle cellule granulari della zona subventricolare del giro dentato di nuova formazione;

Colonna B) marcatura con Hoechst 33342 delle cellule granulari del giro dentato;

Colonna C) sovrapposizione delle immagini ottenute marcando le cellule in proliferazione (verde) e tutti i neuroni (blu). In questo modo è stato possibile localizzare le cellule in poliferaazione nello strato subgranulare del giro dentato dell'ippocampo.

Discussione

I risultati da me ottenuti hanno mostrato che durante la gravidanza non si osservano modificazioni nella plasticità dell'ippocampo, in quanto sia i livelli di BDNF e di proteina Arc, la densità delle spine dendritiche, la long term potentiation e la frequenza delle correnti postsinaptiche in miniatura glutamatergiche non subiscono variazioni significative rispetto al gruppo di controllo costituito dalle ratte in fase di estro. Al 21° giorno di gravidanza invece i livelli di espressione del fattore trofico BDNF aumentano notevolmente, e i valori si mantengono alti per tutta la durata dell'allattamento. Un andamento analogo si osserva anche per quanto riguarda l'espressione della proteina Arc. La stretta correlazione esistente tra BDNF e proteina Arc nella regolazione dell'architettura neuronale è stata confermata ulteriormente dall'aumento nella densità delle spine dendritiche osservato in prossimità del parto.

È importante sottolineare che gli aumenti nei livelli di BDNF e di proteina Arc non sembrano essere regolati dall'azione dell'estrogeno e dai metaboliti del progesterone, due tra i principali ormoni della gravidanza. Infatti l'aumento dell'espressione delle proteine è stato osservato solo alla fine della gravidanza, quando i livelli dei 2 ormoni si riducono drasticamente. Inoltre il pretrattamento con finasteride e clomifene, rispettivamente un inibitore della 5 α -reduttasi e un antagonista dei recettori per l'estrogeno, non antagonizzano l'aumento di BDNF e di proteina Arc.

Esiste una vasta letteratura che mette in stretta correlazione i livelli di BDNF con quelli di estrogeno e progesterone. Per esempio Begliuomini e i suoi collaboratori (2007) hanno mostrato che le variazioni nei livelli di BDNF variano durante il ciclo mestruale nel plasma delle donne in maniera strettamente correlata ai livelli di estrogeno. Nei primi giorni del ciclo i valori di entrambi sono molto bassi e aumentano al 14° giorno raggiungendo il picco massimo qualche ora prima della fase luteale. Al termine della fase di preovulazione poi il BDNF e l'estradiolo diminuiscono, raggiungendo il valore minimo al 16°-17° giorno del ciclo mestruale. Successivamente il progesterone incomincia ad aumentare a causa del rilascio

dell'ormone luteinizzante. Durante questi giorni si ha un nuovo incremento dell'ormone BDNF.

Altri lavori, eseguiti su animali ovariectomizzati, hanno mostrato chiaramente come i livelli di BDNF aumentano dopo trattamento di questi animali con estrogeno (*Woolley e McEwen, 1992, 1993; Woolley et al., 1990a e b; Yankova et al., 2001*).

Questi risultati nel loro insieme sembrano essere in disaccordo con i dati da me ottenuti. Nel ratto la gravidanza dura 21 giorni, e durante questo periodo i livelli di progesterone ed estrogeno aumentano gradualmente fino a raggiungere il picco massimo al 15°-19° giorno (*Concas et al., 1998*). Con l'avvicinarsi del parto i livelli di questi due ormoni diminuiscono bruscamente e contemporaneamente aumentano i livelli degli ormoni ossitocina e prolattina. Per cui, proprio quando si ha la caduta di progesterone ed estradiolo si ha l'aumento dei livelli di BDNF. Quindi l'aumento del BDNF osservato nei miei studi al termine della gravidanza non è correlato, ai livelli di estrogeno o progesterone.

É tuttavia importante sottolineare che i dati da me ottenuti sono stati condotti in un modello sperimentale differente, e cioè in una condizione naturale come la gravidanza e non in animali ovariectomizzati e trattati successivamente con progesterone ed estradiolo, cioè in una condizione che mima una falsa gravidanza (*Woolley e Mc Ewen 1992; 1993; Woolley et al., 1990; Yankova et al., 2001*). E non bisogna nemmeno dimenticare che il modello della gravidanza è molto complesso ed è molto diverso dal ciclo mestruale; durante la gravidanza infatti non si hanno fluttuazioni improvvise di ormoni, e il cervello sembra adattarsi alle variazioni graduali dei livelli di estradiolo e progesterone. I lavori citati hanno comunque una grande importanza nel facilitare la comprensione di alcuni meccanismi fisiologici indotti dal progesterone e dall'estradiolo, ma bisogna essere consapevoli che non prendono in considerazione la fluttuazione ormonale naturale ed endogena di questi ormoni ma un modello sperimentale di terapia ormonale, che in quanto tale non può essere paragonata ad una condizione naturale come quella considerata nel mio studio.

Sia il BDNF che l'estrogeno rivestono ruoli molto importanti nel cervello: aumentano la densità delle spine dendritiche e il numero delle sinapsi (*Mc Ewen et al., 2001; Segal e Murphy, 2001; Tyler et al., 2002*), aumentano la trasmissione mediata dal glutammato (*Woolley et al., 1998; Lu, 2003*), modulano il recettore per l'NMDA (*Adams et al., 2004*), facilitano la memoria (*Luine, 1997; Tyler et al., 2002*).

Nei miei risultati ho mostrato che al termine della gravidanza e durante tutto il periodo dell'allattamento si ha un aumento di BDNF e proteina Arc e parallelamente un aumento della densità delle spine dendritiche nel giro dentato dell'ippocampo. Questi dati sono stati confermati a livello funzionale da un incremento delle correnti postsinaptiche glutamatergiche, la cui frequenza ha raggiunto il picco al 21° giorno di gravidanza, e dal potenziamento sinaptico a lungo termine osservato nel medesimo gruppo sperimentale.

Numerosi studi hanno dimostrato che proprio in prossimità del parto e durante il periodo dell'allattamento si ha un aumento della plasticità cerebrale con un aumento del numero delle spine dendritiche, a cui è associato un miglioramento dell'apprendimento e della memoria, soprattutto della memoria spaziale (*Kinsley et al., 1999; Lambert et al., 2005; Tomizawa et al., 2003; Wartella et al., 2003*). Nonostante l'ippocampo non sia un'area direttamente implicata nei circuiti materni, sembrerebbe comunque che l'esperienza riproduttiva abbia un ruolo importante nella regolazione delle funzioni ippocampali correlate con l'apprendimento e la memoria (*Kinsley et al., 1999; Pawluski e Galea, 2007; Pawluski et al., 2006*).

Poichè gli ormoni della gravidanza sono in grado di alterare la struttura dei neuroni nell'adulto, di conseguenza l'esperienza stessa della gravidanza, con le fluttuazioni ormonali che la accompagnano, può esercitare notevoli effetti sulla struttura e la funzione neuronale in tutto il cervello, e non limitatamente a zone associate con il comportamento materno. Durante la gravidanza l'estrogeno e il progesterone preparano i vari organi come l'utero, le ghiandole mammarie ed il cervello ad accogliere e curare i piccoli (*Numan e Insel, 2003*). È ampiamente

dimostrato che nel profilo ormonale caratteristico della gravidanza, non solo l'estrogeno e il progesterone, ma anche la prolattina ha un ruolo significativo nell'indurre nelle femmine i comportamenti materni (*Bridges et al., 1984, 1990*). Questo è dovuto sia ad un'azione diretta degli ormoni sul cervello, sia ad un'alterazione dello stato umorale della madre che si prepara ad allevare la prole. L'aumento dei livelli di BDNF da me mostrato nell'ultimo periodo della gravidanza e durante il post partum e parallelamente l'aumento delle spine dendritiche sono in accordo con gli studi di Kinsley e coll. che hanno osservato un aumento del numero delle spine dendritiche nell'ippocampo solo negli ultimi giorni di gravidanza (*Kinsley et al., 2008*), e anche con Woolley e coll. che più volte hanno mostrato un aumento delle spine negli animali ovariectomizzati e trattati con estradiolo e progesterone (*Woolley et al., 1998; Woolley et al., 1990 a e b; Woolley e McEwen, 1992, 1993*). Inoltre anche l'incremento della densità delle spine mostrato nel mio studio nel periodo post partum conferma i dati ottenuti da Kinsley e coll. nel 2006. Un altro studio (*Rasia-Filho et al., 2004*) mostra effetti simili a quelli da me descritti sulle spine dendritiche nel nucleo antero-mediale dorsale dell'amigdala. Quindi gli effetti dell'esperienza materna si estendono anche alla regione limbica, un'area del cervello in grado di regolare alcuni aspetti del comportamento materno come la riduzione delle risposte all'ansia e alla paura che rendono la madre capace di gestire meglio situazioni stressanti che si possono verificare al di fuori del nido (*Wartella et al., 2003*).

Ma estrogeno e progesterone non sono gli unici ormoni a svolgere un ruolo importante nella gravidanza e soprattutto nel periodo post partum: infatti contemporaneamente alla caduta improvvisa dei livelli di progesterone ed estradiolo al momento del parto i livelli di ossitocina e prolattina aumentano e si mantengono elevati per tutto il periodo dell'allattamento e delle cure materne.

Nei ratti le cure materne costituiscono un insieme di comportamenti nuovi (*Gubernick, 1981; Gubernick e Klopfer, 1981; Wiesner e Sheard, 1933*); per esempio la madre deve saper costruire un nido accogliente, deve essere in grado di individuare i cuccioli e raggrupparli, li

deve leccare e pulire, li deve distinguere dai piccoli non suoi presenti nella stessa nidata e deve saperli difendere da eventuali pericoli e predatori. Essa stessa poi deve mangiare, bere e dormire in modo differente, deve ricordarsi dove si trovano cibo, acqua e potenziali pericoli. In sintesi le cure materne comprendono, nel loro insieme, una serie di comportamenti necessari per le cure e la sopravvivenza della prole.

Alcuni aspetti del comportamento materno riflettono gli effetti dovuti all'aumento dei livelli di BDNF e del numero delle spine da me osservati. Il miglior apprendimento e una migliore memoria spaziale sono in accordo con un aumento della plasticità neuronale nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale.

L'importanza delle variazioni endocrine che si osservano dopo il parto nello stimolare l'insorgenza delle cure materne e alterare quindi la plasticità di alcune zone cerebrali è stato oggetto di studio da parte di Bridges e coll. nel 1990: essi infatti hanno dimostrato che nei ratti ipofisectomizzati, trattati inizialmente con progesterone ed estrogeno e successivamente con prolattina si ha l'insorgenza di comportamenti materni. Se i ratti ipofisectomizzati vengono trattati solo con progesterone ed estrogeni non si ha l'insorgenza di comportamenti materni (Bridges *et al.*, 1990), ma questi compaiono solo se gli stessi animali vengono poi trattati con prolattina o se gli viene fatto un impianto di ipofisi (che stimola la produzione di prolattina). Da questo studio è emerso anche che gli animali che hanno comportamenti materni più marcati sono anche quelli che hanno più alti livelli di prolattina. L'ormone prolattina inoltre è in grado di mediare la neurogenesi indotta dalla gravidanza nell'area sub-ventricolare del bulbo olfattivo (Shingo *et al.*, 2003).

Altri ormoni possono avere un ruolo importante nel modulare il comportamento materno e la plasticità neuronale, come il lattogeno placentare e l'ossitocina (Bridges *et al.*, 1996; Numan e Insel, 2003; Tonkowicz e Voogt, 1983; Voogt *et al.*, 1982). In particolare l'ossitocina costituisce un fattore importante per il miglioramento dell'apprendimento ippocampo-dipendente e per LTP durante la maternità (Tomizawa *et al.* 2003).

Tutti questi studi nel loro insieme sembrano suggerire che durante l'allattamento si abbia una modulazione di diversi fattori trofici, la riorganizzazione delle interazioni tra le cellule, la formazione di nuove sinapsi e un migliore apprendimento (*Kandel, 1991; Kuno, 1995; Levitan e Kaczmarek, 1991; Modney e Hatton, 1990*).

Nella mia tesi inoltre ho esaminato la plasticità cellulare anche attraverso lo studio della proliferazione cellulare nella zona subgranulare del giro dentato dell'ippocampo; i risultati ottenuti hanno mostrato che al termine della gravidanza vi è un aumento della proliferazione cellulare, mentre nel periodo post partum la proliferazione appare diminuita. Questi risultati sono confermati da numerosi studi presenti in letteratura (*Darnaudery et al., 2007; Leuner et al., 2007; Pawluski e Galea, 2007*). Un altro gruppo di ricerca ha mostrato che le ratte durante la gravidanza hanno un diminuito volume ippocampale se paragonato alle ratte non gravide (*Galea et al., 2000*), e questi risultati confermano ulteriormente che la gravidanza costituisce un periodo in cui si osserva una aumentata neurogenesi.

Recenti ricerche hanno mostrato che i livelli di espressione della forma polisialilata della molecola di adesione delle cellule neuronali NCAM (PSA-NCAM), che ha un importante ruolo nella migrazione cellulare, è aumentata al 18° giorno di gravidanza (*Banasr et al., 2001*), e la proliferazione cellulare risulta essere aumentata al termine della gravidanza. Pawluski e Galea (2007) hanno mostrato delle differenze fra proliferazione cellulare e sopravvivenza cellulare durante la gravidanza e il periodo post partum. Anche loro hanno osservato un'aumentata proliferazione cellulare solo a 21 giorni di gravidanza. Al contrario, durante il periodo post partum è stato osservato, anche da altri autori, che vi è una ridotta proliferazione cellulare nella zona subgranulare dell'ippocampo (*Darnaudery et al., 2007; Leuner et al., 2007; Pawluski e Galea, 2007*). Probabilmente la diminuita concentrazione dei livelli di corticosterone che normalmente si osserva durante il periodo post partum e la caduta dei livelli di estrogeno durante il parto potrebbero essere la causa della diminuzione della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo. Questi risultati suggeriscono che gli steroidi

provenienti dalle gonadi e quelli provenienti dal surrene hanno un ruolo importante nel controllo della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo (*Pawluski e Galea, 2007*). Tuttavia se la proliferazione cellulare appare ridotta durante il periodo post partum, al contrario la sopravvivenza cellulare appare aumentata (*Pawluski e Galea, 2007*).

Un dato molto importante mostrato nel mio studio è che gli aumenti di BDNF, proteina Arc, la densità delle spine dendritiche, la LTP e la neurogenesi osservati durante il periodo post partum vengono revertiti quando all'animale viene sottratta la prole. Perciò si può ipotizzare che in una madre lo stress subito per la sottrazione dei cuccioli o la mancanza stessa degli stimoli provenienti dalla cucciolata stessa siano la causa principale della ridotta plasticità neuronale. I cuccioli infatti forniscono alla madre un'enorme quantità di input sensoriali, come per esempio stimolazioni olfattive, che possono essere avverse per una femmina vergine (*Fleming e Luebke, 1981*) mentre diventano attrattive per una ratta nel post partum (*Kinsley e Bridges, 1990*); stimoli uditivi nella forma di comunicazioni soniche e ultrasoniche (*Turley e Floody, 1981*); inoltre stimolazioni gustative, visive e soprattutto tattili dovute al contatto fisico con i cuccioli sono necessarie per la regolazione del comportamento materno (*Lonstein e Stern, 1997a,b; Stern, 1997*). Questi stimoli possono riorganizzare la corteccia somatosensoriale della madre durante l'allattamento (*Xerri et al., 1994*) suggerendo l'esistenza di una forma di plasticità indotta dalla riproduzione, che si potrebbe definire come ambiente socialmente arricchito dalla presenza dei cuccioli. I dati ottenuti dal mio studio infatti suggeriscono che la presenza dei cuccioli svolga un ruolo molto importante per le loro cure e la loro stessa sopravvivenza attraverso la traduzione delle stimolazioni sensoriali in alterazioni morfologiche e funzionali nel cervello materno, le quali ottimizzano l'efficienza, l'apprendimento, la memoria e altri benefici comportamentali nella madre (*Gatewood et al., 2005; Kinsley et al., 1999; Lambert et al., 2005; Wartella et al., 2003*).

Da tutto quanto descritto finora sembra che la plasticità neuronale osservata sia durante la gravidanza che dopo il parto venga indotta e modulata dalle interazioni funzionali di

numerosi ormoni, soprattutto estrogeno, progesterone, ossitocina e prolattina, i cui livelli variano notevolmente in quest'arco di tempo, ma anche dalla stimolazione ambientale indotta dalla presenza dei cuccioli, che costituiscono per la madre un fattore di importanza quasi vitale.

In conclusione, i dati del mio studio suggeriscono che sia gli ormoni della gravidanza e dell'allattamento, sia la stimolazione ambientale prodotta dalla presenza dei cuccioli, costituiscono due fattori in grado di indurre plasticità nell'ippocampo attraverso un aumento nell'espressione di fattori trofici che si traduce in un aumento della densità delle spine dendritiche, le quali a loro volta inducono un incremento delle correnti postsinaptiche glutamatergiche e un potenziamento delle sinapsi.

Il cervello materno è una struttura estremamente flessibile, e questa plasticità contribuisce a regolare tutta una serie di comportamenti volti ad assicurare la cura e la protezione dei cuccioli. Tutta questa grande attività neuronale ha quindi un unico grande scopo: garantire la più grande probabilità possibile di successo riproduttivo.

Bibliografia

- Aakalu G., Smith W.B., Nguyen N., Jiang C., Schuman E.M. *Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons*, (2001) *Neuron* 30(2):489-502.
- Abraham W.C., Mason S.E., Demmer J., Williams J.M., Richardson C.L., Tate W.P., Lawlor P.A., Dragunow M. *Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation*, (1993) *Neuroscience* 56(3):717-27.
- Adams M.M., Fink S.E., Janssen W.G., Shah R.A., Morrison J.H. *Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus*, (2004) *J. Comp. Neurol.* 474(3):419-26.
- Aliaga E, Arancibia S, Givalois L, Tapia-Arancibia L. *Osmotic stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the hypothalamic supraoptic nucleus with differential regulation of its transcripts. Relation to arginine-vasopressin content*, (2002) *Neuroscience.*; 112(4):841-50.
- Alonso M., Medina J.H., Pozzo-Miller L.D. *ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons*, (2004) *L. Learn. Mem.*11(2):172-8.
- Alsina B, Vu T, Cohen-Cory S. *Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF*, (2001) *Nat Neurosci.*; 4(11):1093-101.
- Altar CA, DiStefano PS., *Neurotrophin trafficking by anterograde transport*, (1998) *Trends Neurosci.*; 21(10):433-7.
- Altman J., Das G.D. *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*, (1965) *J Comp. Neurol.* 124:319–335.
- Altman J., Das G.D. *Postnatal neurogenesis in the guinea-pig*, (1967) *Nature* 214 1098–1101
- Ankeny D.P., McTigue D.M., Guan Z., Yan Q., Kinstler O., Stokes B.T., Jakeman L.B. *Pegylated brain-derived neurotrophic factor shows improved distribution into the spinal cord and stimulates locomotor activity and morphological changes after injury*, (2001) *Exp. Neurol.*170(1):85-100.

- Asztely F., Kokaia M., Olofsson K., Ortengren U., Lindvall O. *Afferent-specific modulation of short-term synaptic plasticity by neurotrophins in dentate gyrus*, (2000) Eur. J Neurosci. 12(2):662-9.
- Azcoitia I., Leonelli E., Magnaghi V., Veiga S., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C. *Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats*, (2003) Neurobiol. Aging 24(6):853-60.
- Balkowiec A., Katz D.M. *Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons*, (2002) J. Neurosci. 22(23):10399-407.
- Banasr M, Hery M, Brezun JM, Daszuta A. *Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus*, (2001) Eur J Neurosci.;14(9):1417-24.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*, (1982) EMBO J.; 1(5):549-53.
- Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Sale A, Maffei L., *Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment*, (2010) Cell Death Differ.;17(7):1092-103. Epub 2009 Dec 18.
- Baulieu E.E. (1981) Pergamon Press, Oxford 3-14.
- Begliuomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, Pieri M, Genazzani AD, Luisi S, Genazzani AR *Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor*, (2007) Hum Reprod.; 22(4):995-1002. Epub 2007 Jan 24.
- Berchtol N.C., Kessler J.P., Pike C.J., Adlard P.A., Cotman C.W. *Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus*, (2001) Eur. J Neurosci. 14(12):1992-2002
- Berninger B, Poo M. *Fast actions of neurotrophic factors*, (1996) Curr Opin Neurobiol. Jun;6(3):324-30.

- Bi R., Broutman G., Foy M.R., Thompson R.F., Baudry M. *The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus*, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97(7):3602-7.
- Bi R., Foy M.R., Thompson R.F., Baudry M. *Effects of estrogen, age, and calpain on MAP kinase and NMDA receptors in female rat brain*, (2003) Neurobiol. Aging. 24(7):977-83.
- Binder D.K., Croll S.D., Gall C.M., Scharfman H.E. *BDNF and epilepsy: too much of a good thing?*, (2001) Trends Neurosci. 24(1):47-53.
- Blanquet P.R., Mariani J., Derer P. *A calcium/calmodulin kinase pathway connects brain-derived neurotrophic factor to the cyclic AMP-responsive transcription factor in the rat hippocampus*, (2003) Neuroscience 118(2):477-90.
- Bliss T.V., Collingridge G.L. *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*, (1993) Nature 361(6407):31-9.
- Blöchl A., Thoenen H. *Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons*, (1996) Mol. Cell. Neurosci. 7(3):173-90.
- Boger HA, Mannangatti P, Samuvel DJ, Saylor AJ, Bender TS, McGinty JF, Fortress AM, Zaman V, Huang P, Middaugh LD, Randall PK, Jayanthi LD, Rohrer B, Helke KL, Granholm AC, Ramamoorthy S., *Effects of brain-derived neurotrophic factor on dopaminergic function and motor behavior during aging*, (2010), Genes Brain Behav. doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00654.x. [Epub ahead of print]
- Bolaños C.A., Nestler E.J. *Neurotrophic mechanisms in drug addiction*, (2004) Neuromolecular Med. 5(1):69-83.
- Bonhoeffer T. *Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex*, (1996) Curr. Opin. Neurobiol. 6(1):119-26.

- Branchi I., *The mouse communal nest: investigating the epigenetic influences of the early social environment on brain and behavior development*, (2009) *Neurosci Biobehav Rev.* 2009 Apr;33(4):551-9. Epub 2008 Apr 4. Review.
- Brett M., Baxendale S. *Motherhood and memory: a review*, *Psychoneuroendocrinology* 26 (2001) 339–362.
- Bridges RS, Ronsheim PM. *Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behaviour*, (1990), *Endocrinology.*;126(2):837-48.
- Bridges RS, Mann PE. *Prolactin-brain interactions in the induction of maternal behavior in rat*, (1994) *Psychoneuroendocrinology.*;19(5-7):611-22.
- Bridges, R.S., Robertson, M.C., Shiu, R.P.C., Friesen, H.G., Stuer, A.M., Mann, P.E. *Endocrine communication between conceptus and mother: a role for placental lactogens in the induction of maternal behaviour*, (1996) *Neuroendocrinology* 64, 57– 64.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. *Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis*, (2003) *J Comp Neurol.* 1;467(1):1-10.
- Brunton PJ, Russell JA., *The expectant brain: adapting for motherhood*, (2008) *Nat Rev Neurosci.*;9(1):11-25
- Brusco J, Wittmann R, de Azevedo MS, Lucion AB, Franci CR, Giovenardi M, Rasia-Filho AA., *Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats*, (2008) *Neurosci Lett.*;438(3):346-50. Epub 2008 Apr 23.
- Butcher R.L., Collins W.E., Fugo N.W. *Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat*, (1974) *Endocrinology.* 1;94(6):1704-8.

- Butz M., Lehmann K., Dammasch I.E., Teuchert-Noodt G. *A theoretical network model to analyse neurogenesis and synaptogenesis in the dentate gyrus*, (2006) *Neural Netw.*;19(10):1490-505. Epub 2006 Oct 2.
- Calabrese F., Molteni R., Maj P.F., Cattaneo A., Gennarelli M., Racagni G., Riva M.A. *Chronic duloxetine treatment induces specific changes in the expression of BDNF transcripts and in the subcellular localization of the neurotrophin protein*, (2007) *Neuropsychopharmacology* 32(11):2351-9.
- Cameron H.A., McKay R.D. *Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus*, (2001) *J Comp Neurol.* 9;435(4):406-17.
- Cameron H.A., Woolley C.S., McEwen B.S., Gould E. *Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat*, (1993) *Neuroscience* 56, 337–344.
- Cameron HA, Gould E. *Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus*, (1994) *Neuroscience.*;61(2):203-9.
- Carrer H.F., Araque A., Buño W. *Estradiol regulates the slow Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons*, (2003) *J. Neurosci.* 23(15):6338-44.
- Carter AR, Chen C, Schwartz PM, Segal RA. *Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure*, (2002) *J Neurosci.*;22(4):1316-27.
- Castrén E., Zafra F., Thoenen H., Lindholm D. *Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15;89(20):9444-8.
- Cavus I., Duman R.S. *Influence of estradiol, stress, and 5-HT_{2A} agonist treatment on brain-derived neurotrophic factor expression in female rats*, (2003) *Biol. Psychiatry.* 54(1):59-69.
- Chang FL, Greenough WT, *Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice* (1984) *Brain Res.*;309(1):35-46
- Chao M.V. *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways*, (2003) *Nat. Rev. Neurosci.*4(4):299-309.

- Chen G., Kolbeck R., Barde Y.A., Bonhoeffer T., Kossel A. *Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation*, (1999) *J. Neurosci.* 19(18):7983-90.
- Chen Z.Y., Ieraci A., Teng H., Dall H., Meng C.X., Herrera D.G. Nykjaer A., Hempstead B.L. & Lee F.S. *Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway*, (2005) *Neurosci.* 25:6156-6166.
- Chicurel ME, Harris KM. *Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus*, (1992) *J Comp Neurol* 325:169 –182
- Choi J.M., Romeo R.D., Brake W.G., Bethea C.L., Rosenwaks Z., McEwen B.S. *Estradiol increases pre- and post-synaptic proteins in the CA1 region of the hippocampus in female rhesus macaques (Macaca mulatta)*, (2003) *Endocrinology.* 144(11):4734-8.
- Cirelli C, Tononi G. *Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system*, (2000) *J Neurosci.*;20(24):9187-94.
- Clayton D.F. *The genomic action potential*, (2000) *Neurobiol. Learn. Mem.* 74(3):185-216.
- Cohen RS, Chung SK, Pfaff DW. *Immunocytochemical localization of actin in dendritic spines of the cerebral cortex using colloidal gold as a probe*, (1985) *Cell Mol Neurobiol* 5:271–284.
- Cole A.J., Saffen D.W., Baraban J.M., Worley P.F. *Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation*, (1989) *Nature.* 340(6233):474-6.
- 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*, (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.*;95(22):13284-9.

- Conner J.M., Lauterborn J.C., Yan Q., Gall C.M., Varon S. *Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport*, (1997) *J. Neurosci.* 17(7):2295-313.
- Conover JC, Yancopoulos GD. *Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice*, (1997) *Rev. Neurosci.* 8(1):13-27.
- Coppola V., Barrick C.A., Southon E.A., Celeste A., Wang K., Chen B., Haddad el-B., Yin J., Nussenzweig A., Subramaniam A., Tessarollo L. *Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities*, (2004) *Development.* 131(20):5185-95.
- Corpéchet C., Young J., Calvel M., Wehrey C., Veltz J.N., Touyer G., Mouren M., Prasad V.V., Banner C., Sjövall J. *Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats*, (1993) *Endocrinology* 133(3):1003-9.
- Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH., *Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity*, (2001) *Curr Mol Pharmacol.*;3(1):12-29.
- Crozier R.A., Black I.B., Plummer M.R. *Blockade of NR2B-containing NMDA receptors prevents BDNF enhancement of glutamatergic transmission in hippocampal neurons*, (1999) *Learn. Mem.* 6(3):257-66.
- Daniel JM, Roberts SL, Dohanich GP. *Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats*, (1999) *Physiol Behav.* 66(1):11-20.
- Darnaudéry M, Perez-Martin M, Del Favero F, Gomez-Roldan C, Garcia-Segura LM, Maccari S. *Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function*, (2007) *Psychoneuroendocrinology.*;32(7):803-12. Epub 2007 Jul 19.
- Davies A.M. *Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development*, (2003) *EMBO J.* 22:2537-2545.

- Davis S., Vanhoutte P., Caboche J., Laroche S. *The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo*, (2000) *Neurosci.* 20:44563-4572.
- de Zeeuw CI, Ruigrok TJ, Holstege JC, Jansen HG, Voogd J. *Intracellular labeling of neurons in the medial accessory olive of the cat:II. Ultrastructure of dendritic spines and their GABAergic innervation*, (1990) *J Comp Neurol* 300:478-494.
- DeFreitas M.F., McQuillen P.S., Shatz C.J. *A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons*, (2001) *J. Neurosci.* 21(14):5121-9.
- Delcroix J.D., Valletta J.S., Wu C., Hunt S.J., Kowal A.S., Mobley W.C., *NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals*, (2003) *Neuron* 39(1):69-84.
- Désarnaud F., Do Thi A.N., Brown A.M., Lemke G., Suter U., Baulieu E.E., Schumacher M., *Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells*, (1998) *J. Neurochem.* 71(4):1765-8.
- Desmond NL, Weinberg RJ. *Enhanced expression of AMPA receptor protein at perforated axospinous synapses*, (1998) *Neuroreport.*;9(5):857-60
- Diamond, M.C., Lindner, B., Johnson, R., Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R., *Differences in occipital cortical synapses from environmentally enriched, impoverished, and standard colony rats*, (1975) *J. Neurosci. Res.* 1, 109-119
- Donovan M.J., Lin M.I., Wiegand P., Ringstedt T., Kraemer R., Hahn R., Wang S., Ibañez C.F., Rafii S., Hempstead B.L. *Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization*, (2000) *Development* 127(21):4531-40.

- Donovan M.J., Miranda R.C., Kraemer R., McCaffrey T.A., Tessarollo L., Mahadeo D., Sharif S., Kaplan D.R., Tsoulfas P. & Parada L. *Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury*, (1995) Am. J. Pathol. 147(2):309-324.
- Dougherty K.D., Milner T.A. *p75^{NTR} immunoreactivity in the rat dentate gyrus is mostly within presynaptic profiles but is also found in some astrocytic and postsynaptic profiles*, (1999) J. Comp Neurol. 28;407(1):77-91.
- Drake C.T., Milner T.A., Patterson S.L. *Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity*, (1999) J. Neurosci. 19(18):8009-26.
- Dubrovsky B. *Neurosteroids, Neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders*, (2006) Pharmacol Biochem Behav. 84(4):644-55.
- Duman R.S. *Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity*, (2002) Eur Psychiatry. 17 Suppl 3:306-10.
- Duman R.S. *Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders*, (2004) Neuromolecular Med. 5(1):11-25.
- Egan M.F., Kojima M., Callicott J.H., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D.R. *The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function*, (2003) Cell. 112(2):257-69.
- Engert F, Bonhoeffer T. *Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity*, (1999) Nature, 399:66-70
- Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage FH. *Neurogenesis in the adult human hippocampus*, (1998) Nat Med.;4(11):1313-7.

- Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Persson H. Lindvall O. *Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis*, (1991) *Neuron* 7:165-176.
- Ernfors P., Bramham C.R. *The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP*, (2003) *Trends Neurosci.* 26(4):171-3.
- Fernández G., Weis S., Stoffel-Wagner B., Tendolkar I., Reuber M., Beyenburg S., Klaver P., Fell J., de Greiff A., Ruhlmann J., Reul J., Elger C.E. *Menstrual cycle-dependent neural plasticity in the adult human brain is hormone, task, and region specific*, (2003) *J. Neurosci.* 23(9):3790-5.
- Fiala JC, Allwardt B, Harris KM. *Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation*, (2002) *Nat Neurosci.*;5(4):297-8.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. *Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1*, (1998) *J Neurosci.*;18(21):8900-11
- Figurov A., Pozzo-Miller L.D., Olafsson P., Wang T., Lu B. *Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus*, (1996) *Nature.* 381(6584):706-9.
- Fleming AS, Luebke C. *Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females*, (1981) *Physiol Behav.*;27(5):863-8
- Turley WA Jr, Floody OR. *Delta-9-Tetrahydrocannabinol stimulates receptive and proceptive sexual behaviors in female hamsters*, (1981) *Pharmacol Biochem Behav.*;14(5):745-7.
- Fosnaugh J.S., Bhat R.V., Yamagata K., Worley P.F. Baraban J.M. *Activation of arc, a putative "effector" immediate early gene, by cocaine in rat brain*, (1995) *J Neurochem.* 64(5):2377-80.

- Foy M.R., Xu J., Xie X., Brinton R.D., Thompson R.F., Berger T.W. *17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation*, (1999) J Neurophysiol. 81(2):925-9.
- Frade JM, Barde YA. *Nerve growth factor: two receptors, multiple functions*, (1998) Bioessays.; 20(2):137-45.
- Franklin T.B., Perrot-Sinal T.S. *Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions*, (2006) Psychoneuroendocrinology. 31(1):38-48.
- Fredriksson A, Stigsdotter IM, Hurtig A, Ewalds-Kvist B, Archer T., *Running wheel activity restores MPTP-induced functional deficits*, (2010) J Neural Transm. 2010 Sep 18. [Epub ahead of print]
- Frick K.M., Fernandez S.M., Bennett J.C., Prange-Kiel J., MacLusky N.J., Leranth C., *Behavioral training interferes with the ability of gonadal hormones to increase CA1 spine synapse density in ovariectomized female rats*, (2004) Eur J. Neurosci. 19(11):3026-32.
- Frick K.M., Fernandez S.M., Bulinski S.C. *Estrogen replacement improves spatial reference memory and increases hippocampal synaptophysin in aged female mice*, (2002) Neuroscience. 115(2):547-58.
- Frye C.A., Rhodes M.E. *Estrogen-priming can enhance progesterone's anti-seizure effects in part by increasing hippocampal levels of allopregnanolone*, (2005) Pharmacol. Biochem. Behav. 81(4):907-16.
- Galea LA, Ormerod BK, Sampath S, Kostaras X, Wilkie DM, Phelps MT. *Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats*, (2000) Horm Behav.;37(1):86-95.
- Galea L.A., Spritzer M.D., Barker J.M., Pawluski J.L. *Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult*, (2006) Hippocampus.;16(3):225-32.

- Garcia-Ovejero D., Azcoitia I., DonCarlos L.L., Melcangi R.C., Garcia-Segura L.M. *Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones*, (2005) Brain Res. 48(2):273-86.
- Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR, Milne CM. *Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies*, (1987) J Endocrinol.;113(3):435-44.
- Gatewood JD, Morgan MD, Eaton M, McNamara IM, Stevens LF, Macbeth AH, Meyer EA, Lomas LM, Kozub FJ, Lambert KG, Kinsley CH., *Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat*, (2005) Brain Res Bull.;66(2):91-8.
- Geinisman, Y., Disterhoft, J.F., Gundersen, H.J., McEchron, M.D., Persina, I.S., Power, J.M., van der Zee, E.A., West, M.J. *Remodeling of hippocampal synapses after hippocampus-dependent associative learning*, (2000) J. Comp. Neurol. 417, 49–59
- Gerfen CR. *Synaptic organization of the striatum*, (1988) J Electron Microsc Tech 10:265–281.
- Gibbs R.B. *Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement*, (1998) Brain Res. 810(1-2):294.
- Gibbs R.B. *Estrogen replacement enhances acquisition of a spatial memory task and reduces deficits associated with hippocampal muscarinic receptor inhibition*, (1999) Horm Behav. 36(3):222-33.
- Gibbs R.B. *Testosterone and estradiol produce different effects on cognitive performance in male rats*, (2005) Horm Behav. 48(3):268-77
- Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F., *Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients*, (2003) Scand J Immunol.;57(5):493-7.

- Gilbert CD, Wiesel TN. *Receptive field dynamics in adult primary visual cortex*, (1992) Nature.;356(6365):150-2.
- Givalois L, Arancibia S, Alonso G, Tapia-Arancibia L. *Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptors in the median eminence cells with sensitivity to stress*, (2004) Endocrinology.; 145(10):4737-47.
- Gomar F., Orozco R., Villar J.L., Arrizabalaga F. *P-15 small peptide bone graft substitute in the treatment of non-unions and delayed union. A pilot clinical trial* (2007) Int Orthop. 2007 Feb;31(1):93-9. Epub 2006 Jun 8.
- Gould E. *How widespread is adult neurogenesis in mammals?*, (2007) Nat Rev. Neurosci. 8 481–488
- Grahame-Smith D.G. *The Lilly Prize Lecture. 1996 keep on taking the tablets': pharmacological adaptation during long-term drug therapy*, (1997) Br J Clin Pharmacol. 44(3):227-38.
- Griffin LD, Mellon SH. *Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes*, (1999), Proc Natl Acad Sci U S A. ;96(23):13512-7.
- Gubernick, D. *Parent and infant attachment in mammals* (1981). In: Gubernick, D., Klopfer, P. (Eds.), Parental Care in Mammals. Plenum Press, New York, pp. 256–289.
- Gubernick, D., Klopfer, P. *Parental Care in Mammals*, (1981) Plenum Press, New York.
- Gubernick DJ, Alberts JR. *The biparental care system of the California mouse*, (1987) Peromyscus californicus, J Comp Psychol.;101(2):169-77
- Groves PM, Linder JC, Young SJ. *5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum*, (1994) Neuroscience 58: 593–604.
- Guerra-Araiza C., Villamar-Cruz O., González-Arenas A., Chavira R., Camacho-Arroyo I. *Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments*, (2003) J. Neuroendocrinol. 15(10):984-90.

- Guerra-Crespo M, Ubieta R, Joseph-Bravo P, Charli JL, Pérez-Martínez L. *BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture*, (2001) Eur J Neurosci. (3):483-94.
- Guzowski J.F., Lyford G.L., Stevenson G.D., Houston F.P., McGaugh J.L., Worley P.F., Barnes C.A. *Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory*, (2000) J. Neurosci. 20(11):3993-4001.
- H. van Praag, B.R. Christie, T.J. Sejnowski, F.H. Gage, *Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice*, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96 3427–13431
- Hagihara K., Hirata S., Osada T., Hirai M., Kato J. *Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study*, (1992) Brain Res Mol Brain Res. 14(3):239-49
- Hall J., Thomas K.L. & Everitt B.J. *Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning*, (2000) Nat. Neurosci. 3(6):533-535.
- Hallböök F. *Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families*, (1999) Curr Opin Neurobiol. 9(5):616-21.
- Hao J., Janssen W.G., Tang Y., Roberts J.A., McKay H., Lasley B., Allen P.B., Greengard P., Rapp P.R., Kordower J.H., Hof P.R., Morrison J.H. *Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys*, (2003) J. Comp. Neurol. 465(4):540-50.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. *Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation*, (1992) J Neurosci 12:2685–2705

- Harris KM, Stevens JK. *Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics*, (1989) J Neurosci.;9(8):2982-97.
- Harris KM., *Structure, development and plasticity of dendritic spines*, (1999) Curr Opin Neurobiol.;9(3):343-8.
- Hartmann M., Brigadski T., Erdmann K.S., Holtmann B., Sendtner M., Narz F., Lessmann V. *Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor*, (2004) J. Cell. Sci. 117(Pt 24):5803-14.
- Hartmann M., Heumann R., Lessman V. *Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses*, (2001) EMBO J. 20:5887-5897.
- Harvey CD, Svoboda K. *Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites*, (2007) Nature, 450:1195-1200
- He X.L., Garcia K.C. *Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75*, (2004) Science. 304(5672):870-5.
- Hefti F. *Neurotrophic factor therapy-keeping score*, (1997) Nat Med. 3(5):497-8.
- Hering H, Sheng M. , (2001) Nat Rev Neurosci.;2(12):880-8.
- Hollmann, M. and Heinemann, S., *Cloned glutamate receptors*, (1994) Ann. Rev. Neurosci. 17, 31-10
- Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K. *Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex*, (2006) Nature, 441:979-983
- Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K. *Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo*, (2005) Neuron, 45:279-291
- Hu Z.Y., Bourreau E., Jung-Testas I., Robel P., Baulieu E.E. *Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84(23):8215-9.

- Huang E.J., Reichardt L.F. *Trk receptors: roles in neuronal signal transduction*, (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72:609-42.
- Ibáñez C.F. *Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors*, (1998) *Trends Neurosci.* 21(10):438-44.
- Ikeda T., Koo H., Xia Y.X., Ikenoue T., Choi B.H., *Bimodal upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the neonatal rat brain following ischemic/hypoxic injury*, (2002) *Int. J. Dev. Neurosci.* 20(7):555-62.
- Ikegaya Y., Ishizaka Y., Matsuki N. *BDNF attenuates hippocampal LTD via activation of phospholipase C: implications for a vertical shift in the frequency-response curve of synaptic plasticity*, (2002) *Eur. J. Neurosci.* 16(1):145-8.
- Impey S., Obrietan K., Wong S.T., Poser S., Yano S., Wayman G., Deloulme J.C., Chan G., Storm D.R. *Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation*, (1998) *Neuron.* 21(4):869-83.
- Jessberger S, Römer B, Babu H, Kempermann G. *Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells*, (2005) *Exp Neurol.*;196(2):342-51. Epub 2005 Oct 5.
- Jessberger S., Nakashima K., Clemenson G.D. Jr, Mejia E., Mathews E., Ure K., Ogawa S., Sinton C.M., Gage F.H., Hsieh J. *Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline*, (2007) *J Neurosci.*;27(22):5967-75.
- Jezierski M.K., Sohrabji F. *Region- and peptide-specific regulation of the neurotrophins by estrogen*, (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.* 85(1-2):77-84.
- Jonas, P. and Burnashev, N., *Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels*, (1995) *Neuron* 15, 987-990.
- Jones M.W., Errington M.L., French P.J., Fine A., Bliss T.V., Garel S., Charnay P., Bozon B., Laroche S., Davis S. *A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories*, (2001) *Nat. Neurosci.* 4(3):289-96.

- Kabbadj K., el-Etr M., Baulieu E.E., Robel P. *Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes*, (1993) *Glia*. 7(2):170-5.
- Kaech S, Fischer M, Doll T, Matus A. *Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines*, (1997) *J Neurosci* 17:9565–9572.
- Kandel, E.R. *Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality* (1991) In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (Eds.), *Principles of Neural Science*. Elsevier, New York, pp. 1009– 1032.
- Kandel E.R. *The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses*, (2001) *Biosci. Rep.* 21(5):565-611.
- Kang H, Schuman EM. *A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity*, (1996) *Science.*;273(5280):1402-6.
- Kang H., Welcher A.A., Shelton D., Schuman E.M. *Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation*, (1997) *Neuron*. 19(3):653-64.
- Kang HJ, Schuman EM. *Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus*, (1995) *J Physiol Paris.*;89(1):11-22.
- Kang HJ, Schuman EM. *Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus*, (1995) *J Physiol Paris.*;89(1):11-22.
- Karavolas H.J., Hodges D.R. *Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins*, (1990) *Ciba Found Symp.* 153:22-44; discussion 44-55.
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM.. *Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients*, (2002) *Psychiatry Res.*;109(2):143-8.
- Karege F, Schwald M, Cisse M. *Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets*, (2002) *Neurosci Lett.*; 328(3):261-4.
- Katz LC, Shatz CJ. *Synaptic activity and the construction of cortical circuits*, (1996) *Science.*;274(5290):1133-8.

- Kaufmann WE, Moser HW. *Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation*, (2000) *Cereb. Cortex*, 10:981-991
- Keenan CL, Coss R, Koopowitz H. *Cytoarchitecture of primitive brains: Golgi studies in flatworms* (1981) *J Comp Neurol* 195:697–716
- Kelleher R.J. 3rd, Govindarajan A., Tonegawa S. *Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity*, (2004) *Neuron*. 44(1):59-73.
- Kermani P., Rafii D., Jin D.K., Whitlock P., Schaffer W., Chiang A., Vincent L., Friedrich M., Shido K., Hackett N.R., Crystal R.G., Rafii S., Hempstead B.L., *Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors*, (2005) *J. Clin. Invest.* 115(3):653-63.
- Kinsley CH, Bridges RS., *Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats*, (1990) *Dev Psychobiol.*;23(4):331-47.
- Kinsley CH, Trainer R, Stafisso-Sandoz G, Quadros P, Marcus LK, Hearon C, Meyer EA, Hester N, Morgan M, Kozub FJ, Lambert KG., *Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines*, (2006) *Horm Behav.*;49(2):131-42
- Kinsley C.H., Bardi M., Karelina K., Rima B., Christon L., Friedenber J., Griffin G., *Motherhood induces and maintains behavioral and neural plasticity across the lifespan in the rat*, (2008) *Arch. Sex. Behav.* 37 43–56.
- Kinsley C.H., Madonia L., Gifford G.W., Tureski K., Griffin G.R., Lowry C., Williams J., Collins J., McLearnie H., Lambert K.G. *Motherhood improves learning and memory*, (1999) *Nature*. 402(6758):137-8.
- Kirov SA, Harris KM. *Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated*, (1999) *Nat Neurosci* 2:878–883.
- Kobayashi N.R., Fan D.P., Giehl K.M., Bedard A.M., Wiegand S.J., Tetzlaff W. *BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43*

- and Talpa1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration* (1997) *J. Neurosci.* 17(24):9583-95.
- Kodama M., Akiyama K., Ujike H., Shimizu Y., Tanaka Y., Kuroda S. *A robust increase in expression of arc gene, an effector immediate early gene, in the rat brain after acute and chronic methamphetamine administration*, (1998) *Brain Res.* 796(1-2):273-83.
 - Koenig H.L., Schumacher M., Ferzaz B., Thi A.N., Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y., Baulieu E.E., *Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells*, (1995) *Science.* 268(5216):1500-3.
 - Kohara K., Kitamura A., Morishima M., Tsumoto T., *Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons*, (2001) *Science.* 291(5512):2419-23.
 - Korte M., Kang H., Bonhoeffer T., Schuman E. *A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation*, (1998) *Neuropharmacology.* 37(4-5):553-9.
 - Kramár E.A., Lin B., Lin C.Y., Arai A.C., Gall C.M., Lynch G. *A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor*, (2004) *J Neurosci.* 24(22):5151-61.
 - Kumar A., Foster T.C. *17beta-estradiol benzoate decreases the AHP amplitude in CA1 pyramidal neurons*, (2002) *J. Neurophysiol.* 88(2):621-6.
 - Kuno, M., *The Synapse: Function, Plasticity, and Neurotrophism*, (1995) Oxford University Press, New York..
 - Lacreuse A., Wilson M.E., Herndon J.G. *Estradiol, but not raloxifene, improves aspects of spatial working memory in aged ovariectomized rhesus monkeys*, (2002) *Neurobiol. Aging.* 23(4):589-600.
 - Lambert K.G., Berry A.E., Griffins G., Amory-Meyers E., Madonia-Lomas L., Love G., Kinsley C.H. *Pup exposure differentially enhances foraging ability in primiparous and nulliparous rats*, (2005) *Physiol. Behav.* 84(5):799-806.

- Lanahan A., Lyford G., Stevenson G.S., Worley P.F., Barnes C.A. *Selective alteration of long-term potentiation-induced transcriptional response in hippocampus of aged, memory-impaired rats*, (1997) *J. Neurosci.* 17(8):2876-85.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*, (2001) *Science.*; 294(5548):1945-8.
- Lee S.J., Romeo R.D., Svenningsson P., Campomanes C.R., Allen P.B., Greengard P., McEwen BS. *Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females*, (2004) *Neuroscience.* 127(4):983-8.
- Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., Petrosini, L., *Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat*, (2005) *Behav Brain Res.*;163(1):78-90.
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. *Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo*, (2000) *Nature.*;404(6780):876-81
- Leranth C., Shanabrough M., Horvath T.L. *Hormonal regulation of hippocampal spine synapse density involves subcortical mediation*, (2000) *Neuroscience.* 101(2):349-56.
- Leranth C., Shanabrough M., Redmond D.E. Jr. *Gonadal hormones are responsible for maintaining the integrity of spine synapses in the CA1 hippocampal subfield of female nonhuman primates*, (2002) *J. Comp. Neurol.* 447(1):34-42.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M., *Neurotrophin secretion: current facts and future prospects*, (2003) *Prog Neurobiol.*; 69(5):341-74.
- Leuner B, Mirescu C, Noiman L, Gould E. *Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids*, (2007) *Hippocampus.*;17(6):434-42.
- Levi-Montalcini R. *The nerve growth factor 35 years later*, (1987) *Science.* 237(4819):1154-62.

- Levine E.S., Crozier R.A., Black I.B., Plummer M.R. *Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity*, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(17):10235-9.
- Levitan, I.B., Kaczmarek, L.K. *The Neuron: Cell and Molecular Biology*, (1991). Oxford University Press, New York.
- Li C., Brake W.G., Romeo R.D., Dunlop J.C., Gordon M., Buzescu R., Magarinos A.M., Allen P.B., Greengard P., Luine V., McEwen B.S. *Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice*, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(7):2185-90.
- Li, Y.X., Zhang, Y., Lester, H.A., Schuman, E.M., Davidson, N. *Enhancement of excitatory neurotransmitter release induced by BDNF in cultured hippocampal neurons*, (1998) J. Neurosci., 18: 10231-10240.
- Liepinsh E., Ilag L.L., Otting G., Ibáñez C.F. *NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor*, (1997) EMBO J. 16(16):4999-5005.
- Lin M.I., Das I., Schwartz G.M., Tsoulfas P., Mikawa T., Hempstead B.L. *Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte proliferation during early heart development in vivo*, (2000) Dev. Biol. 226(2):180-91.
- Linden DJ. *Long-term synaptic depression in the mammalian brain*, (1994), Neuron.; 12(3):457-72.
- Lindholm D, Castrén E, Berzaghi M, Blöchl A, Thoenen H. *Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--implications for neuronal plasticity*, (1994) J Neurobiol., (11):1362-72.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmér E, Kokaia M. *Neurotrophins and brain insults*, (1994) Trends Neurosci 17:490–496

- Link W., Konietzko U., Kauselmann G., Krug M., Schwanke B., Frey U., Kuhl D. *Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity*, (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(12):5734-8.
- Linnarsson S., Willson C.A., Ernfors P. *Cell death in regenerating populations of neurons in BDNF mutant mice*, (2000) Brain Res. Mol. Brain Res. 75(1):61-9.
- Liu Y., Fowler C.D., Young L.J., Yan Q., Insel T.R., Wang Z. *Expression and estrogen regulation of brain-derived neurotrophic factor gene and protein in the forebrain of female prairie voles*, (2001) J. Comp. Neurol. 433(4):499-514.
- Lohmann C, Bonhoeffer T. *A role for local calcium signaling in rapid synaptic partner selection by dendritic filopodia*, (2008) Neuron, 59:253-260
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC. *The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma*, (2005) Neurobiol Aging.; 26(1):115-23.
- Lommatzsch M., Braun A., Mannsfeldt A., Botchkarev V.A., Botchareva N.V., Paus R., Fischer A., Lewin G.R. & Renz H. *Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions*, (1999) Am. J. Pathol. 155(4):1183-1193.
- Lonstein JS, Stern JM. *Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating rats*, (1997) J Neurosci.;17(9):3364-78.
- Lonstein JS, Stern JM.. *Somatosensory contributions to c-fos activation within the caudal periaqueductal gray of lactating rats: effects of perioral, rooting, and suckling stimuli from pups*, (1997) Horm Behav.;32(3):155-66.
- Lopes da Silva FH, Gorter JA, Wadman WJ. *Kindling of the hippocampus induces spatial memory deficits in the rat*, (1986) Neurosci Lett.;63(2):115-20.

- Loudes C, Petit F, Kordon C, Faivre-Bauman A. *Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures*, (2000) *Neuroendocrinology*.; 72(3):144-53.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, (1951) *J Biol Chem.*;193(1):265-75.
- Lu B, Figurov A. *Role of neurotrophins in synapse development and plasticity*, (1997) *Rev Neurosci.*;8(1):1-12. Review.
- Lu B. *BDNF and activity-dependent synaptic modulation*, (2003) *Learn Mem.*;10(2):86-98.
- Luine V.N. *Steroid Hormone Modulation of Hippocampal Dependent Spatial Memory*, (1997) *Stress*. 2(1):21-36.
- Luine V.N., Jacome L.F., Maclusky N.J. *Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats*, (2003) *Endocrinology*. 144(7):2836-44.
- Luine V.N., Richards S.T., Wu V.Y., Beck K.D. *Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters*, (1998) *Horm. Behav.* 34(2):149-62.
- Lyford G.L., Yamagata K., Kaufmann W.E., Barnes C.A., Sanders L.K., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Lanahan A.A., Worley P.F. *Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites*, (1995) *Neuron*. 14(2):433-45.
- Maffei L. *Plasticity in the visual system: role of neurotrophins and electrical activity*, (2002) *Arch. Ital. Biol.* 140(4):341-6.
- Magnaghi V., Cavarretta I., Galbiati M., Martini L., Melcangi R.C. *Neuroactive steroids and peripheral myelin proteins*, (2001) *Brain Res Brain Res Rev.* 37(1-3):360-71.
- Majewska AK, Newton JR, Sur M. *Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo*, (2006) *J Neurosci*, 26:3021-3029

- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*, (2000) J. Neurosci. 20 9104–9
- Malenka RC, Nicoll RA. *Long-term potentiation--a decade of progress?*, (1999) Science.; 285(5435):1870-4.
- Manji H.K., Drevets W.C., Charney D.S. *The cellular neurobiology of depression*, (2001) Nat. Med. 7(5):541-7.
- Markham JA, Fifkova E. *Actin filament organization within dendrites and dendritic spines during development*, (1986) Brain Res 392:263–269.
- Marmigère F, Rage F, Tapia-Arancibia L. *Regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts by neuronal activation in rat hypothalamic neurons*, (2001) J Neurosci Res.; 66(3):377-89.
- Marmigère F., Givalois L., Rage F., Arancibia S., Tapia-Arancibia L. *Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats*, (2003) Hippocampus. 13(5):646-55.
- Marrs GS, Green SH, Dailey ME. *Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites*, (2001) Nat Neurosci.;4(10):1006-13.
- Martin S., Jones M., Simpson E., van den Buuse M. *Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice*, (2003) Neuroreport. 14(15):1979-82.
- Mathur C., Prasad V.V., Raju V.S., Welch M., Lieberman S. *Steroids and their conjugates in the mammalian brain*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(1):85-8.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. *Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines*, (2004) Nature, 429:761-766.
- Matthies H., Frey U., Reymann K., Krug M., Jork R., Schroeder H. *Different mechanisms and multiple stages of LTP*, (1990) Adv. Exp. Med. Biol. 268:359-68.
- Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K. *High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities*, (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:7590 –7594.

- Matus A. *Actin-based plasticity in dendritic spines*, (2000) *Science*, 290:754-758
- Mazzone I.E., Saïd F.A., Aloyz R., Miller F.D., Kaplan D. *Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway*, (1999) *J. Neurosci.* 19(22):9716-27.
- McEwen B.S. *Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms*, (2001) *J. Appl. Physiol.* 91(6):2785-801.
- McEwen B.S. *Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved?*, (1994) *Horm. Behav.* 28(4):396-405.
- McMahon S.B., Priestley J.V. *Peripheral neuropathies and neurotrophic factors: animal models and clinical perspectives*, (1995) *Curr. Opin. Neurobiol.* 5(5):616-24.
- Meberg P.J., Barnes C.A., McNaughton B.L., Routtenberg A. *Protein kinase C and F1/GAP-43 gene expression in hippocampus inversely related to synaptic enhancement lasting 3 days*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(24):12050-4.
- Minichiello L., Korte M., Wolfer D., Kühn R., Unsicker K., Cestari V., Rossi-Arnaud C., Lipp H.P., Bonhoeffer T., Klein R. *Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning*, (1999) *Neuron.* 24(2):401-14.
- Modney, B.K., Hatton, G.I. *Motherhood modifies magnocellular interrelationships in functionally meaningful ways* (1990). In: Krasnegor, N.A., Bridges, R.S. (Eds.), *Mammalian Parenting: Biochemical, Neurobiological, and Behavioral Determinants*. Oxford University Press, New York, pp. 305– 323.
- Molteni R, Calabrese F, Mancini M, Racagni G, Riva MA. *Basal and stress-induced modulation of activity-regulated cytoskeletal associated protein (Arc) in the rat brain following duloxetine treatment*, (2008) *Psychopharmacology (Berl.)*;201(2):285-92.
- Mong JA, Roberts RC, Kelly JJ, McCarthy MM. *Gonadal steroids reduce the density of axospinous synapses in the developing rat arcuate nucleus: an electron microscopy analysis*, (2001) *J Comp Neurol.*;432(2):259-67

- Monnet FP, Maurice T. *The signal protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects*, (2006) J Pharmacol Sci.; 100(2):93-118.
- Monteleone P, Fabrazzo M, Martiadis V, Serritella C, Pannuto M, Maj M. *Circulating brain-derived neurotrophic factor is decreased in women with anorexia and bulimia nervosa but not in women with binge-eating disorder: relationships to co-morbid depression, psychopathology and hormonal variables*, (2005) Psychol Med.; 35(6):897-905.
- Morris R.G. *Long-term potentiation and memory*, (2003) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 358(1432):643-7.
- Murakami S., Imbe H., Morikawa Y., Kubo C., Senba E. *Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly*, (2005) Neurosci. Res. 53(2):129-39.
- Murer M.G., Yan Q., Raisman-Vozari R. *Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*, (2001) Prog. Neurobiol. 63(1):71-124.
- Murphy D.D., Cole N.B., Segal M. *Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons*, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(19):11412-7.
- Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B. *Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor*, (2000) FEBS Lett. ;470(2):113-7.
- Nakazato M, Hashimoto K, Shimizu E, Kumakiri C, Koizumi H, Okamura N, Mitsumori M, Komatsu N, Iyo M. *Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in female patients with eating disorders*, (2003) Biol Psychiatry.; 54(4):485-90.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. *Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP*, (1994) Science.; 265(5175):1104-7.

- Nguyen PV, Kandel ER. *A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices.* (1996) *J Neurosci.*;16(10):3189-98.
- Nilsson M., Perfilieva E., Johansson U., Orwar O., Eriksson P.S. *Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory,* (1999) *J Neurobiol.*;39(4):569-78.
- Nimnual A.S., Yatsula B.A., Bar-Sagi D. *Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos* (1998) *Science.* 279(5350):560-3.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ., *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system,* (2006) *Nat Rev Neurosci.*;7(9):697-709. Review.
- Numan M., Insel T.R., *The Neurobiology of Parental Behavior,* Springer-Verlag, New York, 2003.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. *Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus,* (1998) *Neuron.*;21(3):545-59
- Nykjaer A., Lee R., Teng K.K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M.S., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T.E., Hempstead B.L., Petersen C.M. *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death,* (2004) *Nature.* 427(6977):843-8.
- Okabe S, Miwa A, Okado H. *Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules,* (2001) *J Neurosci.*;21(16):6105-14
- Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. *Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways,* (2006) *Hippocampus*;16(3):250-60.
- Oppenheim R.W. *Cell death during development of the nervous system,* (1991), *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501.

- Ormerod B.K., Lee T.T., Galea L.A. *Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons*, (2004) *Neuroscience*. 128(3):645-54.
- Ormerod BK, Galea LA. *Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol*, (2001) *Neuroscience*.;102(2):369-79.
- Ormerod BK, Lee TT, Galea LA. *Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats*, (2003) *J Neurobiol*.;55(2):247-60.
- Otani S, Abraham WC. *Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus, but not the entorhinal cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats*, (1989) *Neurosci Lett*.;106(1-2):175-80.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. *Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier*, (1998) *Neuropharmacology*.;37(12):1553-61.
- Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. *Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra*, (1999) *Neuroreport*. 10(3):557-61.
- Parnass Z, Tashiro A, Yuste R. *Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons*, (2000) *Hippocampus*.;10(5):561-8.
- Parsons C.G., Stöffler A., Danysz W. *Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse*, (2007) *Neuropharmacology*.;53(6):699-723.
- Patterson S.L., Abel T., Deuel T.A., Martin K.C., Rose J.C., Kandel E.R. *Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice*, (1996) *Neuron*. 16(6):1137-45.
- Paul SM, Purdy RH. *Neuroactive steroids*, (1992) *FASEB J*.; 6(6):2311-22.

- Pawluski J.L. Galea L.A., *Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother*, (2005) *J. Neurobiol.* 66 71–81.
- Pawluski JL, Vanderbyl BL, Ragan K, Galea LA., *First reproductive experience persistently affects spatial reference and working memory in the mother and these effects are not due to pregnancy or 'mothering' alone*, (2006) *Behav Brain Res.*;175(1):157-65. Epub 2006 Sep 29.
- Pawluski JL, Galea LA. *Reproductive experience alters hippocampal neurogenesis during the postpartum period in the dam*, (2007) *Neuroscience.*;149(1):53-67. Epub 2007 Jul 25.
- 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*, (2009) *Front Neuroendocrinol.*;30(3):343-57. Epub 2009 Apr 8. Review.
- Pei Q, Zetterström TS, Sprakes M, Tordera R, Sharp T. *Antidepressant drug treatment induces Arc gene expression in the rat brain*, (2003) *Neuroscience.*;121(4):975-82.
- Pei Q., Lewis L., Sprakes M.E., Jones E.J., Grahame-Smith D.G., Zetterström T.S. *Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neuronal dendrites*, (2000) *Neuropharmacology.* 39(3):463-70.
- Poo MM. *Neurotrophins as synaptic modulators*, (2001) *Nat Rev Neurosci.* Jan;2(1):24-32.
- Pozzo-Miller L.D., Inoue T., Murphy D.D. *Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices*, (1999) *J. Neurophysiol.* 81(3):1404-11.
- Prakash N., Cohen-Cory S., Frostig R.D. *RAPID and opposite effects of BDNF and NGF on the functional organization of the adult cortex in vivo*, (1996) *Nature.* 381(6584):702-6.
- Qian Z., Gilbert M.E., Colicos M.A., Kandel E.R., Kuhl D. *Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation*, (1993) *Nature.* 361(6411):453-7.

- Rage F, Riteau B, Alonso G, Tapia-Arancibia L. *Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons*, (1999) *Endocrinology*.; 140(2):909-16.
- Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, Achaval M., *Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method*, (2004) *Neuroscience*.;126(4):839-47.
- Raymond CR, Thompson VL, Tate WP, Abraham WC. *Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation*, (2000) *J Neurosci*.;20(3):969-76.
- Reichardt LF. *Neurotrophin-regulated signalling pathways*, (2006) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.;361(1473):1545-64.
- Reuter M, Gustafsson MK. *The flatworm nervous system: pattern and phylogeny*, (1995) *Experientia* 72:25–59
- Rissman E.F., Heck A.L., Leonard J.E., Shupnik M.A., Gustafsson J.A. *Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice*, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(6):3996-4001.
- Robichaud M, Debonnel G. *Modulation of the firing activity of female dorsal raphe nucleus serotonergic neurons by neuroactive steroids*, (2004), *J Endocrinol*.;182(1):11-21.
- Rodríguez JJ, Davies HA, Silva AT, De Souza IE, Peddie CJ, Colyer FM, Lancashire CL, Fine A, Errington ML, Bliss TV, Stewart MG. *Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia*, 2005 *Eur J Neurosci*.;21(9):2384-96.
- Rodriguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA. *Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor*, (1990) *Neuron*.; 4(4):487-92.

- Roof RL, Duvdevani R, Braswell L, Stein DG. *Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats*, (1994) *Exp Neurol.*; 129(1):64-9.
- Rose C.R., Blum R., Pichler B., Lepier A., Kafitz K.W., Konnerth A. *Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells*, (2003) *Nature.* 426(6962):74-8.
- Rudick C.N., Woolley C.S. *Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in the adult female rat*, (2001) *J. Neurosci.* 21(17):6532-43.
- Rupprecht R., *Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties*, (2003) *Psychoneuroendocrinology.*; 28(2):139-68.
- Russell F.D., Koishi K., Jiang Y., McLennan IS. *Anterograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors in rat hypoglossal nerve*, (2000) *Neuroscience.* 97(3):575-80
- Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K. *Ca(2+) signaling in dendritic spines*, (2001) *Curr Opin Neurobiol.*;11(3):349-56.
- Sandstrom N.J., Williams C.L. *Spatial memory retention is enhanced by acute and continuous estradiol replacement*, (2004) *Horm. Behav.* 45(2):128-35.
- Sarnat HB, Netsky MG. *The brain of the planarian as the ancestor of the human brain*, (1985) *Can J Neurol Sci* 12:296 –302.
- Sawai T., Bernier F., Fukushima T., Hashimoto T., Ogura H., Nishizawa Y. *Estrogen induces a rapid increase of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus*, (2002) *Brain Res.* 950(1-2):308-11.
- Scanlan V.F., Byrnes E.M., Bridges R.S. *Reproductive experience and activation of maternal memory*, *Behav. Neurosci.* 120 (2006) 676–686.
- Scharfman H., Goodman J., Macleod A., Phani S., Antonelli C., Croll S. *Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats*, (2005) *Exp. Neurol.* 192(2):348-56.

- Scharfman HE, MacLusky NJ. *Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS.*, (2006) *Front Neuroendocrinol.*; 27(4):415-35. Epub. Review.
- Scharfman HE, Mercurio TC, Goodman JH, Wilson MA, MacLusky NJ. *Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor*, (2003), *J Neurosci.*; 23(37):11641-52.
- Schikorski T, Stevens CF. *Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses*, (1997) *J Neurosci.*;17(15):5858-67.
- Schinder AF, Poo M., *The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity*, (2000) *Trends Neurosci.*;23(12):639-45.
- Schmidt-Hieber C., Jonas P., Bischofberger J. *Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus*, (2004) *Nature.*;429(6988):184-7. Epub 2004 Apr 25.
- Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME., *Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion*, (1994) *Nature*. Jan 13;367(6459):170-3.
- Seeburg, P. H. *The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels*, (1993) *Trends Neurosci.* 16, 359-365.
- Segal M., Murphy D. *Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates*, (2001) *Horm. Behav.* 40(2):156-9.
- Segev I, Rall W. *Computational study of an excitable dendritic spine*, (1988) *J Neurophysiol* 60:499 –523.
- Segev I, Rall W. *Excitable dendrites and spines: earlier theoretical insights elucidate recent direct observations*, (1998) *Trends Neurosci* 21:453–460.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S., *Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin*, (2003) *Science.*;299(5603):117-20.

- Shors TJ, Chua C, Falduto J. *Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus*, (2001) *J Neurosci.*;21(16):6292-7
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. *Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning*, (2002) *Hippocampus.*;12(5):578-84.
- Singh M., Meyer E.M., Simpkins J.W. *The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats*, (1995) *Endocrinology.* 136(5):2320-4.
- Smith C.C., McMahon L.L. *Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased*, (2005) *J. Neurosci.* 25(34):7780-91.
- Snider W.D. *Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us*, (1994) *Cell.* 77(5):627-38.
- Snyder J.S., Kee N., Wojtowicz J.M. *Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus*, (2001) *J Neurophysiol.*;85(6):2423-31.
- Sohrabji F., Miranda R.C., Toran-Allerand C.D. *Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor*, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(24):11110-4.
- Solum D.T., Handa R.J. *Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus*, (2002) *J. Neurosci.* 22(7):2650-9.
- Solum D.T., Handa R.J. *Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus*, (2002) *J. Neurosci.* 22(7):2650-9.
- Sorra KE, Harris KM. *Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines*, (2000) *Hippocampus.* 2000;10(5):501-11

- Sorra KE, Harris KM. *Stability in synapse number and size at 2 hr after long-term potentiation in hippocampal area CA1*, (1998) J Neurosci. Jan 15;18(2):658-71.
- Spacek J, Harris KM. *Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat*, (1997) J Neurosci 17:190 –203.
- Spacek J, Hartmann M. *Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices*, (1983) Anat Embryol (Berl) 167:289 –310.
- Stein DG., *Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen?*, (2001) Trends Neurosci.; 24(7):386-91.
- Stern JM, Levine S. *Psychobiological aspects of lactation in rats*, (1974) Prog Brain Res.;41:433-44.
- Stern JM., *Offspring-induced nurturance: animal-human parallels*, (1997) Dev Psychobiol.;31(1):19-37.
- Steward O, Falk PM, Torre ER. *Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes*, (1996) J Neurocytol.;25(12):717-34
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. *Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites*, (1998) Neuron.;21(4):741-51
- Steward O., Worley P.F. *Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation*, (2001) Neuron. 30(1):227-40.
- Strasser A, Skalicky M, Hansalik M, Viidik A., *The impact of environment in comparison with moderate physical exercise and dietary restriction on BDNF in the cerebral parietotemporal cortex of aged Sprague-Dawley rats*, (2006) Gerontology.;52(6):377-81. Epub 2006 Aug 17.

- Sun J.H., Yan X.Q., Xiao H., Zhou J.W., Chen Y.Z., Wang C.A. *Restoration of decreased N-methyl-d-aspartate receptor activity by brain-derived neurotrophic factor in the cultured hippocampal neurons: involvement of cAMP*, (2001) Arch. Biochem. Biophys. 394(2):209-15.
- Svoboda K, Mainen ZF. *Synaptic [Ca²⁺]: intracellular stores spill their guts*, (1999) Neuron.;22(3):427-30
- Svoboda K, Tank DW, Denk W. *Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts*, (1996) Science 272:716 –719.
- Tan A., Moratalla R., Lyford G.L., Worley P., Graybiel A.M. *The activity-regulated cytoskeletal-associated protein arc is expressed in different striosome-matrix patterns following exposure to amphetamine and cocaine*, (2000) J. Neurochem. 74(5):2074-8.
- Tanapat P., Hastings N.B., Gould E. *Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner*, (2005) J Comp Neurol.;481(3):252-65.
- Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J., Gould E. *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat*, (1999) J. Neurosci. 19(14):5792-801.
- Thoenen H. *Neurotrophins and neuronal plasticity*, (1995) Science. 270(5236):593-8.
- Thoenen H., *Neurotrophins and activity-dependent plasticity*, (2000) Prog Brain Res. 2000;128:183-91
- Tomizawa K., Iga N., Lu Y.F., Moriwaki A., Matsushita M., Li S.T., Miyamoto O., Itano T., Matsui H. *Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade*, (2003) Nat. Neurosci. 6(4):384-90.
- Tongiorgi E, Armellin M, Giulianini PG, Bregola G, Zucchini S, Paradiso B, Steward O, Cattaneo A, Simonato M., *Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis*, (2004) J Neurosci. Jul 28;24(30):6842-52.

- Tonkowicz, P.A., Voogt, J.L. *Termination of prolactin surges with development of placental lactogens secretion in the pregnant rat*, (1983). *Endocrinology* 113, 1314– 1318.
- Toran-Allerand C.D., Singh M., Sétáló G. Jr. *Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story*, (1999) *Front. Neuroendocrinol.* 20(2):97-121.
- Toyooka K., Asama K., Watanabe Y., Muratake T., Takahashi M., Someya T., Nawa H. *Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients*, 2002) *Psychiatry Res.* 110(3):249-57.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. *Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex*, (2002) *Nature.*;420(6917):788-94.
- Trommald M, Hulleberg G. *Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs*, (1997) *J Comp Neurol* 377:15–28.
- Tuszynski M.H., Blesch A. *Nerve growth factor: from animal models of cholinergic neuronal degeneration to gene therapy in Alzheimer's disease*, (2004) *Prog. Brain. Res.* 146:441-9.
- Tyler W.J., Alonso M., Bramham C.R., Pozzo-Miller L.D. *From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning*, (2002) *Learn. Mem.* 9(5):224-37..
- Tyler W.J., Pozzo-Miller L. *Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones*, (2003) *J. Physiol.* 553(Pt 2):497-509.
- Van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, van Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, Ibáñez CF, Geraerts WP, Bulloch AG. *Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family*, (1998) *EMBO J.*;17(9):2534-42.
- Vicario-Abejón C., Owens D., McKay R. *Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization*, (2002) *Nat. Rev. Neurosci.* 3(12):965-74.

- Voogt, J., Robertson, M., Friesen, H. *Inverse relationship of prolactin and rat placental lactogen during pregnancy*, (1982) Biol. Reprod. 26, 800–805.
- Wallace, W., Bear, M.F. *A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex*, (2004) J. Neurosci. 24, 6928–6938
- Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT. *LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats*, (1995) Brain Res. 12;703(1-2):26-30.
- Wartella J, Amory E, Lomas LM, Macbeth A, McNamara I, Stevens L, Lambert KG, Kinsley CH. *Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat*, (2003), Physiol Behav.;79(3):373-81.
- Wiesner, B.P., Sheard, N.M., *Maternal Behavior in the Rat*, (1933) Oliver and Boyd, London.
- Williams J., Dragunow M., Lawlor P., Mason S., Abraham W.C., Leah J., Bravo R., Dammer J., Tate W. *Krox20 may play a key role in the stabilization of long-term potentiation*, (1995) Exp. Neurol. 152:1-15.
- Winkler T., Sharma H.S., Stålberg E., Badgaiyan R.D. *Neurotrophic factors attenuate alterations in spinal cord evoked potentials and edema formation following trauma to the rat spinal cord*, (2000) Acta. Neurochir. Suppl. 76:291-6.
- Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. *Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function*, (2006) Hippocampus.;16(3):296-304.
- Wisden W., Errington M.L., Williams S., Dunnett S.B., Waters C., Hitchcock D., Evan G., Bliss T.V., Hunt S.P. *Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord*, (1990) Neuron. 4(4):603-14.
- Wong E.Y., Herbert J. *Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus*, (2005) Eur. J. Neurosci. 22(4):785-92.

- Woolley C.S. *Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus*, (1998), *Horm. Behav.* 34(2):140-8.
- Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS. *Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons*, (1990) *J Neurosci.*;10(12):4035-9.
- Woolley CS, McEwen BS. *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat*, (1992) *J Neurosci.*;12(7):2549-54.
- Woolley CS, McEwen BS. *Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism*, (1994) *J Neurosci.*;14(12):7680-7.
- Woolley CS, McEwen BS. *Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat*, (1993) *J Comp Neurol.*; 336(2):293-306.
- Wu K, Aoki C, Elste A, Rogalski-Wilk AA, Siekevitz P. *The synthesis of ATP by glycolytic enzymes in the postsynaptic density and the effect of endogenously generated nitric oxide*, (1997) [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(5):2714]. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13273–13278
- Xerri, C., Stern, J.M., Merzenich, M.M. *Alterations of the cortical representation of the rat ventrum by nursing behaviour*, (1994) *J. Neurosci.* 14, 1710– 1721.
- Yamada K., Nabeshima T. *Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes*, (2003) *J. Pharmacol. Sci.* 91(4):267-70.
- Yamamoto M., Sobue G., Yamamoto K., Terao S., Mitsuma T. *Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues*, (1996) *Neurochem Res.* 21(8):929-38.
- Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S. *Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor*, (2005) *Anat Sci Int.*; 80(1):37-41.

- Yamashita T., Tucker K.L., Barde Y.A. *Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth*, (1999) *Neuron*. 24(3):585-93.
- Yankova M, Hart SA, Woolley CS. *Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study*, (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A*.;98(6):3525-30. Epub 2001 Feb 20.
- Yasuhara T, Hara K, Maki M, Matsukawa N, Fujino H, Date I, Borlongan CV., *Lack of exercise, via hindlimb suspension, impedes endogenous neurogenesis*, (2007) *Neuroscience*.;149(1):182-91. Epub 2007 Aug 9.
- Ye H., Kuruville R., Zweifel L.S., Ginty D.D. *Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons*, (2003) *Neuron*. 39(1):57-68.
- Yeo G.S., Connie Hung C.C., Rochford J., Keogh J., Gray J., Sivaramakrishnan S., O'Rahilly S., Farooqi I.S. *A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay*, (2004) *Nat. Neurosci*. 7(11):1187-9.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR. *Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis*, (2002) *J Neurosci*.;22(5):1532-40.
- Yoon S.O., Casaccia-Bonofil P., Carter B., Chao M.V. *Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival*, (1998) *J. Neurosci*. 18(9):3273-81.
- Yuan X.B., Jin M., Xu X., Song Y.Q., Wu C.P., Poo M.M., Duan S. *Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance*, (2003) *Nat. Cell. Biol*. 5(1):38-45.
- Zamani M.R., Levy W.B., Desmond N.L. *Estradiol increases delayed, N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitation in the hippocampal CA1 region*, (2004) *Neuroscience*. 129(1):243-54.

Bibliografia

- Zhou J., Zhang H., Cohen R.S., Pandey S.C. *Effects of estrogen treatment on expression of brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures*, (2005) *Neuroendocrinology*. 81(5):294-310.
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. *Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex*, (2005) *Neuron*, 46:181-189