



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Neuroscienze

Ciclo XXIII

TITOLO TESI

*Interazione Etanolo-Stress nel modello dell'isolamento sociale nei topi C57 BL/6 J.
Valutazione elettrofisiologica degli effetti dell'assunzione volontaria di etanolo sulla
funzione delle sinapsi inibitorie GABAergiche dell'ippocampo di topi isolati.*

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

Area 05 - Scienze Biologiche – SSD BIO/14 Farmacologia

Presentata da: **Dott. Nicola Obili**

Coordinatore Dottorato **Prof.ssa Alessandra Concas**

Tutor **Prof. Enrico Sanna**

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

Indice

1) Introduzione.	3
(a) <i>Alcool Storia Antica.</i>	(3)
(b) <i>Alcool Storia Moderna.</i>	(4)
(c) <i>Alcool Storia Contemporanea.</i>	(4)
(d) <i>Alcool e Costume.</i>	(5)
(e) <i>Alcool Storia Contemporanea - L'impatto dell'alcool in Europa.</i>	(6)
(f) <i>Alcool Storia Contemporanea - L'impatto dell'alcool in USA.</i>	(8)
(g) <i>Risposta dell'organismo allo stress.</i>	(10)
(h) <i>Isolamento sociale.</i>	(13)
(i) <i>Etanolo e sistemi di neurotrasmissione.</i>	(15)
(j) <i>Interazioni tra recettore per il Glutammato ed EtOH.</i>	(15)
(k) <i>Interazioni tra recettore per il GABA ed EtOH.</i>	(18)
(l) <i>Recettori GABAA.</i>	(19)
(m) <i>Farmacologia dei Recettori GABAA.</i>	(23)
(n) <i>Diversi tipi d'inibizione mediata da recettori GABAA.</i>	(24)
(o) <i>I neurosteroidi: modulatori endogeni del recettore GABAA.</i>	(28)
(p) <i>Steroidi neuroattivi e effetto sull'EtOH</i>	(29)
(q) <i>Anatomia dell' Ippocampo.</i>	(31)
(r) <i>Obiettivi.</i>	(36)
2) Materiali e Metodi.	38
(a) <i>Animali.</i>	(38)
(b) <i>Isolamento Sociale.</i>	(38)
(c) <i>Valutazione attività motoria.</i>	(40)
(d) <i>Preparazione delle fettine coronali di ippocampo.</i>	(41)

- (e) *Registrazione elettrofisiologica mediante la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell.* (42)
- (f) *Analisi dell'attività spontanea. Le correnti postsinaptiche inibitorie spontanee (sIPSCs).* (42)
- (g) *Analisi delle correnti Toniche.* (43)
- (h) *Registrazioni elettrofisiologiche extracellulari: tecnica del field potential.* (43)

3) Risultati 45

- (a) *Effetto dell'isolamento sociale sull'attività locomotoria spontanea.* (45)
- (b) *L'effetto dell'isolamento sociale sul consumo volontario di EtOH.* (45)
- (c) *L'effetto dell'isolamento sociale sull'eccitabilità neuronale e induzione dell'LTP nella regione CA1 dell'ippocampo.* (46)
- (d) *Effetto dell' EtOH sull'induzione dell'LTP in topi SI e GH.* (47)
- (e) *Effetto in acuto dell'EtOH sulle correnti fasiche e toniche nell'ippocampo di topi isolati e di controllo.* (48)
- (f) *Effetto dell'inalazione di vapori di EtOH sulla corrente tonica GABAergica in topi C57BL/6J isolati e di controllo.* (49)
- (g) *L'effetto del consumo volontario di EtOH nei topi SI e GH sulla corrente tonica e fasica nelle cellule granulari del giro dentato.* (50)

4) Discussione. 52

5) Figure. 57

6) Bibliografia. 77

Introduzione

Alcool Storia Antica.

Con il termine alcool si definisce comunemente l'alcool etilico, o etanolo (EtOH), che si presenta come una sostanza liquida, incolore e che si forma per fermentazione di alcuni zuccheri semplici o per distillazione del mosto fermentato. L'EtOH, costituisce la principale componente psicoattiva delle bevande alcoliche: esso è infatti in grado di agire sul sistema nervoso centrale e di alterare di conseguenza gli stati di coscienza. Non a caso infatti, quando si parla di gradazione di una bevanda, si fa riferimento alla percentuale di EtOH in essa contenuta. A seconda dei vari periodi storici esso è stato infatti considerato: cibo, fonte di vita, rimedio medico, oggetto di riti di iniziazione, simbolo di trasgressione e infine bevanda intossicante. La varietà di questi significati dipende probabilmente dai suoi effetti: l'alcool riesce contemporaneamente a far sentire forti e ad indebolire le persone. Per quanto riguarda la sua diffusione nella storia bisogna ricordare che inizialmente le bevande alcoliche venivano utilizzate solo dalle classi più abbienti per poi diffondersi a tutti i ceti sociali ed infine essere concessa anche alle donne. L'alcool è conosciuto da tempi antichissimi ed è da sempre considerato una sostanza prelibata, stupefacente e nutritiva: è probabile che già i coltivatori e i cacciatori della preistoria conoscessero gli effetti stupefacenti dei frutti fermentati. Sicuramente gli antichi egizi conoscevano già la birra ed il vino. Gli antichi Greci adoravano Dionisio, il Dio del vino e dell'ebbrezza. Gli antichi romani preferivano la degustazione continua, ma moderata. Il cristianesimo fece del vino un sacramento, simbolizzando il sangue del redentore ed è parte integrante della comunione.

L'etimologia della parola è a tutt'oggi dibattuta, alcuni la riferiscono al termine arabo "*al-kukhul*", che tradotto letteralmente significa "lo spirito", altri come "*spirito*" in riferimento ai primi processi di distillazione compiuti in Medio Oriente nel II millennio AC, e lo stesso termine gaelico "*wisk(e)y*" avrebbe il significato di "acqua della vite".

Nel Medioevo il bere fino al tracollo era un'usanza normale in tutto il territorio tedesco. La birra veniva prodotta principalmente all'interno di monasteri. Prima che la patata si affermasse come alimento di base, nel Diciottesimo secolo, la birra era un elemento importante nell'alimentazione quotidiana. Nello stesso periodo ha avuto inizio la diffusione dei distillati in concomitanza col diffondersi di gravi malattie quali la peste. I medici prescrivevano infatti l'utilizzo di bevande ad altra gradazione alcolica, per quanto risultassero un rimedio inefficace, in quanto la loro assunzione favoriva almeno una generica sensazione di calore e di benessere. La crescente produzione su scala industriale e la commercializzazione condusse, a partire dal Sedicesimo secolo, alla diffusione di liquori e grappe come potenti mezzi di evasione sociale.

Alcool Storia Moderna.

La Rivoluzione industriale si compì alle spese di una manovalanza estremamente sfruttata, che si anestetizzava e si nutriva a basso costo con distillati ad altissima gradazione. Da allora l'alcoolismo è considerato il flagello dei popoli. Già nel XVI secolo era infatti noto il detto "Bacco uccide più gente che non le guerre" (Sebastian Frank). La dipendenza dall'alcool, il malessere e la miseria da esso originati fecero nascere un contro-movimento puritano degli astemi.

Alcool Storia Contemporanea.

Negli Stati Uniti d'America venne introdotto il proibizionismo e si tentò invano di prendere il controllo della situazione: il proibizionismo durò dal 1919 al 1933 e riuscì solo a produrre un incremento della criminalità organizzata. La maggior parte delle nazioni ha preferito il controllo sulla produzione e sulla vendita dell'alcool piuttosto che la sua proibizione, anche a causa degli altissimi proventi dalla tassazione sugli alcoolici.

Alcool Storia Contemporanea - L'alcool e l'economia in Europa.

L'Europa di oggi gioca un ruolo fondamentale nel mercato globale dell'alcool, agendo come la fonte di un quarto della produzione mondiale di alcool e di oltre la metà della produzione di vino. Il commercio è ancora più incentrato in Europa, con il 70% delle

esportazioni di alcool e poco meno della metà delle importazioni mondiali che coinvolgono l'Unione Europea (UE). Sebbene la maggior parte di questo commercio si svolga tra i paesi dell'UE, il commercio di alcool contribuisce per circa 9 miliardi di euro al bilancio delle merci dell'intera UE.

Il ruolo economico dei produttori di bevande alcoliche è considerevole in molti paesi europei. Nell'UE a 15 paesi le tasse sull'alcool ammontavano a 25 miliardi di euro nel 2001, escluse le tasse sulle vendite e altre tasse pagate all'interno della catena dell'offerta – sebbene 1.5 miliardi di euro vengono ritornati alla catena dell'offerta attraverso le Politiche Agricole Comunitarie.

Alcool e Costume.

Prima dello sviluppo di farmaci moderni, l'alcool utilizzato come una droga verità (come suggerito dal motto "In vino veritas"), suggerito come medicina per la depressione e come anestetico. Trova applicazione anche come disinfettante antibatterico per la pulizia delle mani (a una concentrazione volume / peso di circa il 62%), e come antisettico; l'EtOH denatura le proteine e dissolve i lipidi, pertanto risulta efficace contro la maggior parte dei batteri e funghi e molti virus, ma è inefficace contro le spore batteriche.

È prevista persino una sua applicazione come antidoto per l'avvelenamento da parte di altri alcoli più tossici, in particolare, il metanolo e il glicole etilenico; tale effetto dell'EtOH si basa sulla competizione con gli altri alcoli per uno stesso enzima, quale *l'alcool deidrogenasi*, impedendone quindi il metabolismo.

Nei tempi moderni, l'EtOH è destinato anche a uso industriale e può essere prodotto anche da sottoprodotti della raffinazione del petrolio; il suo uso si è diffuso come base per altri composti organici che includono tra gli altri esteri etilici, etere etilico, acido acetico, ammine etiliche e, in misura minore, butadiene. Può essere presente anche in preparati quali profumi, vernici, tinture e alcuni tipi di deodoranti. Il ruolo economico dei produttori di bevande alcoliche è considerevole in molti paesi europei. Nell'UE a 15 Paesi (Austria, Belgio, Danimarca, Francia, Finlandia, Germania, Grecia, Irlanda, Italia, Lussemburgo, Olanda, Portogallo, Spagna, Svezia, e Regno Unito) le tasse sull'alcool ammontavano a 25 miliardi di euro nel 2001, escluse le tasse sulle vendite e altre tasse pagate all'interno della catena dell'offerta – sebbene 1.5 miliardi di euro vengono restituiti alla catena dell'offerta attraverso le Politiche Agricole

Comunitarie. L'alcool è anche associato al numero di posti di lavoro con circa 750.000 posti nella produzione (principalmente vino). Altri posti di lavoro sono legati alla catena dell'offerta, ad esempio in locali o negozi. Sulla base degli studi esistenti, il totale dei costi tangibili nell'UE nel 2003 era stimato in 125 miliardi di euro (da 79 a 220 miliardi di euro) che equivale all'1.3% del PIL e che si avvicina molto al valore recentemente attribuito al tabacco. I costi non tangibili mostrano il valore che le persone danno al dolore, alla sofferenza e alla perdita della vita a causa dei danni sociali, sanitari e quelli legati ad atti criminosi dovuti all'alcool. Nel 2003 questi costi sono stati stimati in 270 miliardi di euro, e gli stessi danni sono stati anche valutati in modi diversi con stime che vanno da 150 a 760 miliardi di euro. Oltre che essere una sostanza che provoca dipendenza, l'alcool è la causa di 60 diversi tipi di malattie e condizioni, quali incidenti, disordini mentali e comportamentali, problemi gastrointestinali, tumori, malattie cardiovascolari, problemi immunologici, malattie polmonari, malattie dello scheletro e muscolari, problemi dell'apparato riproduttivo e danni prenatali, che comprendono un aumento del rischio di nascite premature e sottopeso. Per alcune condizioni, come per la cardiomiopatia, per la sindrome da stress respiratorio, il danno sembra essere conseguente a livelli persistenti di elevati consumi alcoolici sebbene a elevati consumi, l'alcool incrementa il rischio e la severità di queste condizioni in modo dose-dipendente. La frequenza e il volume di episodi di intossicazione (*heavy drinking*) sono di particolare importanza per l'aumento del rischio di incidenti e di alcune malattie cardiovascolari (malattie coronariche e infarti).

Alcool Storia Contemporanea - L'impatto dell'alcool in Europa

L'alcool pone un onere significativo su molti aspetti della vita degli individui in Europa, che possono essere genericamente descritti come "danni sanitari" e "danni sociali". Sette milioni di adulti dichiarano di essere stati coinvolti *in risse dopo aver bevuto* nell'arco dell'ultimo anno e (sulla base di alcuni studi che analizzano i costi a livello nazionale) i costi economici degli atti criminali attribuibili all'alcool sono stati stimati in 33 miliardi di euro nell'UE nel 2003. Il costo è diviso tra polizia, tribunali e carceri (15 miliardi), spese per la prevenzione del crimine e costi assicurativi (12 miliardi) e danni alla proprietà (6 miliardi). I danni alla proprietà causati dalla guida in stato di ebbrezza sono stati stimati in 10 miliardi di euro, mentre i costi intangibili degli effetti fisici e psicologici dei crimini vengono valutati da 9 a 37 miliardi di euro (52 miliardi per i costi dei crimini alcool-attribuibili). L'alcool ha anche un impatto sulla famiglia, con il 16% degli abusi e dell'incuria nei confronti dei minori attribuiti al consumo di alcool, e tra i 4.7 milioni e i 9.1 milioni di bambini vivono in famiglie con problemi alcoolcorrelati. Si stima che ogni

anno 23 milioni di persone siano alcooldipendenti, in un anno qualsiasi e le sofferenze causate ai membri delle famiglie rappresentano un costo intangibile di 68 miliardi di euro. Le stime del livello dei danni nei luoghi di lavoro sono più difficili, anche se quasi il 5% dei bevitori maschi e il 2% delle donne nell'UE a 15 paesi riferiscono un impatto negativo dell'alcool sul lavoro o nello studio. Sulla base di alcuni studi sui costi a livello nazionale, la perdita di produttività dovuta ad assenteismo alcool attribuibile e la disoccupazione sono stati stimati rispettivamente da 9 a 19 miliardi e da 6 a 23 miliardi di euro. Dal punto di vista della salute, l'alcool è responsabile di circa 195.000 morti ogni anno nell'UE, sebbene si possa attribuire all'alcool anche il ritardo di 160.000 morti riferite ad anziani per il suo effetto protettivo sulle malattie cardiovascolari per le donne che muoiono dopo i 70 anni (anche se a causa di problemi metodologici è probabile che si tratti di un dato sovrastimato). Una stima più accurata sembra essere quella che identifica in 115.000 le morti causate nelle persone sino ai 70 anni di età, stima che evita la verosimile sovrastima degli effetti preventivi dell'alcool. Questi dati si riferiscono anche a situazioni di nessun consumo, e l'effetto netto sarebbe molto maggiore considerando il livello di consumo a più basso rischio. Misurare l'impatto dell'alcool attraverso il DALYs (Disability Adjusted Life Years) diminuisce questo problema e dimostra che l'alcool è responsabile del 12% e del 2% di morte prematura e di disabilità rispettivamente negli uomini e nelle donne, dopo aver considerato i benefici sulla salute. Ciò rende l'alcool il terzo fattore di rischio per la salute su 26 fattori di rischio nell'UE, davanti a sovrappeso-obesità e dietro solo al tabacco e all'ipertensione. È stato visto inoltre in diversi studi inglesi, che l'EtOH risulta essere la sostanza d'abuso più pericolosa tramite la valutazione di diversi parametri (mortalità specifica, non specifica, danni specifici).

L'Italia si colloca nelle posizioni più basse per consumo pro capite di alcool nella graduatoria stilata dall'OCSE (l'organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico), tuttavia detiene il primato del contatto più precoce con l'alcool: 12 anni e mezzo rispetto ai 14,6 della media europea. Secondo uno studio internazionale, l'alcool sarà la terza causa di disabilità, mortalità e morbilità nei prossimi anni (Lancet, 2009).

Le modalità del consumo alcoolico in Italia sono state di recente studiate attraverso un'indagine campionaria realizzata dall'Eurispes tra il 2009 e il 2010 tra la popolazione dai 18 anni in su. Secondo i dati pubblicati dalla Presidenza del Consiglio dei Ministri – Dipartimento Politiche Antidroga, il 70% degli italiani dichiara di bere alcoolici.

Di questi:

- il 55,7% beve saltuariamente;
- l'11% beve spesso;
- il 4,1% tutti i giorni.

Il 29% degli intervistati invece, non beve mai, in particolare le donne (56,9 % vs 43,1% dei maschi), soprattutto nella classe degli over 65 (26,9%), seguiti dai 45-64enni (23,7%) e dai 35-44enni (22,8%).

Alcool Storia Contemporanea - L'impatto dell'alcool in USA

L'impatto dell'EtOH e del consumo di alcool sulla società è elevatissimo. In base a dati forniti dalla NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism), il consumo pro capite di EtOH negli Stati Uniti è costantemente aumentato dalla metà del 1880 fino al 1915, ed è diminuito poco prima della promulgazione del Proibizionismo nel 1919. Tale divieto finì nel 1934, e da allora il consumo di tutti i tipi di alcoolici ha continuato ad aumentare fino al 1950. Raggiunto un picco nel 1975, iniziò a declinare nel corso del 1980, continuato in un calo del consumo stimato del 43% dal 1975. La più grande quantità di alcool consumata dagli americani nel corso degli ultimi 50 anni è in forma di birra, seguita da liquori e vino. Più recentemente, uno studio che esamina le indagini nazionali nei confronti dell'alcool ha rilevato che tra il 1984 e il 1995, su base pro capite, i livelli di consumo di birra e vino sono sostanzialmente invariati, mentre il consumo di alcoolici continua a diminuire (Greenfield, Midanik, & Rogers, 2000).

Si riscontra anche una importante differenza per genere; tra gli uomini, una percentuale dal 70% all'83% ha dichiarato di aver consumato alcool almeno una volta durante la loro vita, rispetto alla percentuale dal 39% al 66% delle donne. Tra gli uomini, il tasso di prevalenza del consumo di alcool assunto in tutta la vita è più alto tra quelli di età compresa tra 25-55 anni, risulta più basso tra 18-24 anni e oltre i 55 anni. Tendenze simili sono state rilevate

per le donne, anche se per le donne sono stati segnalati tassi più bassi di consumo di alcool nel corso della vita rispetto agli uomini in tutte le fasce di età.

La differenza più grande tra i sessi è stata osservata tra i 55 anni o più fasce di età, con i maschi che consumano più alcool. La differenza di genere più piccola nel tasso di consumo di alcool è stata rilevata tra i giovani adulti di età compresa tra 18 e 24 anni.

Più di recente il National Household Survey on Drug Abuse (SAMHSA, 2000) ha rilevato che l'incidenza di dipendenza da alcool risulta molto più elevata tra i giovani adulti di età inferiore a 26 anni. Tra gli uomini, il tasso di dipendenza da alcool è risultato inversamente correlato con l'età dei singoli individui. Una tendenza analoga è stata riscontrata per le donne, ad eccezione di un tasso di abuso leggermente più elevato tra 25 e 34 anni di età rispetto al gruppo di età più giovane.

Ampiamente studiata risulta la componente relazionale alcool-violenza; i dati indicano che l'alcool è legato a due aspetti principali della violenza: perpetuazione e vittimizzazione. I soggetti colpevoli avevano bevuto in:

- 86% di omicidi;
- 60% dei reati a sfondo sessuale;
- 37% di attacchi;
- 27% delle femmine e il 57% dei maschi coinvolti in violenze coniugali;
- 13% dei casi di abusi sui minori.

L'alcool è anche associato a decessi da lesioni, omicidi, suicidi e agli incidenti di veicoli a motore; quasi la metà dei decessi dovuti a incidenti stradali sono stati associati al consumo di alcool.

Tra i molteplici fattori scatenanti l'assunzione di alcool, lo stress è comunemente ritenuto essere un fattore di rischio per lo sviluppo dell'alcoolismo (dipendenza da alcool).

Risposta dell'organismo allo stress

I singoli individui rispondono in modo diverso ai diversi fattori di stress; un evento percepito come estremamente stressante da un individuo può essere percepito come innocuo da un altro. Ogni qualvolta un organismo percepisce uno stimolo ambientale come situazione stressante, si avvia una risposta fisiologica caratterizzata da un complesso di reazioni comportamentali (come comportamenti di lotta o fuga), biologiche (come l'aumento del battito cardiaco, pressione arteriosa, sudorazione) e, nell'uomo, di reazioni emotive come le sensazioni di ansia. La risposta allo stress è coordinata attraverso due meccanismi:

- a. modificazioni nelle attività delle varie regioni del cervello e delle sostanze chimiche del cervello, cioè di neurotrasmettitori;
- b. modificazioni nell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA).

I neurotrasmettitori coinvolti nel controllo della risposta allo stress comprendono la serotonina, la dopamina, e i peptidi oppiacei.

Questi sistemi di neurotrasmettitori agiscono attraverso una varietà di meccanismi. Per esempio, i peptidi oppioidi vengono prodotti e rilasciati per alleviare il dolore, e il rilascio di dopamina risulta in un aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca.

Inoltre, diversi neurotrasmettitori possono influenzare inibendo o aumentando l'attività dell'asse HPA. In queste condizioni l'asse HPA sintetizza e rilascia tre ormoni:

- a. ormone di liberazione della corticotropina (CRH), prodotto a livello ipotalamico;
- b. ormone adrenocorticotropo (ACTH), rilasciato dalla ghiandola pituitaria;
- c. ormoni glucocorticoidi, secreti dalle ghiandole surrenali.

I tre tipi di ormoni costituiscono una cascata ormonale strettamente regolata. L'attivazione delle diverse cellule nervose nel cervello in risposta allo stress risulta nella produzione e liberazione di CRH da alcune cellule dell'ipotalamo.

Attraverso i vasi sanguigni specifici nel cervello, il CRH è trasportato dall'ipotalamo alla ghiandola pituitaria, dove induce la produzione e la secrezione di ACTH nella circolazione sanguigna. Attraverso il sangue, l'ormone ACTH raggiunge le ghiandole surrenali e avvia la produzione e il rilascio di ormoni glucocorticoidi.

Il maggiore glucocorticoide negli esseri umani è il cortisolo, mentre nei roditori è il corticosterone. Questi glucocorticoidi regolano le diverse risposte fisiologiche allo stress, come ad esempio le alterazioni della funzione cardiovascolare e dell'attività delle ghiandole sudoripare. L'attività dell'asse HPA è regolata da un meccanismo di controllo a feedback negativo in cui gli stessi glucocorticoidi rilasciati in circolo agiscono a ritroso sull'ipotalamo e / o sulla ghiandola pituitaria per sopprimere un ulteriore rilascio di CRH e / o ACTH. Tali risposte neurochimiche e ormonali dell'organismo umano non agiscono indipendentemente le une dalle altre, ma sono strettamente interconnesse. Così, il rilascio di CRH dall'ipotalamo è regolato da neuroni che liberano su di esso serotonina o oppioidi endogeni. Inoltre, il rilascio ipotalamico di CRH non risulta solo nel rilascio di ACTH, ma implica anche il rilascio di alcuni oppioidi endogeni da specifici neuroni nel cervello, che possono contribuire ai diversi comportamenti e alle conseguenze emotive dello stress.

L'assunzione cronica e di alte dosi di alcool può, infatti, generare nell'organismo uno stato di stress che risulta simile alle risposte evocate anche da altri stimoli stressanti (*stressors*); una possibilità, quindi, potrebbe essere che a questo punto si inneschi un meccanismo indotto dallo stesso alcool che spinge le persone ad assumere altra sostanza per alleviare lo stress (“ipotesi di riduzione della tensione al consumo di alcool”).

E' quindi di particolare rilevanza studiare la relazione causa-effetto che lega stress e consumo di alcool. A tal proposito, la ricerca scientifica si avvale sia di indagini di popolazione sia di studi sperimentali. In molti ma non in tutti questi studi, è stato rilevato che gli individui bevono in risposta allo stress per una serie di motivi. Tali studi indicano che gli individui assumono l'alcool come mezzo per far fronte allo stress economico e lavorativo, per problemi di coppia, spesso in assenza di sostegno sociale, ma soprattutto indicano che tanto più gravemente e cronicamente si presentano tali fattori di stress, tanto maggiore è il consumo di alcool.

Tuttavia, il fatto che una persona beva in risposta allo stress sembra dipendere da molteplici fattori, compresi eventuali fattori di vulnerabilità genetica, il comportamento

alimentare abituale di un individuo, l'intensità e il tipo di fattore stressante, la gamma delle risposte individuali per affrontare lo stress percepito.

A tal riguardo, studi sperimentali condotti su animali hanno rilevato che il consumo di alcool è in grado di aumentare la risposta allo stress, ma anche che i singoli animali possono differire per la quantità di alcool che consumano in risposta allo stress.

Alcuni ricercatori hanno infatti rilevato che alti livelli di stress possono influenzare l'assunzione di alcool quando esso è accessibile, e quando l'individuo ritiene che l'alcool possa contribuire a ridurre lo stress.

Gli studi sugli animali volti a stabilire una correlazione positiva tra lo stress e il consumo di alcool suggeriscono che la sua assunzione può avvenire in risposta ad uno stress cronico percepito come inevitabile (Volpicelli, 1987).

Per esempio, i ratti esposti cronicamente ad uno shock inevitabile manifestano un comportamento debole e passivo di fronte ad un qualsiasi fattore di stress nuovo, incluso uno shock evitabile; questi animali mostrano anche una più alta preferenza all'alcool rispetto ai ratti che ricevono solo shock evitabili (Volpicelli, 1987).

Altro dato interessante è che i ratti sottoposti a shock inevitabili mostrano gli stessi cambiamenti ormonali che si verificano anche nella risposta allo stress, tra cui un aumento dei livelli di ormoni corticosteroidi.

Tra i molteplici modelli sperimentali usati per simulare una condizione stressante e poter studiare la relazione tra alcool e stress c'è l'isolamento sociale.

L'isolamento sociale è infatti un modello di stress moderato e prolungato che è stato associato a marcate alterazioni comportamentali, così come l'aumentata attività motoria, ansia, e aggressività in animali da laboratorio. L'isolamento provoca una diminuzione nei livelli plasmatici e cerebrali di steroidi neuroattivi ed è accompagnato da una anormale risposta agli stimoli stressanti acuti come da un aumento nell'effetto neurosteroidogenico indotto dalla somministrazione acuta di EtOH.

Isolamento sociale

L'isolamento sociale è considerato un modello animale di stress e di depressione (Wallace et al. 2009). Le recenti evidenze riguardo le interazioni tra geni e ambiente suggeriscono che le esperienze di vita iniziali dell'individuo possano avere un profondo impatto sullo sviluppo e sulla maturazione del sistema nervoso centrale. I roditori, in particolare topi e ratti, sono animali “sociali” che, se sottoposti ad isolamento dai loro simili per un determinato periodo di tempo manifestano una alterazione dei loro normali comportamenti di “interazione sociale”. Nel ratto, la privazione del contatto sociale con altri ratti è considerata una forma di stress prolungato che conduce ad alterazioni a lungo termine nel loro profilo comportamentale (Einon and Morgan 1977; Hall 1998).

E' stato estesamente osservato che l'isolamento sociale provoca un aumento nella attività locomotoria, ansia, depressione, aggressività negli animali da laboratorio, sia nei ratti che nei topi. È stato visto che nei topi, isolati per 5 giorni o più, l'attività motoria è aumentata, e nell'elevated plus maze, un test per valutare lo stato ansioso, questi animali presentano un comportamento assimilabile all'ansia e alla paura. Inoltre nel light\dark test, è stato osservato che i ratti isolati mostrano una significativa diminuzione dell'attività esplorativa nello scomparto luminoso, spendendo poco tempo alla luce e compiendo così poche transizioni tra il compartimento chiaro e quello scuro, rispetto ai ratti allevati in gruppo. Queste alterazioni comportamentali sono riconducibili all'ipotesi che appunto l'isolamento sociale rappresenterebbe uno stato di stress per questi animali che sono normalmente gregari, e l'anormale risposta comportamentale dei ratti mantenuti in tale condizione è il prodotto di uno stress prolungato. Per quanto argomentato in precedenza sulla relazione stress e consumo di alcool, non sorprende che gli animali isolati mostrino inoltre anche una maggiore propensione a consumare volontariamente alcool rispetto agli animali di controllo, rappresentando quindi un modello sperimentale ideale proprio per valutare questa interazione.

Studi precedenti nei nostri laboratori (Serra et al. 2003) hanno dimostrato che l'isolamento sociale in topi e ratti è associato a una diminuzione dei livelli di steroidi neuroattivi come progesterone e i suoi metaboliti AP e THDOC, nel plasma e cervello. Questi cambiamenti sono accompagnati da un aumento dell'espressione delle subunità del recettore GABA α 4 e δ dell'ippocampo. Il meccanismo molecolare alla base della persistente diminuzione nei livelli di steroidi neuroattivi indotta da un prolungato isolamento sociale nei ratti non è chiaro. Comunque, sembra probabile che, in risposta allo stress prolungato da isolamento sociale, l'asse HPA possa subire modificazioni funzionali tali che l'animale sviluppi una iper-responsività verso nuovi stimoli stressanti. In accordo con questa ipotesi, è stato visto recentemente come l'aumento dell'attività dell'asse HPA, e nel plasma e nel cervello delle concentrazioni di THDOC e AP indotta da un'iniezione in acuto di EtOH, sia marcatamente potenziato dall'isolamento sociale nei ratti (Serra et al. 2003), suggerendo che lo stress cronico potrebbe promuovere un adattamento plastico dei sistemi neuronali, e questo potrebbe contribuire alla vulnerabilità dell'abuso di alcool. In accordo con questi studi che hanno mostrato ampiamente che lo stress influenza la self-administration di EtOH in modelli animali, in ratti socialmente isolati consumano volontariamente quantità maggiori EtOH rispetto a ratti di controllo mantenuti in gruppo (Hall et al. 1998; Schenk et al. 1990; Wolffgramm 1990).

Etanolo e sistemi di neurotrasmissione.

La ricerca di questi anni ha individuato alcuni bersagli neurochimici che sono particolarmente sensibili all'azione dell'etanolo (EtOH) come ad esempio vari sistemi di neurotrasmissione. Questi includono l'adenosina (Anwer and Dar, 1995; Concas et al., 1996; Dunwiddie, 1996), la glicina (Aguayo et al., 1996; Mascia et al., 1996a,b), l'acetilcolina (Madamba et al., 1995; Nagata et al., 1996; Coe et al., 1996; Freund and Palmer, 1997), così come anche monoamine e neuropeptidi (Kleven et al., 1995; Lau and Frye, 1996; Nagata et al., 1996; Wang et al., 1996). L'EtOH esercita anche importanti effetti sulle membrane cellulari, sui canali ionici voltaggio-dipendenti e sui sistemi recettoriali accoppiati alla produzione di secondi messaggeri (Mullikin-Kilpatrick and Treistman, 1996; Mihic and Harris, 1996; Koob, 1996; Eggeman and Browning, 1996; Kershbaum and Hermann, 1997; Solem et al., 1997). L'interazione dell'EtOH con due dei più importanti sistemi di neurotrasmettitori aminoacidici, quello dell'acido γ -aminobutirrico (GABA) e quello degli aminoacidi eccitatori (EAA) ha suscitato ampia attenzione negli ultimi anni da parte dei ricercatori in questo settore. (Deitrich and Erwin, 1989).

Interazioni tra recettore per il Glutammato ed EtOH.

L'acido glutammico è il più importante amminoacido eccitatorio presente nel SNC. Esso può interagire con diversi tipi di recettori, i quali sono stati classificati sulla base della loro attività preferenziale per gli agonisti acido N-Metil-D-Aspartico (NMDA) e acido Kainico (Watkins J.C. et al., 1981) e recettori AMPA. Studi effettuati sugli effetti dell'etanolo hanno indicato che il complesso recettoriale per l'NMDA sarebbe coinvolto nella farmacologia dell'intossicazione da trattamento cronico con etanolo. In supporto di questa affermazione ci sono studi biochimici e farmacologici i quali affermano che la funzione del complesso recettoriale per l'NMDA è aumentata durante la crisi d'astinenza da etanolo

(Hoffman P.L. et al., 1990; Gulya K. Et al., 1991; Sanna E. et al., 1993; Grant K.A. et al., 1992; Iorio K. et al., 1992). Questo recettore è un complesso multiproteico, che possiede il sito di riconoscimento all'NMDA a cui è associato un canale cationico permeabile sia al Ca^{++} che al Na^{+} . Inoltre strettamente associato al recettore NMDA vi è un sito di modulazione allosterico che lega la glicina. La glicina infatti è necessaria per l'attivazione del complesso recettore-canale e potenzia le risposte dell'NMDA (Kleckner N.W et al, 1988). Il recettore NMDA sembra svolgere un ruolo importante nella plasticità sinaptica, nella memoria, nei processi di apprendimento (Long-term potentiation, LTP), nello sviluppo neuronale, nella genesi delle convulsioni epilettiformi e nel danno cerebrale (Cline H. et al., 1987; Dingledine R. et al., 1986; Harris E.W. et al., 1984; Lister R.G. et al., 1987). Infatti, il recettore NMDA è coinvolto in diversi effetti fisiopatologici dell'etanolo, come disfunzioni cognitive, sviluppo di anomalie nella sindrome alcolica fetale ed in alcuni effetti associati all'ingestione cronica di etanolo, come per esempio l'eccitabilità e l'attività convulsiva tipiche della crisi d'astinenza (Clarren S.K. et al., 1978; Tabakoff B. et., al 1982; Hoffman P.L. et al., 1989). L'EtOH inibisce la capacità del glutammato di aprire il canale cationico associato al recettore NMDA (Diamond and Gordon, 1997): come conseguenza il flusso di ioni attraverso i canali associati al recettore risulta inibito. Questa azione dell'alcol può contribuire alla perdita di memoria che a volte si verifica nell'intossicazione acuta da etanolo, in quanto, come già ricordato, il recettore NMDA ha un ruolo nella modulazione di alcuni aspetti della funzione cognitiva quali apprendimento e memoria, attraverso un meccanismo di facilitazione sinaptica. Numerosi studi sull'effetto dell'esposizione acuta all'etanolo evidenziano una sua azione inibente sui recettori NMDA, in particolare sulla capacità del neurotrasmettitore di attivare e/o modulare l'apertura dei relativi canali cationici. Gli effetti dell'etanolo sui recettori NMDA non sono uniformemente riscontrabili in tutte le aree cerebrali ma selettivamente evidenziabili in alcune zone (nucleo del setto laterale, substantia nigra, talamo, ippocampo e cervelletto). Un lavoro (Criswell et al., 2003) effettuato su neuroni isolati evidenzia che tale differente reattività non è osservabile in vitro: essa pertanto non è attribuibile a differenze nell'azione dell'etanolo a livello recettoriale (postsinaptico), ma bensì dipendente da meccanismi pre-sinaptici ancora non definiti. Come già detto, mentre l'effetto dell'esposizione acuta all'etanolo consiste in una inibizione della funzionalità dei recettori NMDA, al contrario l'esposizione cronica causa un incremento nell'espressione dei recettori. Non è stato ancora ben stabilito il meccanismo con il quale l'alcol inibisce la trasmissione glutammatergica: il meccanismo più probabile è di tipo non competitivo, in

quanto non agisce né come un antagonista recettoriale, né come bloccante il flusso cationico a livello dei canali (Woodward et al., 2000). Come già sottolineato, un'altra modalità con la quale l'alcol può alterare la funzionalità neuronale è attraverso l'interazione con i meccanismi di fosforilazione delle proteine. A livello dei recettori NMDA, l'alcol attiva la tirosina chinasi (chinasi specifica coinvolta nella fosforilazione del recettore NMDA che agisce fosforilando l'aminoacido costituente tirosina), con conseguente effetto di inibizione della funzionalità recettoriale (Miyakawa et al., 1997). Studi effettuati su topi knock-out caratterizzati dalla mancanza del gene deputato alla sintesi della tirosina-chinasi, hanno evidenziato che, in assenza di questa specifica protein-chinasi, non si instaura la cosiddetta tolleranza rapida (Pearson et al., 1997) all'effetto inibitorio sulla trasmissione glutammatergica spiegato dall'etanolo. Ciò sottolinea l'importanza del recettore NMDA nei meccanismi che conducono all'adattamento neuronale, a sua volta responsabile dell'instaurarsi del fenomeno della tolleranza. Altra chinasi bersaglio dell'azione dell'alcol è la protein-chinasi cAMP-dipendente: studi sperimentali (Dohrman et al., 1996) hanno evidenziato che l'alcol induce una alterazione della distribuzione di questa chinasi nei neuroni, consistente in una sua traslocazione all'interno del nucleo (Dohrman et al., 2002). Tra le proteine oggetto della regolazione di questa chinasi ricordiamo il trasportatore del neurotrasmettitore adenosina (Coe et al., 1996): l'inibizione di tale trasportatore conduce ad un aumento della concentrazione della adenosina a livello della sinapsi, e quindi ad una amplificazione dell'effetto inibitorio (sinergico a quello del GABA) da essa indotto. Pertanto l'ipereccitabilità e l'attività convulsivante che caratterizzano gli animali durante la sindrome d'astinenza suggerisce ulteriormente che gli aminoacidi eccitatori siano coinvolti nei meccanismi molecolari che vengono attivati durante l'interruzione del trattamento cronico con etanolo. Tutti questi dati suggeriscono quindi che i farmaci capaci di ridurre la trasmissione degli aminoacidi eccitatori potrebbero essere efficaci nell'antagonizzare o ridurre i sintomi presenti durante la crisi d'astinenza da etanolo. Gli effetti a carico del SNC potrebbero essere in parte dovuti ad un aumento della inibizione mediata dal GABA e ad una inibizione dell'ingresso del calcio attraverso canali voltaggio dipendenti che determina una inibizione del rilascio dei neurotrasmettitori in risposta alla depolarizzazione della terminazione nervosa e in parte a una inibizione della funzione dei canali del glutammato (recettori NMDA). L'azione dell'etanolo sembra consistere quindi in una inibizione generale di varie strutture cerebrali, tra cui la corteccia, il sistema limbico e il cervelletto.

Interazioni tra recettore per il GABA ed EtOH.

In questi ultimi anni sono stati accumulate numerose evidenze, sia elettrofisiologiche che comportamentali, che indicano come il recettore GABA rappresenti un sito sensibile e importante per quanto riguarda le azioni in acuto e in cronico dell'EtOH. (Faingold et al. 1998; Grobin et al. 1998; Harris 1999; Ueno et al. 2001)

Il coinvolgimento dell'EtOH nella trasmissione mediata dal recettore GABA è stata suggerita dalle prime osservazioni, che a basse concentrazioni (20-60) l'EtOH potenzia il flusso di ioni cloro stimolato da agonista in sinaptosomi cerebrali. (Allan and Harris 1986; Morrow et al. 1988; Suzdak et al. 1986) e in colture cellulari (Ticku and Burch 1980).

In aggiunta è stato visto che certi effetti comportamentali dell'EtOH sono potenziati da agonisti o modulatori positivi del recettore GABAA, e bloccati o attenuati da antagonisti del recettore GABAA (Martz et al. 1983) . Le evidenze neurofisiologiche che indicano che l'alcool in acuto modula la funzione del recettore GABAA sono state in certo qual modo ritenute elusive e controverse. Infatti mentre certi studi hanno mostrato un effetto potenziante dell'EtOH sulla funzione del recettore GABAA, altri non sono riusciti a riprodurre gli stessi risultati. (Faingold et al. 1998; Grobin et al. 1998).

Il potenziamento della funzione del recettore GABAA da parte dell'EtOH è caratterizzato da una certa specificità regionale; infatti, a livello dell'ippocampo è stata osservata una relativa insensibilità all'EtOH. Comunque, alcuni studi più recenti hanno riportato un potenziamento della funzione del recettore GABAA nell'ippocampo in determinate condizioni sperimentali, per esempio in presenza del blocco presinaptico dei recettori GABAB, (Wan et al. 1996; Weiner et al. 1997) attraverso una stimolazione dei dendriti prossimali piuttosto che quelli distali (Weiner et al. 1997) o tramite l'attivazione della via dei secondi messaggeri cAMP-PKA accoppiata al recettore beta-adrenergico (Freund and Palmer 1997; Lin et al. 1991).

Tuttavia ricerche recenti hanno contribuito a identificare meccanismi aggiuntivi attraverso i quali l'EtOH è capace di influenzare l'attività delle sinapsi GABAergiche. In primo luogo, sono state raccolte evidenze consistenti che indicano che l'EtOH, in aggiunta ai suoi

effetti a livello dei recettori postsinaptici, è in grado di esercitare un'azione presinaptica, che consiste in un aumento della probabilità di rilascio di GABA. Un aumento della frequenza sia delle IPSCs, correnti post sinaptiche inibitorie, in miniatura (potenziale d'azione-indipendenti), o spontanee e dipendenti dal potenziale d'azione, mediati dal recettore GABAA sono stati osservati in neuroni piramidali ippocampali CA1, (Ariwodola and Weiner 2004; Carta et al. 2003; Sanna et al. 2004) amigdala (Ariwodola and Weiner 2004; Carta et al. 2003; Sanna et al. 2004), cellule granulari cerebellari (Carta et al. 2004), e motoneuroni spinali (Ziskind-Conhaim et al. 2003).

Recettori GABAA

I recettori GABAA sono complessi eteromerici formati dall'assemblamento di 5 subunità proteiche che appartengono a un gruppo di differenti classi di subunità.

La distribuzione nel cervello è regione-specifica, e l'espressione sviluppo-dipendente delle varie isoforme delle subunità sono fattori responsabili della espressione di un relativo alto numero di sottotipi di recettori GABAA che differiscono sia nella composizione di subunità sia nelle proprietà fisiologiche e farmacologiche Sieghart 1995; Sieghart and Sperk 2002; Whiting et al. 1999).

L'EtOH potenzia selettivamente e a basse concentrazioni (1-30 Mm) la funzione dei recettori per il GABA ricombinanti contenenti le subunità $\alpha 4, \alpha 6$ e δ , espresse in oociti di *Xenopus laevis*, mentre le stesse concentrazioni sono risultate inefficaci nei recettori dove la subunità δ è stata rimpiazzata dalla subunità $\gamma 2$ (Sundstrom-Poromaa et al. 2002; Wallner et al. 2003).

Al contrario dei recettori contenenti la sub unità $\gamma 2$, quelli formati dalle subunità $\alpha 4, \alpha 6$, e δ si trovano a livello extrasinaptico, e si ritiene che medino la cosiddetta attività tonica inibitoria (Mody et al. 1994; Semyanov et al. 2004).

Inoltre, i recettori GABAA extrasinaptici vengono espressi preferenzialmente nel giro dentato, nel talamo, e nelle cellule granulari cerebellari (Semyanov et al. 2004), e sono caratterizzati da una più elevata affinità per il GABA (circa 0,5 μM), mostrano una ridottissima velocità di desensitizzazione e sono sensibili preferenzialmente ai neurosteroidi (Semyanov et al. 2004).

L'aumento dell'attività tonica mediata dal recettore per il GABA da parte di basse concentrazioni (30 mM) di EtOH è stato dimostrato nelle cellule granulari del giro dentato (Wei et al. 2004). Comunque, è importante considerare che altri laboratori non sono riusciti a riprodurre l'effetto di basse concentrazioni di EtOH sulla funzione di questi recettori (Borghese et al. 2005).

Allo stesso modo in studi preliminari Yamashita (Yamashita et al. 2005) ha dimostrato che sia i recettori GABA che mediano correnti toniche registrando da cellule granulari di cervelletto, che recettori ricombinanti contenenti $\alpha 6$ e δ , sono insensibili a basse concentrazioni di EtOH. Perciò sembra che al momento, l'ipotesi che i recettori extrasinaptici possano rappresentare bersagli sensibilissimi per l'azione dell'EtOH a concentrazioni farmacologicamente rilevanti, abbia ancora bisogno di ulteriori valutazioni. L'acido γ -aminobutirrico (GABA) è il principale neurotrasmettitore inibitorio presente nel sistema nervoso centrale (S.N.C.) dei mammiferi. Circa il 20- 50% di tutte le sinapsi utilizzano questo neurotrasmettitore (Barnard *et al.*, 1998; Mehta and Ticku, 1999), il quale si forma per decarbossilazione (operata da due forme enzimatiche di acido glutamico decarbossilasi (GAD65 e GAD67) dell'acido glutammico a livello dei terminali sinaptici; viene depositato all'interno di vescicole sinaptiche tramite un trasportatore neurotrasmettitoriale (VGAT), trasportatore specifico che utilizza, come fonte di energia, sia il gradiente elettrico che il differente pH presente tra il lume vescicolare e il citoplasma, generato dalla H-ATPasi (pompa protonica) vescicolare e rilasciato con un meccanismo di esocitosi calcio-dipendente. Si possono osservare delle forme di rilascio non vescicolare (per esempio attuate dall'azione opposta del trasportatore) particolarmente importante durante lo sviluppo (Owens and Kriegstein, 2002). La funzione inibitoria del GABA è mediata dalla sua azione su recettori metabotropici e ionotropici, localizzati nei terminali pre- e post- sinaptici.

L'azione sinaptica del GABA è terminata ad opera delle proteine di reuptake del GABA (GATs) presenti nelle membrane citoplasmatiche dei terminali nervosi e delle cellule gliali astrocitarie circostanti. Quindi, la degradazione è catalizzata dall'enzima GABA- α -chetoglutaricotransaminasi (GABA-T), che lo deamina a semialdeide succinica la quale viene ossidata, a sua volta, ad acido succinico ad opera della semialdeidesuccinico-deidrogenasi NAD-dipendente ed entra a far parte del ciclo di Krebs. Il gruppo aminico viene trasferito dalla GABA-T ad una molecola di α -chetoglutarato per formare acido glutammico, che viene riutilizzato per la sintesi di nuovo GABA. GABA-T e semialdeide

succinica si trovano sempre legati ai mitocondri non solo nell'assone terminale ma anche nelle strutture postsinaptiche o nelle cellule gliali. Il GABA è capace di interagire con due classi di recettori specifici, recettori ionotropici, convenzionalmente denominati GABAA, e recettori metabotropici denominati GABAB (Barnard et al., 1998; Bormann et al., 2000) che differiscono fra loro per struttura molecolare, meccanismo di trasduzione del segnale, distribuzione, funzione e profilo farmacologico. Il recettore GABAA è il principale sito d'interazione del neurotrasmettitore GABA capace di trasdurre un segnale inibitorio "rapido" (ordine di msec), attraverso il quale i neuroni GABAergici esercitano le loro azioni fisiologiche. Il recettore GABAA appartiene alla superfamiglia dei recettori ionotropici o canali ionici operati da ligando, cui appartengono anche i recettori nicotinico per l'acetilcolina, glicinergerico, serotoninergico di tipo 5-HT₃ (Bertrand *et al.*, 1995). Similmente agli altri membri di questa superfamiglia recettoriale, il recettore GABAA è un complesso etero-pentamerico formato da cinque sub unità glicoproteiche con un peso molecolare compreso fra 46 e 67 kDa. (Tretter *et al.*, 1997), assemblate mediante forze non covalenti e disposte pseudosimmetricamente attorno ad un asse centrale, perpendicolare alla superficie della membrana cellulare, in modo tale che il canale ionico sia delimitato da pareti costituite dai domini transmembrana TM2 appartenenti a ciascuna delle cinque subunità. Questo complesso macromolecolare possiede funzioni intrinseche recettoriali, trasduttrici ed effettrici ed è accoppiato direttamente ad un canale ionico che, nel caso del recettore GABAA, è permeabile principalmente allo ione cloruro (Cl⁻), la cui permeabilità è controllata attraverso l'interazione del GABA con il suo sito di riconoscimento (Delorey and Olsen, 1992). Si può rilevare inoltre una certa, anche se minore, permeabilità allo ione HCO³⁻. I vari tipi di subunità possiedono una marcata similitudine nella loro struttura primaria e nella loro topologia transmembrana (Schofield *et al.*, 1987). Tutte le subunità recettoriali consistono di un esteso dominio amino-terminale extracellulare, quattro domini (TM1-TM4) transmembrana, sotto forma di α elica, connessi da brevi segmenti, ed un lungo loop intracellulare fra TM3 e TM4 (Schofield *et al.*, 1987), contenente sequenze consenso per la fosforilazione operata da kinasi Ser/Thr- e Tyr-dipendenti. Questa topologia tetraelicale delle subunità si ritrova in tutti i membri della superfamiglia recettoriale. Nel corso degli ultimi due decenni, sono state identificate, mediante clonazione del DNA complementare (cDNA) specifico, diverse classi di sub unità (α , β , γ , δ , ϵ , ρ , π) dal SNC dei mammiferi (Barnard *et al.*, 1998), e, sono state presentate alcune evidenze per l'esistenza di un'ulteriore subunità, la θ (Whiting, 1999).

Queste subunità presentano circa il 30-40% di omologia nella loro sequenza aminoacidica e si ritiene siano derivate da un gene ancestrale comune (Olsen and Tobin, 1990; Schofield *et al.*, 1990; Seeburg *et al.*, 1990; Burt and Kamatchi, 1991; Luddens and Wisden, 1991; Stephenson, 1991; Doble and Martin, 1992; Wisden and Seeburg, 1992).

Esistono, inoltre, varianti multiple o isoforme delle diverse classi di subunità: $\alpha(1-6)$, $\beta(1-4)$, $\gamma(1-3)$, $\rho(1-3)$ le quali sono codificate da geni distinti e localizzati su differenti cromosomi (Barnard *et al.*, 1998; Whiting *et al.*, 1999; Sieghart and Sperk, 2002). Il polimorfismo di alcune subunità è ulteriormente aumentato da variazioni fenotipiche che risultano da meccanismi di maturazione alternativa, “splicing” e “editing”, dell’RNA messaggero (Whiting *et al.*, 1990; Kufuji *et al.*, 1991; Harvey *et al.*, 1993).

Esiste inoltre, un alto grado d’omologia (circa 70-80%) fra le diverse isoforme della stessa classe di subunità (Barnard, 1992).

Studi recenti hanno evidenziato come la più probabile configurazione o stechiometria dei recettori GABA_A neuronali sia quella formata da 2 subunità α due β e una γ ; sembra inoltre che le subunità δ , ϵ e ρ possano sostituire la subunità γ in questi recettori (Hedblom and Kirkness, 1997), mentre la subunità θ potrebbe sostituire una subunità γ (Sieghart *et al.*, 1999).

Inoltre è stato determinato, mediante esperimenti di immunoprecipitazione, che in un singolo complesso recettoriale è possibile la coesistenza di due diverse isoforme della subunità α (Luddens *et al.*, 1991).

Dal punto di vista sperimentale, un numero notevole di combinazioni recettoriali funzionali è stato ricostruito *in vitro* in diverse linee cellulari (Wong *et al.*, 1992), anche se studi recenti d’immunoprecipitazione suggeriscono che solo un numero limitato di sottotipi recettoriali è effettivamente espresso *in vivo* nelle diverse popolazioni neuronali (McKernan *et al.*, 1996).

Questi studi hanno mostrato come le diverse combinazioni recettoriali differiscono in modo marcato per la loro sensibilità al GABA, per la cooperatività dell’azione del GABA (indicata dal coefficiente di Hill), per la conduttanza a livello dei singoli canali al Cl⁻ e per la loro sensibilità ai diversi agenti modulatori allosterici (Costa *et al.*, 1994).

Farmacologia dei Recettori GABAA

Per quanto riguarda la sensibilità farmacologica dei recettori GABAA, numerose classi di farmaci d'importanza terapeutica hanno un sito d'azione specifico a livello di questo complesso recettoriale (Mehta and Ticku, 1999; Sieghart, 1995; Barnard *et al.*, 1998): benzodiazepine, ciclopirroloni, imidazopirimidine, pirazolopirimidine, barbiturici, anestetici generali, alcoli, β -carboline, agenti convulsivanti (picrotossina, TBPS) e i neurosteroidi, che rappresentano i più efficaci e potenti modulatori endogeni della funzione dei recettori GABAA e l'EtOH, che si comporta come un modulatore positivo, ma di cui ancora oggi non si hanno precise conoscenze sul suo meccanismo d'azione a livello della sinapsi GABAergica.

Questi farmaci producono almeno parte dei loro effetti clinicamente rilevanti, interagendo con siti distinti di legame allosterici presenti sul complesso recettoriale (Smith and Olsen, 1995).

Tali siti di legame, pur essendo entità distinte, sono accoppiati funzionalmente fra loro e al sito di riconoscimento per il neurotrasmettitore (GABA) in modo allosterico; perciò, l'attivazione o l'inibizione di uno di questi siti modulatori determina una variazione nella capacità degli altri ad interagire con i propri ligandi specifici e questo si traduce, a sua volta, in una modulazione positiva (facilitazione) o negativa (inibizione) dell'azione del GABA sul proprio sito recettoriale.

In particolare, una facilitazione o un'inibizione dell'interazione del GABA con il proprio recettore determina una modificazione conformazionale di quest'ultimo, con la conseguente maggiore apertura o chiusura del canale al Cl^- quindi un aumentato o diminuito flusso di cariche negative all'interno della membrana postsinaptica.

Poiché l'azione inibitoria del GABA si esplica attraverso un'iperpolarizzazione della membrana postsinaptica, mediata dall'aumentata permeabilità al cloruro, il meccanismo di regolazione allosterica del recettore GABAA ha quindi lo scopo di aumentare o ridurre la probabilità che la membrana postsinaptica venga eccitata (MacDonald and Olsen, 1994).

Sulla base delle loro azioni fisiologiche, si è concluso che i recettori GABAA sono coinvolti nel controllo dell'eccitabilità neuronale (Olsen and Avoli, 1997; Fritschy *et al.*, 1999), nella modulazione dell'ansia (Nutt *et al.*, 1990), delle sensazioni emotive (feeling), dei ritmi circadiani (Turek and Van Reeth, 1988), della cognizione, vigilanza, memoria,

apprendimento (Izquierdo and Medina, 1991) nella farmacologia dell'EtOH e del drinking behavior (Cooper, 1989) e nell'epilessia (Spencer *et al.*, 1994).

Diversi tipi d'inibizione mediata da recettori GABAA

Una delle caratteristiche fondamentali delle cellule nervose è l'eccitabilità, ossia la capacità di poter rispondere a degli stimoli, i quali vengono definiti generalmente come rapide modificazioni fisiche o chimiche dell'ambiente in cui le cellule si trovano. Uno stimolo adeguato può indurre le cellule nervose a rispondere con una manifestazione caratteristica e stereotipata come il potenziale d'azione. Ovviamente il sistema GABAergico ha il ruolo di mediare segnali sinaptici inibitori attraverso l'innalzamento della soglia di eccitazione, cioè di allontanare il neurone dalla soglia in cui insorge un potenziale d'azione. Il GABA viene liberato dal terminale presinaptico di un neurone GABAergico con diverse modalità: o conseguentemente all'insorgenza di un potenziale d'azione, che induce una massiccia fusione di vescicole presinaptiche che contengono il neurotrasmettitore, il quale verrà quindi liberato nello spazio sinaptico a concentrazioni che raggiungono livelli millimolari. Oltre al rilascio indotto da potenziale d'azione esiste anche un processo di rilascio vescicolare non dipendente dalla depolarizzazione della terminazione nervosa presinaptica. Questo rilascio è chiamato "quantale" intendendo con ciò che solo poche vescicole, contenenti ciascuna un "quanto" di neurotrasmettitore, si fondono spontaneamente con la membrana presinaptica. L'esocitosi indipendente dall'attività elettrica ha luogo normalmente nelle sinapsi del Sistema Nervoso Periferico e Centrale e genera correnti postsinaptiche inibitorie spontanee di piccola ampiezza (Katz, 1969), chiamate correnti post-sinaptiche eccitatorie o inibitorie in miniatura (mEPSC o mIPSC, o "minis") (Bekkers and Stevens, 1989).

Recentemente, è stato chiarito che distinti sottotipi di recettori GABAA partecipano a due tipi di controllo inibitorio. Questa peculiarità è dovuta non solo a diversi tipi di recettori GABAA in gioco ma anche alla loro localizzazione a livello della sinapsi GABAergica. Esistono infatti sia recettori sinaptici, cioè recettori localizzati sulla membrana

postsinaptica che si affaccia immediatamente sullo spazio sinaptico, sia recettori che sono localizzati al di fuori della sinapsi e perciò chiamati “extrasinaptici”. L’attivazione transitoria dei recettori GABAA sinaptici (dovuta al rilascio locale di GABA dai terminali presinaptici) è responsabile della classica inibizione “fasica” (i recettori hanno la classica struttura: $\alpha\beta\gamma\delta$), mentre la persistente attivazione dei recettori GABAA extrasinaptici (non ancorati al citoscheletro tramite la gefirina) genera una forma d’inibizione chiamata “tonica”. Questi due tipi di inibizione GABAergica sono fisiologicamente differenti poiché sono differenti i recettori che li mediano. Vediamo quali sono le caratteristiche principali che li differenziano attraverso una tabella riassuntiva:

In particolare:

- i recettori sinaptici sono costituiti da differenti subunità come $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$, le varie β e le varie γ mentre i recettori extrasinaptici sono formati dalle subunità $\alpha 5$ $\alpha 4\beta\gamma$ nei neuroni granulari del giro dentato dell’ippocampo e dalle subunità $\alpha 6\beta\gamma$ nei neuroni granulari del cervelletto di ratto.

Caratteristiche	Fasica	Tonica
Subunità	$\alpha 1, 2, 3, 5 \beta n, \gamma n$	$\alpha 4, 6 \beta n, \delta$
Localizzazione cellulare	Membrana sinaptica	Membrana extrasinaptica
Affinità per il GABA (EC_{50})	~10 mM	~0,2 mM
Sensibilità alle BDZ	Sensibili	Insensibili
Sensibilità ai neurosteroidi	Sensibili	Molto sensibili
Caratteristiche cinetiche	Rapida desensitizzazione	Bassa desensitizzazione
% trasmissione GABAergica	<5%	>90%

- Come già accennato hanno diversa localizzazione sinaptica.
- I recettori extrasinaptici presentano una affinità per il GABA circa 50 volte superiore rispetto a quelli sinaptici. Questa peculiarità è in accordo col fatto che questi recettori sono deputati a legare quelle basse concentrazioni di GABA che fuoriesce dalla sinapsi per il fenomeno dello *spill-over*.
- I recettori extrasinaptici sono insensibili alle benzodiazepine in quanto mancanti della subunità γ e quindi del sito di legame per questi modulatori positivi, ma sono molto sensibili ai neurosteroidi, per la presenza della subunità δ .

La maggiore presenza di correnti toniche GABAergiche dipende dalle differenti regioni cerebrali e mostra differenze, specifiche secondo il tipo cellulare, nell'ampiezza, farmacologia, e variazioni durante lo sviluppo cerebrale. Sono emerse alcune ipotesi sul significato adattativo di questo fenomeno: nell'ippocampo, come anche nel cervelletto, le correnti toniche agiscono, in maniera specifica secondo il tipo cellulare, regolando l'eccitabilità dei circuiti neuronali.

Poiché le conduttanze toniche possono essere modulate da cambiamenti nel rilascio e/o uptake del GABA e da modulatori dei recettori GABA_A ad alta affinità, quali i neurosteroidi, questo fenomeno costituisce potenzialmente un'importante e nuova finestra sull'elaborazione delle informazioni neuronali e di alcuni stati patologici, come l'epilessia. A livello dell'ippocampo di ratto e, più precisamente, nei neuroni granulari del giro dentato, si osserva una buona componente tonica anche se probabilmente i neuroni granulari del cervelletto mostrano l'attività tonica maggiore di tutto il SNC. Queste caratteristiche area-specifiche potrebbero trovare una spiegazione nel fatto che in entrambi i casi i neuroni granulari rappresentano il maggiore input dell'area cerebrale in esame mentre la maggiore componente tonica osservata nel cervelletto dipende probabilmente dalla struttura anatomica della sinapsi dove tra le fibre muscolari afferenti e i neuroni granulari si creano delle sinapsi particolari che, grazie all'ausilio di cellule gliali, formano un glomerulo nel quale il GABA è trattenuto all'interno e quindi più disponibile per i recettori extrasinaptici. Anche se l'ampiezza delle correnti toniche è relativamente bassa, tale da renderle confondibili con la cosiddetta "noia" elettrica (noise) di background, si evince che l'attività tonica rappresenti un controllo inibitorio del livello di eccitabilità neuronale più efficace rispetto a quello mediato dall'attività fasica (come già ricordato, la

componente tonica rappresenta circa l'90% dell'attività inibitoria complessiva). Per isolare le correnti toniche è possibile inibire selettivamente l'attività sinaptica in modo da evidenziare la rimanente attività extra-sinaptica. La soppressione farmacologica dell'attività fasica sinaptica si ottiene mediante l'utilizzo, per esempio, di concentrazioni opportune (< 100 μ M) dell'antagonista GABAergico SR-95531.

Questa molecola, infatti, ha un'azione preferenziale per i recettori sinaptici che, come già accennato, sono composti da subunità differenti rispetto ai recettori extrasinaptici. Le modalità di registrazione verranno trattate in seguito. Per valutare le modificazioni della corrente tonica durante la gravidanza ho misurato la variazione del noise (rumore di fondo) e la variazione della *holding current* (linea di base) in condizione di controllo e in presenza dei farmaci. Questi due parametri sono degli indici di attivazione dei recettori GABA_A extrasinaptici.

I neurosteroidi: modulatori endogeni dei recettori GABAA

È stato stabilito sulla base di una grande mole di dati sperimentali che i recettori GABAA sono siti sensibili per diverse classi di farmaci clinicamente rilevanti, come benzodiazepine, barbiturici e anestetici generali, così come di composti endogeni come gli steroidi neuroattivi, i quali allostericamente potenziano la funzione del recettore GABAA (Barnard et al. 1998; Frye et al. 1981; Mohler et al. 2002; Sieghart 1995). Gli steroidi neuroattivi sono prodotti da organi periferici come surreni e gonadi, ed esercitano la loro funzione anche a livello del SNC. Certi steroidi neuro attivi agiscono in maniera differente rispetto all'azione genomica tipica degli altri ormoni steroidi classici, modulando direttamente la funzione del recettore GABAA, con potenza ed efficacia simili o maggiori rispetto a quelle di benzodiazepine e barbiturici. (Harrison and Simmonds 1984; Majewska et al. 1986). Il metabolita ridotto del progesterone, allopregnanolone (AP), in vitro potenzia l'apertura dei canali al Cl⁻ associati al recettore GABAA a concentrazioni nanomolari, e la sua somministrazione sistemica induce effetti farmacologici e comportamentali simili a quelli prodotti dai farmaci ansiolitici, anticonvulsivanti, e ipnotici, che modulano la funzione del recettore GABAA (Lambert et al. 2001;Majewska 1992). Inoltre, alterazioni, indotte farmacologicamente o fisiologicamente, delle concentrazioni di AP sono implicate nella regolazione della plasticità dei recettori GABAA e conseguentemente dell'eccitabilità neuronale. Per esempio, il marcato aumento nella concentrazione degli steroidi neuro attivi nel plasma e nel cervello durante la fase terminale della gravidanza sembra associarsi ad un aumento dell'espressione e della funzione dei recettori GABAA nella corteccia cerebrale, mentre la diminuzione improvvisa e marcata nella concentrazione di questi ormoni immediatamente prima del parto e il loro basso livello durante l'allattamento, potrebbe determinare l'insorgere di fenomeni di astinenza (Brussaard et al. 1997; Concas et al.1998; Follesa et al. 2000; Smith et al. 1998b). In accordo con questi dati, la sospensione di un trattamento sistemico con steroidi neuro attivi induce un selettivo e marcato aumento nell'abbondanza sia dell'mRNA codificante la sub unità $\alpha 4$ del recettore GABAA sia della proteina tradotta nell'ippocampo di ratto (Smith et al. 1998a; Smith et al. 1998b). L'osservazione che queste fluttuazioni nelle concentrazioni cerebrali degli steroidi neuro attivi, sia indotte da trattamento farmacologico con progesterone o AP, sia associate a condizioni fisiologiche come la gravidanza, parto, allattamento, alterano la funzione e la plasticità del recettore GABAA suggerisce un meccanismo per cui fluttuazioni nelle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di questi steroidi possano regolare i livelli di espressione genica delle diverse subunità del recettore GABAA (Follesa et al. 2002).

Steroidi neuroattivi e effetti dell'EtOH

È stato recentemente proposto che alcune azioni acute dell'EtOH sulla funzione del recettore GABAA potrebbero essere mediate indirettamente dalla secrezione periferica di steroidi neuroattivi indotta in risposta alla stessa somministrazione di EtOH (Morrow et al. 1999; Morrow et al. 2001). La somministrazione di EtOH in acuto infatti aumenta le concentrazioni di AP nel plasma, corteccia cerebrale e nell'ippocampo di ratto (Barbaccia et al. 1999; Morrow et al. 2001; VanDoren et al. 2000). Inoltre il pretrattamento con l'inibitore della 5 α -reduttasi, finasteride, che inibisce la biosintesi della AP, riduce significativamente il grado dell'aumento di AP a livello cerebro-corticale indotto dall'EtOH e previene alcuni effetti comportamentali, elettrofisiologici e neurochimici dell'EtOH (Khisti et al. 2002; VanDoren et al. 2000).

Inoltre è stato suggerito che l'AP influenzi l'azione di rinforzo dell'EtOH (Morrow et al. 2001). Nei topi femmina, nelle quali si riscontra fisiologicamente una maggiore concentrazione cerebrale di AP rispetto ai maschi, è maggiore l'aumento di consumo di EtOH rispetto ai maschi (Sinnott et al. 2002); inoltre il consumo di EtOH nei topi maschi è aumentato somministrando sistemicamente AP; ciò ha anche potenziato nei ratti maschi gli effetti rinforzanti dell'EtOH (Janak et al. 1998). Al contrario, nei ratti femmina l'auto somministrazione di EtOH è stata trovata più bassa durante l'estro, quando la concentrazione di AP è più alta rispetto alle altre fasi del ciclo ovarico (Roberts et al. 1998). I ratti socialmente isolati, nei quali le concentrazioni cerebrali di AP sono marcatamente ridotte consumano elevate quantità di EtOH (Schenk et al. 1990; Wolffgramm 1990).

Si ritiene che la capacità dell'EtOH di promuovere la biosintesi di AP sia dipendente dall'azione stimolatoria della sostanza sull'asse ipotalamo ipofisi surrene (HPA) (Ellis 1966; Khisti et al. 2003; Ogilvie et al. 1997; Rivier 1996; Rivier et al. 1984). Infatti, in ratti che hanno subito una surrenectomia, l'EtOH non è più in grado di aumentare i livelli di AP nel plasma e nel cervello, e nell'indurre alcuni dei suoi effetti farmacologici (Khisti et al. 2003; O'Dell et al. 2004).

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che alcuni effetti dell'EtOH sui recettori GABAA potrebbero essere mediati dagli steroidi neuroattivi prodotti da organi periferici,

in risposta alla attivazione dell'asse HPA. In aggiunta, studi precedenti del nostro laboratorio hanno suggerito che l'EtOH può aumentare le concentrazioni di AP nelle fettine isolate di ippocampo di ratto, in maniera indipendente dall'attività dell'asse HPA. Questo effetto si associa ad una modulazione positiva della funzione dei recettori GABAA, come osservato registrando le correnti post sinaptiche inibitorie in neuroni CA1 in fettine di cervello esposte all'EtOH per 30 min. Questa azione dell'EtOH poteva essere prevenuta con la preincubazione delle fettine di ippocampo con l'inibitore della 5 α -reduttasi finasteride suggerendo che la sintesi locale di AP dal progesterone fosse necessaria per la modulazione positiva del recettore GABAA operata dall'EtOH.

Questa conclusione inoltre è supportata da una serie di esperimenti effettuate in fettine ippocampali da ratti surrenoctomizzati e castrati (ADX-CX). Le concentrazioni di progesterone e pregnanolone plasmatiche e cerebrali si riducono in maniera marcata in animali ADX-CX dopo una settimana dalla operazione chirurgica rispetto ai livelli riscontrati negli animali sham di controllo R. I livelli basali di AP nelle fettine ippocampali isolate di animali ADX-CX si sono ridotti di circa il 40% comparati con quelli sham operated, coerentemente col fatto che le cellule cerebrali continuano a produrre neurosterodi indipendentemente dalla periferia. L'incubazione delle fettine ippocampali degli animali ADX-CX con EtOH 100 mM per 30 min ha indotto un significativo aumento (circa il 65%) nella quantità di AP, un effetto simile a quelli misurato negli animali sham di controllo. Coerentemente con questi risultati, le registrazioni della funzione del recettore GABAA tramite patch clamp da neuroni piramidali dell'area CA1, hanno rivelato che l'EtOH è in grado di aumentare l'ampiezza e il decay time in maniera simile sia nei ratti ADX-CX sia negli sham. Nell'insieme, questi dati suggeriscono che l'EtOH è in grado di elevare biosintesi locale di AP e di potenziare la funzione del recettore GABAA nelle fettine ippocampali, con un meccanismo che appare indipendente dalla steroidogenesi in organi periferici e che potrebbe coinvolgere la regolazione della biosintesi locale de novo dei neurosteroidi a partire dal colesterolo. Coerentemente con le nostre ricerche, l'aumento delle concentrazioni di AP nel plasma non è correlato con i cambiamenti di concentrazione di corticosterone nel plasma, progesterone o AP in ratti trattati con EtOH, suggerendo che le concentrazioni cerebrali e plasmatiche sono regolate differentemente (VanDoren et al. 2000).

Anatomia dell' Ippocampo

La formazione ippocampale include l'ippocampo proprio, il giro dentato e il subiculum. Queste strutture hanno una configurazione semplificata come l'allocorteccia. Questi sono intimamente associati alle strutture periallocorticali (presubiculum, area retrospleniale, parasubiculum e corteccia entorinale) e sono incluse nella formazione ippocampale da certi autori (Chronister and White 1975) . Negli umani le regioni subiculari sono localizzate nell'aspetto mesiale del giro paraippocampale tra la formazione ippocampale e la corteccia entorinale (l'area 28 di Brodmann) sull'aspetto basolaterale del giro paraippocampale (Duvernoy, 1988).

Le subregioni ippocampali

L'ippocampo fu diviso da Lorente de Nò (1934) nelle subregioni CA1, CA2, CA3 e CA4 (CA, Corno d'Ammon). Queste sottoregioni sono state distinte molto più precisamente nel ratto da Blackstad (1956). La CA1 è un'estesa regione di piccoli neuroni piramidali dispersi (nell'uomo) e adiacenti al subiculum. Nel ratto i neuroni piramidali CA1 sono fortemente addensati. La CA2 nell'uomo è una regione distinta tra CA1 e CA3, ed è costituita da grossi neuroni piramidali ovoidali fortemente addensati. Nei ratti la CA2 è più piccola e meno distinta. La CA3 è localizzata nella curva dell'ippocampo dove questo si inserisce nel giro dentato. I neuroni piramidali CA3 sono simili a quelli della regione CA2 ma meno addensati; sono anche distinguibili per la presenza di una forte innervazione delle fibre muscolari provenienti dalle cellule granulari del giro dentato. La regione all'interno della concavità venne chiamata CA4 da Lorente de Nò, ma oggi è comunemente chiamata "ilo". In questa regione sono presenti alcuni grandi neuroni sparsi (Duvernoy, 1988).

Strati

Il subiculum è suddiviso in strato piramidale, dove è disposto il soma delle cellule piramidali, mentre i dendriti sono nello strato molecolare. Le regioni CA dell'ippocampo sono divise in diversi strati. La sovrapposizione delle regioni CA1 e CA2 è rappresentata dall'alveo, un tratto denso contiguo con la fimbria. Lo strato oriens è localizzato tra l'alveo e lo strato piramidale, lo strato dove si trovano i soma delle cellule piramidali. I dendriti basilari delle cellule piramidali si estendono all'interno dello strato oriens. I dendriti apicali

delle cellule piramidali si estendono all'interno dello strato radiato e lacunosum-molecolare (considerati 2 strati da certi autori).

Cellule piramidali

Le cellule piramidali dell'ippocampo sono grandi e triangolari, oppure di forma ovoidale con un insieme di dendriti basilari che si estendono all'interno dello strato oriens e dendriti apicali che emergono da una o due branche prossimali e si estendono all'interno dello strato radiato e dello strato molecolare lacunoso. I corpi sono "impacchettati" a varie densità nello strato piramidale dei vari sottocampi. Lo strato piramidale tende ad essere disperso negli umani, e nei roditori, specialmente nella CA1 (Duvernoy, 1988). L'assone delle cellule piramidali emerge generalmente dalla parte basilare del soma o immediatamente. In CA3 gli assoni si estendono per una vasta rete di collaterali locali verso i neuroni limitrofi, includendo le altre cellule piramidali (Miles e Wong 1986, Ishizuka et al., 1990). Nella zona CA1 le cellule piramidali mandano poche collaterali assonali ai neuroni limitrofi, per di più probabilmente interneuroni (Knowles and Schwartzkroin, 1981 a,b). Queste branche locali si aggiungono alle branche primarie assonali che si estendono verso gli obiettivi delle cellule piramidali trattate in precedenza.

Interneuroni

Oltre le cellule piramidali primarie è presente una ampia varietà di interneuroni. Questi interneuroni sono stati classificati in base alla forma, localizzazione, e neurofisiologia. Tra i tipi di interneuroni vengono incluse le cellule a canestro, localizzate vicino allo strato piramidale che inibisce le cellule tramite sinapsi assosomatica, interneuroni oriens /alveus, interneuroni dello strato lacunoso molecolare, cellule a candelabro, che inibiscono le cellule piramidali nel segmento iniziale dell'assone.

Giro Dentato

Il giro dentato funziona come prima stazione in ingresso della via perforante, una delle maggiori vie che agiscono da input dell'ippocampo. Nel giro dentato, il soma dei neuroni principali, le cellule granulari, sono localizzate nello strato granulare e i loro dendriti si estendono circondando lo strato molecolare. L'ilo si trova all'interno delle lamine (superiore e inferiore) dello strato granulare (Chronister and White 195). Alcuni autori

descrivono una zona dell'ilo poliformica, che corrisponde più o meno alla zona CA4 descritta da Lorente de Nó.

L'ilo contiene una quantità di tipi neuronali, includendo le cellule muscoidi e le cellule piramidali a canestro. Questi neuroni sembrano essere generalmente inibitori, perlopiù contenenti GABA, e una quantità di altri neurotrasmettitori, inclusi somatostatina, VIP (polipeptide vasoattivo intestinale), sostanza P, encefaline, e colecistochinina (Tombol et al 199, Ribak and Seress 1983, Somogy et al 1983 ab, Schlander and Frotscher 1986, Lacaille et al 198, Sloviter and Nilaver 198, Kawaguchi and Hama, 1988, Lacaille and Schwartzkroin 1988 ab, Miles 1990).

Vie afferenti

Gli input verso l'ippocampo consistono in vie provenienti da regioni corticali e subcorticali. L'ippocampo riceve input corticali dall'ippocampo controlaterale, fibre associative da altre regioni ippocampali ipsolaterali, giro dentato, subiculum, e corteccia entorinale. Queste fibre generalmente rilasciano aminoacidi eccitatori e alcune possono corilasciare peptidi. Inoltre, il subiculum riceve input dalla corteccia prefrontale dorso laterale, mentre la corteccia entorinale riceve input da molte regioni incluse la corteccia orbitofrontale, temporale, paraippocampale, tratto bulbo olfattorio, amigdala, setto mediale, nucleo del rafe, talamo, e la regione CA3 dell'ippocampo (Chronister and White 1975, Brodal 1981, Traud and Miles 1991). Va anche ricordato che queste regioni sono interconnesse le une alle altre. La fonte sottocorticale degli input verso l'ippocampo includono il setto, l'ipotalamo, il nucleo del rafe (Chronister and White 1975, Traud and Miles 1991). Questi input tendono ad avere sia un controllo modulatore sulla attività ippocampale, da opposta a diretta. Gli input dal setto verso l'ippocampo contengono acetilcolina (Ach) e GABA, sebbene le fibre del locus coeruleus contengano noradrenalina e le fibre del nucleo del raphe contengano serotonina. Questi neurotrasmettitori tendono ad avere un effetto lento, più tonico, rispetto a quanto fanno gli aminoacidi eccitatori.

La natura funzionale di queste afferenze ippocampali può essere divisa tra differenze corticali e sottocorticali. Gli input dalle varie regioni corticali provvedono alle informazioni sensoriali altamente preprocessate. Gli input modulatori subcorticali riguardano lo stato del background o la modalità dell'attività neurale ippocampale.

Vie intrinseche

Le maggiori vie sinaptiche entro l'ippocampo possono essere divise approssimativamente in circuiti trasversali e lamellari, vie longitudinali, e circuiti locali.

Vie lamellari trisinaptiche

La maggiore via eccitatoria nell'ippocampo entra dalla corteccia entorinale tramite la via perforante attraverso la fessura ippocampale (che separa il giro dentato dall'ippocampo) verso le cellule granulari del giro dentato. Le cellule granulari mandano i loro assoni, le fibre muscoidi, alle cellule piramidali CA3. Una collaterale delle cellule piramidali CA3, la collaterale di Schaffer, si proietta verso le cellule piramidali CA1, le quali poi mandano una branca dei loro assoni indietro, verso la corteccia entorinale. Queste vie tendono a seguire la lamina trasversa dell'ippocampo (Andersen et al. 191; Andersen 195). Queste non sono comunque le uniche vie all'interno dell'ippocampo.

Vie longitudinali

C'è una crescente evidenza dell'importanza delle vie associazionali ipsolaterali entro l'ippocampo (Amaral and Witter, 1989). Primo, la via perforante dalla corteccia entorinale verso le cellule granulari si diffonde per almeno qualche millimetro lungo l'asse setto-temporale dell'ippocampo. Secondo, certi neuroni nell'ilo mandano preferenzialmente per grandi distanze verso le cellule granulari (Hjort-Simonsen and Laurberg, 19, Lauberg and Sorensen 1981). Terzo, le cellule piramidali CA3 mandano estese collaterali associazionali alle cellule CA1 piramidali (Swanson et al 198, Amaral e Witter 1989, Ishizuka et al 1990). Solo le fibre muscoidi sono organizzate in un modello strettamente lamellare.

Circuiti locali

Entro le subregione dell'ippocampo e del giro dentato, gli interneuroni e le cellule principali formano circuiti sinaptici locali, che influenzano la funzione ippocampale in considerevoli modi. Le cellule granulari mandano lunghe collaterali a molti interneuroni, particolarmente le fibre muscoidi, nell'ilo che al loro volta creano contatti con altri interneuroni dell'ilo e cellule granulari (Hjort-Simonsen and Laurber, 19, Scharfman et al., 1990). Le cellule piramidali CA3 hanno estese locali collateralizzazioni assonali ed eccitano le cellule CA3 limitrofe e interneuroni inibitori (Miles and Wong, 1986; Ishizuka et al., 1990; Miles, 1990). Gli interneuroni in CA3 inibiscono le cellule piramidali e gli altri interneuroni (Miles and Wong, 1984). Dentro la zona CA1, i neuroni piramidali

mandano collaterali assonali eccitatorie a diverse classi di interneuroniche inibiscono le cellule piramidali e gli altri interneuroni (Knowles and Schwartzkroin 1981 a,b; Lecaille et al 1987).

Altre vie

Ogni ippocampo manda fibre all'ippocampo controlaterale attraverso le commissure ventrali e dorsali. Le cellule piramidali in CA1 e CA3 mandano fibre nella regione omotopica controlaterale. In più, la zona CA3 manda fibre incrociate al CA1 opposto e CA3 manda fibre al dentato controlaterale. L'importanza della connessione commisurale nei primati è molto ridotto in confronto con le altre specie (Gottlieb and Cowan, 193 , Chronister and White , 195, Lieb et al., Demeter et al 1990).

Inoltre le via perforante, una porzione della proiezione dalla corteccia entorinale verso l'ippocampo innerva CA1 e CA3 direttamente (Lorente de Nò, 1934, Doller and Weight, 1982, Witter and Groenewegen, 1984, Yeckel and Berger 1990). Questa via è monosinaptica e parallela rispetto alla classica via trisinaptica dalla corteccia entorinale alle cellule granulari CA3 verso le CA1 ,descritte sopra.

Vie efferenti

Il maggiore output dall'ippocampo è formata dagli assoni che partono dalle cellule piramidali CA1. Queste proiettano al subiculum, corteccia entorinale, nucleo del setto laterale, bulbo olfattivo, nucleo accumbens amigdala e ipotalamo. Le proiezioni dall'ippocampo verso la corteccia entorinale e il subiculum forniscono vie indirette alle aree neocorticali temporale, sensoriale e associazionale, come all'amigdala talamo e corpi mamillari. L'area CA3 proietta al nucleo del setto laterale, includendo fibre piramidali e non piramidali. Le proiezioni settali delle cellule piramidali CA1 e CA3 sono particolarmente dense (Swanson et al 1987, Saunders et al 1988, Van Groen and Wyss 1990, Traub and Miles 1991).

Obiettivi della tesi

Lo stress è comunemente ritenuto un fattore rilevante per l'abuso di alcool e per lo sviluppo della dipendenza da alcool. Molti studi infatti dimostrano una stretta relazione causale tra stress e dipendenza da alcool e suggeriscono che lo stress possa rappresentare un fattore di aumentata vulnerabilità al suo iniziale utilizzo, così come nel trattamento della dipendenza e nella recidiva. L'interazione fra stress e alcool potrebbe essere mediato, almeno in parte, da diversi sistemi di neurotrasmissione in discrete aree cerebrali così come da fattori endocrini come l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Il modello di isolamento sociale nei roditori è un modello di stress cronico in uso da diversi anni nel nostro laboratorio, mediante il quale è possibile valutare; l'interazione fra stress ed EtOH, così come il ruolo degli steroidi neuroattivi e le alterazioni sul sistema di neurotrasmissione mediato dal GABA, in principale neurotrasmettitore del SNC. L'isolamento sociale, in corrispondenza dello svezzamento degli animali, è una condizione che può indurre un'ampia varietà di alterazioni comportamentali, neurochimiche, ed ormonali che possono permanere anche in età adulta. Nei topi del ceppo C57 BL/6 J sottoposti a stress cronico mediante isolamento sociale per 6 settimane a partire dal PND21, abbiamo valutato, è l'attività motoria tramite motility meter. Mediante tecniche elettrofisiologiche, gli effetti dell'EtOH, somministrato in differenti modalità, sulla funzione delle sinapsi inibitorie GABAergiche in diverse popolazioni neuronali dell'ippocampo e del giro dentato. In particolare, è stato valutato l'effetto della somministrazione acuta di EtOH sulle correnti postsinaptiche inibitorie GABAergiche spontanee sia potenziali d'azione dipendenti (sIPSCs) che indipendenti (mIPSCs). Tale effetto è stato valutato nei neuroni piramidali dell'area ippocampale CA1 e nei neuroni granulari del giro dentato. Sono state inoltre studiate le due componenti inibitorie, la componente fasica e quella tonica (solo nei neuroni del giro dentato). Abbiamo valutato inoltre l'effetto dell'isolamento sociale e dell'EtOH sull'eccitabilità neuronale e sulla induzione dell'LTP.

Somministrazione cronica di EtOH tramite inalazione: dopo esposizione cronica di EtOH tramite inalazione di vapori, è stata valutata la variazione delle correnti post sinaptiche inibitorie spontanee potenziali d'azione dipendenti (sIPSCs) in cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo e in cellule piramidali del nucleo centrale dell'amigdala di topi di controllo e di topi sottoposti a 45 giorni di isolamento sociale. Successivamente al trattamento sono state studiate sia le caratteristiche basali delle sIPSC nei differenti gruppi

sperimentali sia l'effetto dell'agonista parziale THIP sulla corrente tonica registrata nei neuroni granulari del giro dentato dell'ippocampo.

Inoltre al fine di valutare se in condizioni stressanti (isolamento sociale) vi sia un aumento del consumo di EtOH, abbiamo utilizzato il protocollo dell'isolamento sociale dei topi per 45 giorni durante i quali gli animali erano liberi di assumere EtOH per due ore al giorno, a abbiamo valutato in cellule granulari di giro dentato la variazione sulla corrente fasica e tonica rispetto a topi di controllo.

Materiali e Metodi

Animali

I topi maschi e femmine utilizzati nei miei esperimenti appartengono al ceppo C75BL/6J, di età compresa tra 60-90 giorni, con peso corporeo di circa 22-29 gr. Dopo l'arrivo allo stabulario, i topi sono stati lasciati ambientare per almeno una settimana e quindi sono state costituite delle "famiglie" formate da due femmine ed un maschio, che non vengono mai separate. Gli animali sono stati mantenuti con un ciclo di luce-buio di 12 ore, alla temperatura di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidità del 65% costanti, con la disponibilità ad libitum di acqua e cibo. La cura ed il trattamento degli animali, durante tutte le procedure sperimentali, sono stati eseguiti in accordo con le Direttive del Consiglio della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC), ed i protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato Etico per gli Animali dell'Università degli Studi di Cagliari.

Isolamento sociale

Gli animali da esperimento sono stati ottenuti dalle cucciolate nate nei nostri stabulari. Il protocollo sperimentale dell'isolamento sociale nei topi maschi C57BL/6J da me seguito prevedeva un trattamento della durata di sei settimane consecutive (Fig. 7.).

Al giorno dello svezzamento (Post Natal Day 21th [PND21]), è stata eseguita la suddivisione degli animali in due gruppi sperimentali:

- a) Mantenuti in gruppi di 4-6 per gabbia (GROUP-HOUSED o GH);
- b) Mantenuti in isolamento in gabbie singole (ISOLATED o SI).

Inoltre, in certi esperimenti, ciascuno di questi due gruppi è stato ulteriormente suddiviso in due ulteriori sottogruppi.

Tra gli animali group-housed sono stati creati due gruppi sperimentali, di cui:

1. Un gruppo beveva soltanto acqua (due bottiglie contenenti solo acqua);
2. Un gruppo beveva acqua ed EtOH (scelta fra una bottiglia con acqua ed una con 15% EtOH).

Allo stesso modo, all'interno del gruppo di animali isolati sono stati creati due gruppi sperimentali, di cui:

1. Un gruppo beveva soltanto acqua; (due bottiglie contenenti solo acqua);
3. Un gruppo beveva acqua ed EtOH; (scelta fra una bottiglia con acqua ed una con 15% EtOH).

Questi quattro gruppi sperimentali sono stati così distinti al fine di valutare il consumo individuale e volontario di EtOH tra animali isolati e animali stabulati in gruppo, le eventuali differenze dei livelli della sua assunzione tra questi, nonché l'eventuale preferenza dei diversi gruppi di animali nei confronti dell'EtOH.

Il paradigma sperimentale prevedeva l'esposizione degli animali all'EtOH per un tempo giornaliero di 2 ore, con inizio 30 mi prima della fase di buio e 1.5 h al buio, avendo cura di disporre gli animali group-housed di controllo in gabbie singole durante queste due ore per poter meglio valutare il loro consumo individuale di fluidi assunti in tale arco di tempo. Durante la prima settimana si è proceduto alla somministrazione di EtOH edulcorato con saccarosio (sucrose fading procedure), al fine di favorire nell'animale il consumo volontario di EtOH rispetto a quello dell'acqua. In questa prima settimana le quantità di saccarosio disciolte insieme all'EtOH sono state così ripartite:

	EtOH	Saccarosio
Giorni 1 - 2	10%	5%
Giorni 3 - 4	12.5%	5%
Giorni 5 - 6	15%	5%
Giorni 7 - 8	15%	/

Dalla seconda settimana invece, il trattamento è proseguito con la somministrazione di EtOH al 15% disciolto esclusivamente in acqua.

In queste cinque settimane di trattamento gli animali sono quindi stati esposti ogni giorno per due ore al consumo volontario di EtOH, avendo la possibilità di scegliere tra due bottiglie diverse, una contenente EtOH e una contenente esclusivamente acqua. Le bottiglie di acqua ed EtOH venivano scambiate di posizione nella gabbia in modo da evitare il fenomeno di abitudine nell'animale nei confronti di una posizione particolare nella gabbia.

In un'altra serie di esperimenti, i topi C57BL/6J socialmente isolati e quelli stabulati in gruppo durante gli ultimi 4 giorni della procedura dell'isolamento sociale sono stati esposti a vapori di EtOH tramite camere da inalazione (La Jolla Alcohol Research Inc., San Diego, CA) seguendo le procedure standard del consorzio INIA-Stress (NIAAA) per l'esposizione cronica all'EtOH tramite inalazione e testando la dipendenza in modo da ottenere concentrazioni stabili di sangue (BECs) di circa 150-180 mg/dl.

I topi sono stati sottoposti ad un programma giornaliero che consisteva in una esposizione ai vapori di EtOH per 16 ore "on" seguite da 8 ore "off" (solo inalazione di aria), ripetuto per 4 giorni.

Al fine di garantire che nella camera da inalazione la tensione di EtOH fosse costante, sono stati prelevati dei campioni di aria tramite una siringa da 60 ml, attraverso uno sportello nella camera superiore e analizzati subito tramite un EtOH-meter digitale. Le concentrazioni di EtOH sono state espresse come mg/litro di aria. All'inizio di ogni ciclo di esposizione, l'intossicazione con l'EtOH era preceduta da una somministrazione di 1.6 g/kg di EtOH (8% w/v) in associazione con un'iniezione di pirazolo (1 mmol/kg) un inibitore della alcool deidrogenasi, in modo da bloccare il metabolismo dell'EtOH e raggiungere quindi valori ematici elevati. Tutte le iniezioni i.p. sono state eseguite in un volume di 0.02 ml/g di peso corporeo. Allo stesso tempo i topi di controllo (esposti alla sola aria) hanno ricevuto una iniezione di soluzione fisiologica al posto del pirazolo. In seguito, dopo il sacrificio dell'animale, sono stati raccolti dei campioni di sangue.

La BEC è stata determinata allo spettrofotometro mediante la misurazione dell'assorbanza a 340 nm, misurando la quantità di NAD ridotto in NADH prodotto dall'ossidazione dell'alcool. La BECs è stata espressa come mg/dl di sangue.

Valutazione dell'attività motoria mediante utilizzo del Motility Meter

Alla fine del periodo di isolamento, sia i topi stabulati in gruppo (GH) che quelli socialmente isolati (SI), sono stati posizionati all'interno delle celle del motility meter, e monitorati per 60 minuti.

L'attrezzatura del Motility Meter è costituita da una serie di gabbie collegate ad un computer che registra i diversi parametri relativi all'attività loco motoria spontanea.

Nei box utilizzati (420 x 420 mm) si registrano gli spostamenti dell'animale nelle tre coordinate spaziali X, Y e Z tramite cellule ad infrarossi disposte in numero di 16 per ognuno dei tre assi.

Complessivamente, sono stati registrati i seguenti parametri:

- attività generalizzata e relativo tempo
- attività orizzontale e relativo tempo
- attività verticale e relativo tempo
- tempo passato in immobilità
- distanza totale percorsa

Quindi, come già accennato in precedenza gli animali sono posti singolarmente nelle gabbie e qui lasciati per un periodo stabilito (60 minuti) al termine dei quali i topi vengono riposti nelle gabbie di appartenenza e i box vengono puliti accuratamente prima dell'introduzione dei successivi animali.

Preparazione delle fettine coronali di ippocampo

Dopo anestesia tramite inalazione di cloroformio, l'animale viene sacrificato e l'encefalo viene rapidamente rimosso e immerso in una soluzione cerebrospinale artificiale ghiacciata (*ACSF solution*, 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) per quanto riguarda gli esperimenti di registrazione dei potenziali di campo o in soluzione di taglio ghiacciata (*Cutting Solution* contenente: saccarosio 220 mM, KCl 2 mM, NaH₂PO₄ 1.3 mM, NaHCO₃ 2.6 mM, glucosio 10 mM, MgSO₄ 12 mM, CaCl₂ 0.2 mM, pH 7.3 saturato con 95% O₂ / 5% CO₂) per quanto riguarda gli esperimenti di patch-clamp. Per la preparazione di fettine di ippocampo, asportata la corteccia prefrontale e il cervelletto, l'encefalo viene posto nella camera di taglio di un vibratomo (Leica VT1200S) e immerso nella medesima soluzione di taglio costantemente ossigenata. Solitamente si ottengono, da ciascun encefalo, 3-4 fettine coronali di ippocampo dello spessore di circa 300-400 µm.

Le fettine vengono successivamente incubate nella soluzione cerebrospinale artificiale (ACSF) per 45 minuti, a 34°C, e successivamente vengono incubate a temperatura ambiente per altri 30 minuti prima di effettuare la registrazione elettrofisiologica.

Registrazione elettrofisiologica mediante la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell

Le fettine di ippocampo vengono trasferite in una camera di registrazione costantemente perfusa con ACSF ad una velocità di circa 2 ml/min a temperatura ambiente. Le registrazioni elettrofisiologiche di patch clamp in modalità whole-cell sono eseguite utilizzando un amplificatore Axopatch 200-B (Axon Instruments, Union City, CA) e un microscopio a raggi infrarossi collegato ad una telecamera a infrarossi.

I microelettrodi per patch (capillari di borosilicato; Sutter Instruments, Novato, CA, con filamento interno; OD 1.5 µm), preparati in due step utilizzando un puller verticale (Sutter Instruments), hanno una resistenza di 4-6 MW quando riempiti con una soluzione interna contenente: CsCl 140 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1 mM, EGTA 10 mM, HEPES 10 mM, ATP-Na₂, pH 7.3 con CsOH 5N.

Una volta ottenuta la configurazione whole-cell, applicando una suzione all'estremità dell'elettrodo e lacerando il patch di membrana sottostante l'elettrodo, la resistenza d'accesso è di solito compresa tra 20-40 MΩ, e se questa varia durante l'esperimento di un valore superiore al 20% di quello iniziale, i dati di quella cellula vengono automaticamente scartati.

Le correnti attraverso l'amplificatore del patch clamp sono filtrate a 2 kHz, digitalizzate a 5.5 kHz, e analizzate con il software pClamp 8.2 (Axon Instruments). Per l'analisi grafica e matematica di tutti i parametri delle correnti sono stati utilizzati due software: Clampfit (Axon Instruments) e Mini Analysis 5.4.17 (Synaptosoft, Decatur, GA).

Analisi dell'attività spontanea. Le correnti postsinaptiche inibitorie spontanee (sIPSCs)

Lo studio dell'attività spontanea e la sua analisi sono stati effettuati mediante l'utilizzo del programma "Minianalysis" (Synaptosoft), che permette l'identificazione dei picchi di corrente e l'analisi dei diversi parametri cinetici (ampiezza, area, rise time, decay time, frequenza). L'acquisizione dei dati è stata effettuata mediante l'uso del programma PClamp8.01 (Axon Instruments). I picchi visualizzati sono caratteristici per le correnti sinaptiche entranti (inward) di ioni positivi e uscenti (outward) di ioni negativi, per cui entrambe presentano dei picchi rivolti verso il basso.

I picchi reali si distinguono dai picchi generati dal rumore di background grazie al valore minimo (threshold) di area imposto. L'impostazione dei parametri del tempo permette l'identificazione dei picchi indipendentemente dalla loro forma. I parametri impostati permettono di stabilire: 1) l'ampiezza minima, 2) l'area minima, 3) il numero di punti che permettono di stabilire il punto massimo del picco, 4) il valore di linea di base prima del picco, 5) il valore medio della linea di base, 6) il tempo di decadimento del picco.

La sequenza delle operazioni che permette il rilevamento del picco è composta da diverse fasi: 1) la ricerca del valore massimo, 2) la ricerca della linea di base, 3) l'ampiezza è confrontata con il valore soglia imposto dai parametri, 4) il calcolo della durata del picco, 5) il calcolo del tempo di decadimento, 6) l'area è calcolata e confrontata con il valore soglia imposto nei parametri.

Analisi delle correnti Toniche

La misura dell'attività tonica GABAergica è stata eseguita registrando da cellule granulari del giro dentato di ippocampo in assenza ed in presenza dell'agonista preferenziale dei recettori extrasinaptici THIP. Alla soluzione ACSF è stato aggiunto acido kinurenico (3 mM) per bloccare le correnti ionotropiche glutammatergiche. Come si può notare dalla figura 9, l'attività GABAergica è stata bloccata con l'uso di bicucullina (20-30 μ M). Per valutare le modificazioni della corrente tonica abbiamo misurato la variazione del noise (rumore di fondo) e la variazione della holding current (linea di base) in condizione di controllo e in presenza dei farmaci. Questi due parametri sono degli indici di attivazione dei recettori GABA_A extrasinaptici.

Registrazioni elettrofisiologiche extracellulari dei potenziali di campo

Per le registrazioni extracellulari ho posizionato il microelettrodo di borosilicato di vetro (resistenza da 3 a 6 M Ω), riempito con una soluzione di NaCl (4 M), in corrispondenza dei dendriti dei neuroni piramidali della regione CA1. La stimolazione delle afferenze eccitatorie (collaterali di Shaffer provenienti dai dendriti dell'area CA3) viene effettuata usando un elettrodo stimolatore (solitamente un elettrodo bipolare concentrico) posizionato approssimativamente a 300 μ m dal sito di registrazione.

L'attivazione delle afferenze glutammatergiche ai neuroni piramidali CA1, mediante l'elettrodo stimolatore, genera dei potenziali di campo evocati e registrati attraverso l'elettrodo di registrazione. La stimolazione elettrica delle fibre afferenti determina il rilascio di glutammato che a sua volta induce l'attivazione di recettori AMPA e l'insorgenza di un fEPSP (field Excitatory Post Synaptic Potential); quest'ultimo è causato dalla depolarizzazione sincronizzata della

popolazione neuronale che si trova in prossimità dell'elettrodo registrante. Quando l'elettrodo registrante viene posizionato a livello dell'albero dendritico la risposta che viene registrata è direzionata verso il basso ed viene definita field potential (fEPSP) o appunto potenziale di campo. Questo tipo di attività elettrica ha una durata di circa 10-20 msec e un'ampiezza di circa 1 mV che solitamente corrisponde a circa il 50% della risposta massima ottenibile aumentando l'intensità di stimolazione. Tutte le registrazioni sono state effettuate usando un amplificatore Axoclamp 2B e poi sono state analizzate utilizzando il software pClampfit 8.01(Axon Instruments®). Per la valutazione della risposta sono stati misurati tramite un programma di analisi grafica, Clampfit 9.2, associato pClamp. I parametri misurati sono stati lo "slope", rappresentante la pendenza della risposta, l'ampiezza, espressa in mV e l'area sottesa dalla traccia. Quest'ultimo parametro risulta vantaggioso e accurato quando, all'aumentare dell'intensità dei segnali presinaptici delle fibre afferenti si osserva un parallelo aumento dei population spikes, derivanti dalla comparsa di potenziali d'azione a livello del soma cellulare e segmento iniziale. La difficoltà nella precisa analisi e quantificazione dei population spikes mi ha indotto anche a valutare l'area sottesa dalla traccia, un parametro che dipende fortemente dalla comparsa di queste componenti nelle risposte postsinaptiche.

RISULTATI

Effetto dell'isolamento sociale sull'attività locomotoria spontanea.

Uno degli effetti comportamentali più caratteristici e riproducibili indotti dall'isolamento sociale nei roditori è un'alterazione del comportamento locomotorio e esploratorio spontaneo (Valzelli 1974). Per valutare se anche nelle nostre condizioni sperimentali l'isolamento sociale nei topi C57BL/6J si associasse a tali modifiche, è stata misurata l'attività locomotoria spontanea degli animali; la misurazione è stata effettuata sottoponendo gli animali al test del Motility Meter in campo aperto, un test di valutazione dell'attività motoria spontanea. I nostri risultati mostrano che l'isolamento sociale nei topi una riduzione dell'attività locomotoria rispetto agli animali mantenuti in gruppo (Fig-1). Infatti, la distanza totale percorsa (Total distance, figura 1f), l'attività orizzontale (Horizontal activity, figura 1 a) e il tempo speso in movimento (Movement time, figura 1d) risultano diminuiti in maniera significativa negli animali isolati rispetto agli animali group-housed; in accordo con questo dato, il tempo di inattività (Rest time figura 1g) risulta essere maggiore negli animali isolati rispetto agli animali group-housed.

L'effetto dell'isolamento sociale sul consumo volontario di EtOH.

Al fine di determinare se l'isolamento sociale potesse essere accompagnato da un aumentato consumo volontario di EtOH, abbiamo esposto i topi al libero accesso al consumo di EtOH per due ore giornaliere, durante tutto il periodo di isolamento di sei settimane. I dati relativi al consumo volontario di EtOH sono stati espressi misurando i grammi di EtOH o acqua consumati, per kg di peso corporeo, dagli animali dei due gruppi sperimentali (ISO e GH), nelle due ore giornaliere durante le quali gli animali erano esposti alla libera scelta fra EtOH (15%) e acqua da due differenti bottiglie (Figura 2a). La figura 2a infatti riporta la media giornaliera del consumo di EtOH (15%), nelle 5 successive settimane di isolamento, in comparazione con gli animali stabulati in gruppo; la preferenza del consumo di EtOH rispetto all'acqua è evidente già dalla seconda settimana, quando gli animali sono stati esposti per la prima volta ad una soluzione al 15% di EtOH, ed si mantiene più o meno costante sino alla fine del periodo di isolamento.

Più in particolare, i valori medi giornalieri di consumo per ciascuno dei due gruppi sperimentali mostrano un consumo di EtOH superiore per gli animali isolati rispetto agli animali GH di quasi 1 g infatti i topi ISO hanno consumato in media durante le 5 settimane 4.18 ± 0.12 g/kg per due ore, mentre gli animali di controllo hanno consumato in media 3.45 ± 0.07 g/kg (Fig. 2f). Se stimato in percentuale, questo aumento risulta essere superiore del 20% per gli animali isolati rispetto ai controlli, suggerendo quindi che l'isolamento sociale degli animali influisce positivamente sul consumo volontario di EtOH (Fig. 2f).

Come atteso l'isolamento ha indotto anche un aumento della preferenza dell'EtOH rispetto all'acqua. Come già descritto in letteratura (Belknap et al., 1993; Phillips and Crabbe, 1991; Yoneyama et al., 2008), i topi C57BL/6J hanno una spontanea preferenza per l'EtOH (Fig. 2e), ma questo effetto è significativamente maggiore ($p < 0.01$) nei topi socialmente isolati rispetto agli animali GH (Fig. 2f). Questa evidenza è ulteriormente supportata dall'analisi statistica delle cinque settimane di trattamento in cui questa preferenza, calcolata per ogni gruppo sperimentale come rapporto acqua o EtOH consumati durante le due ore di esposizione giornaliera rispetto al fluido totale (water or EtOH intake vs. total fluid intake), risulta ancora più evidente (Fig. 2b).

L'effetto dell'isolamento sociale sull'eccitabilità neuronale e induzione dell'LTP nella regione CA1 dell'ippocampo

Studi precedenti hanno riportato che l'isolamento sociale nei roditori altera l'eccitabilità dei circuiti neuronali ippocampali (Bartesaghi, 2004), un effetto associato a deficit di memoria, così come ad una diminuita performance nel test water maze” di Morris (Bianchi et al., 2006; Lu et al., 2003). Al fine di valutare gli effetti dell'isolamento sociale nei topi C57BL/6J sulla eccitabilità ippocampale, abbiamo registrato i potenziali postsinaptici eccitatori di campo (fEPSPs) nella regione CA1 sia nei topi stabulati in gruppo che nei topi isolati, stimolando con un elettrodo bipolare coassiale le fibre glutammatergiche di Schaffer. Le curve input/output hanno rivelato che il valore dell'intensità della stimolazione capace di evocare il 50% della risposta massima è risultato significativamente ($p < 0.05$) maggiore nei topi isolati (0.50 ± 0.04 mA, $n = 7$) rispetto agli animali stabulati in gruppo (0.38 ± 0.03 mA, $n = 6$). Lo spostamento a destra della curva I/O ottenuta con la stimolazione delle fettine ippocampali di animali isolati

rispetto a quelle di animali group-housed, suggerisce quindi che l'isolamento determina una riduzione delle risposte eccitatorie a livello dell'ippocampo (Fig. 3a).

Il fenomeno di potenziamento sinaptico a lungo termine (LTP) studiato nell'ippocampo di roditori è stato studiato in maniera estesa e si conoscono alcuni dei meccanismi molecolari che ne sono alla base (Peter V. Massey and Zafar I. Bashir.). Questo fenomeno può essere indotto in seguito ad una stimolazione ad alta frequenza (HFS), la quale promuove un massiccio rilascio di glutammato dalle fibre afferenti ed una conseguente attivazione dei recettori AMPA e NMDA postsinaptici. L'ingresso di calcio attraverso i recettori NMDA e attraverso l'apertura dei VGCCs (che si attivano durante intensa depolarizzazione) permette di indurre modificazioni a lungo termine dell'attività sinaptica.

L'LTP è stato indotto nella regione CA1 tramite HFS che consiste di un singolo treno di 100 stimoli a 250 Hz a livello delle fibre afferenti di Schaffer.

L'entità del potenziamento delle risposte postsinaptiche (LTP), calcolato dalla media dei valori degli slope degli fEPSP registrati dal minuto 50 al 60 dopo HFS, era significativamente ($p < 0.01$) ridotto nei topi isolati rispetto ai topi di controllo.

Effetto dell'EtOH sull'induzione di LTP in topi isolati e di controllo.

Recenti evidenze hanno dimostrato che la perfusione delle fettine di ippocampo con EtOH in presenza di basse dosi di un neurosteroido come l'allopregnanolone aumentava drammaticamente gli effetti dell'EtOH stesso. Questo dato suggerisce che il sistema GABAergico riveste un ruolo fondamentale negli effetti combinati di EtOH e neurosteroidi nel controllo della plasticità sinaptica a livello di importanti aree cerebrali come l'ippocampo (Morrisett et al., 1993; Izumi et al., 2007). Ora è chiaro che, diverse forme di plasticità neuronale, includendo il potenziamento a lungo termine (LTP), (Durand and Carlen, 1984; Sinclair and Lo, 1986; Mulkeen et al., 1987; Swartzwelder et al., 1988; Blitzer et al., 1990) sviluppo neuronale (Streissguth et al., 1978; West et al., 1981), e l'induzione-espressione di risposte epilettiformi (Grant et al., 1990; Morrisett et al., 1990; Cohen et al., 1991) sono state viste alterare dall'esposizione di EtOH. Sulla base di queste evidenze sperimentali, abbiamo voluto valutare gli effetti di concentrazioni

relativamente basse di EtOH (40 mM) sull'induzione di LTP nella'area CA1, e verificare se potessero esserci differenze nell'azione dell'EtOH sul controllo dell'eccitabilità e la plasticità sinaptica a livello dell'ippocampo in topi SI e GH. Dopo una perfusione di aCSF per 10 min , c'è stata la perfusione di EtOH 40 mM per 10 min, seguita da una stimolazione ad alta frequenza. Quindi abbiamo visto che nei successivi 60 min di registrazione, l' EtOH 40 mM causa una diminuzione del valore di LTP sia nei topi GH che SI (Fig. 3b,c,d). Il risultato dimostra però che l'effetto dell'EtOH è statisticamente significativo nei topi SI ma non in quelli GH di controllo. In accordo con precedenti lavori pubblicati dai nostri laboratori (Sanna et al 2004) la maggiore inibizione dell'LTP ad opera dell'EtOH osservato nei topi isolati potrebbe essere spiegato da un maggior effetto steroidogenico dell'EtOH al livello centrale negli animali sottoposti a SI. Infatti, questo aumento dell'azione neurosteroidogenica dell'EtOH negli animali isolati si traduceva in una maggiore azione modulatoria positiva della neurotrasmissione GABAergica nelle cellule piramidali CA1. Il nostro dato quindi potrebbe essere spiegato con un maggiore aumento dell'attività inibitoria indotta dall'aumento di neurosteroidi sintetizzati in risposta alla perfusione di EtOH osservato nei SI rispetto agli animali di controllo. Questa ipotesi potrà essere testata in esperimenti futuri utilizzando la finasteride, un inibitore dell'enzima 5alfa-reduttasi, che converte il progesterone in neurosteroidi attivi sui recettori GABAA.

Effetto acuto dell'EtOH sulle correnti fasiche e toniche nell'ippocampo di topi isolati e di controllo

Durante una fase successiva abbiamo valutato le proprietà basali delle correnti spontanee GABAergiche e l'effetto della perfusione di EtOH (60 mM). In particolare, abbiamo analizzato le possibili variazioni dei parametri basali delle mIPSC nelle cellule piramidali CA1 dei topi isolati rispetto a quelli di controllo.

I parametri che sono stati analizzati sono stati l'ampiezza delle correnti, , il decay time, la frequenza e l'area; questo è stato valutato sia per quanto riguarda i topi stabulati in gruppo, che i topi socialmente isolati. Dalla figura (Fig. 4a,b,c) si può vedere come questi parametri non risultino variati in maniera statisticamente significativa tra i due gruppi sperimentali.

Quindi abbiamo valutato l'effetto della perfusione di EtOH (60 mM) per 30 minuti, e calcolato i diversi parametri in periodi di 10 minuti. Per quanto riguarda l'ampiezza delle correnti, non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi sperimentali, nel corso dei 30 minuti totali di applicazione del farmaco. Lo stesso dato è risultato per quanto riguarda il decay time, sia al 10° , che e al 20° e 30° minuto di applicazione dell'EtOH, così come avviene per la frequenza. Al contrario, l'area delle correnti GABAergiche risultava differente tra i due gruppi sperimentali, poiché mentre nei topi GH l'area è decresciuta nel corso dell'applicazione del farmaco nell'arco dei trenta minuti di perfusione, rispetto al periodo di controllo, mentre nei topi SI c'è stato un aumento di questo parametro (Fig 4d).

In seguito abbiamo valutato quale fosse l'effetto della perfusione in acuto di EtOH per 30' sulla corrente tonica. Quindi abbiamo valutato in cellule granulari di giro dentato come variasse la corrente tonica tra i due gruppi sperimentali, sempre con una applicazione di EtOH 60 mM per 30 minuti. Per quanto riguarda lo shift della holding current (μ) non ci sono state differenze significative tra i due gruppi sperimentali, per tutta la durata della somministrazione del farmaco. Lo stesso può essere ripetuto per quanto riguarda la noise variance (σ), calcolata sempre per i due gruppi.

Effetto dell'inalazione di vapori di EtOH sulla corrente tonica GABAergica in topi C57BL/6J isolati e di controllo

Abbiamo quindi esaminato successivamente le possibili variazioni della trasmissione GABAergica nelle cellule granulari di giro dentato (DG) usando fettine ippocampali ottenute da animali SI e GH esposti a vapori di EtOH o alla sola aria. Le cellule granulari del giro dentato sono caratterizzate da una consistente corrente tonica GABAergica mediata dai recettori extrasinaptici GABAA composti dalle subunità $\alpha 4$, βn , e δ (Nusser and Mody, 2002) e, in proporzione minore dai recettori extrasinaptici contenenti la subunità $\alpha 5$ (Glykys et al., 2008).

Dopo una registrazione di circa tre minuti di baseline, le fettine sono state esposte all'agonista preferenziale THIP (3 μ M): attraverso questa tecnica è stato possibile misurare e valutare le eventuali variazioni dei diversi parametri utilizzati per studiare le correnti toniche nei diversi gruppi sperimentali, in modo da potenziare la componente tonica e renderlo più facilmente misurabile (Brown et al., 2002; Drasbek and Jensen,

2006), che, perfuso per 6 minuti, genera un potenziamento della corrente tonica con un significativo aumento della noise variance e dello shift della baseline.

L'esposizione, delle cellule granulari in fettine di topi stabulati in gruppo, al THIP ha aumentato la variazione del noise della corrente, e ha aumentato la holding current rispetto alla linea di base. La successiva applicazione di bicucullina (30 μ M) ha bloccato tutte le correnti GABAergiche e ha ridotto sia la variazione del noise sia la holding current rispetto alla linea di base (Fig 5b-d).

In topi socialmente isolati che non sono stati esposti ai vapori di EtOH, l'applicazione di THIP ha indotto un significativo ($p < 0.05$) aumento del noise, ma non una modificazione in senso negativo della holding current, comparata agli animali stabulati in gruppo (Fig 5a). I parametri della corrente tonica non sono aumentati in maniera significativa in animali stabulati in gruppo ed esposti ai vapori di EtOH . In topi socialmente isolati esposti ai vapori di EtOH, l'effetto del THIP sia sul noise che sulla holding current non era statisticamente diverso in comparazione ai topi stabulati in gruppo che non sono stati esposti ai vapori di EtOH (5a- c).

L'effetto del consumo volontario di EtOH nei topi SI e GH sulla corrente tonica e fasica nelle cellule granulari del giro dentato.

Abbiamo quindi esaminato successivamente le possibili variazioni della trasmissione GABAergica nelle cellule granulari di giro dentato (DG) usando fettine ippocampali ottenute da animali SI e GH, che consumavano solo acqua, e da SI e GH che consumavano EtOH .

Anche in questo caso dopo una registrazione di circa tre minuti di baseline, le fettine sono state esposte al THIP:

L'esposizione, delle cellule granulari delle fettine dei topi stabulati in gruppo, al THIP ha aumentato la variazione del noise della corrente, e ha modificato in senso negativo la holding current rispetto alla linea di base. Ho quindi studiato la funzione dei recettori GABAA di tipo extrasinaptico che sono deputati a mediare le correnti toniche inibitorie nelle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo. La successiva applicazione di bicucullina (30 μ M) ha bloccato tutte le correnti GABAergiche e ha ridotto sia la

variazione del noise e la holding current comparata alla linea di base (Fig 6b-d). In topi socialmente isolati che avevano a disposizione solo acqua l'applicazione di THIP ha indotto in un significativo ($p < 0.05$) aumento della variazione del noise e una grande modificazione in senso negativo della holding current, comparata agli animali stabulati in gruppo (Fig 6a). I parametri della corrente tonica sono aumentati in maniera significativa in animali stabulati in gruppo, che hanno consumato EtOH. In topi socialmente isolati che hanno consumato EtOH, l'effetto del THIP sia sul noise che sulla holding, sebbene aumenti ancora, non è stato statisticamente diverso in comparazione ai topi stabulati in gruppo che bevevano acqua (6a- c).

L'analisi delle proprietà cinetiche delle correnti post sinaptiche inibitorie (IPSCs) registrate da IPSCs spontanei registrati in cellule granulari dai diversi gruppi sperimentali non ha rivelato differenze statisticamente significative nell'ampiezza e nel decay time (Fig. 7a, b,c) : al contrario, abbiamo trovato un significativo aumento ($p < 0.05$) (36%) nella frequenza sIPSCs (Fig. 7d), nei topi che si autosomministravano EtOH durante il periodo di isolamento, comparato ai topi stabulati in gruppo che venivano esposti soli all'acqua.

I dati ottenuti mettono in evidenza un significativo effetto del consumo volontario di EtOH negli animali isolati nella frequenza delle sIPSC rispetto al valore dei controlli. Al contrario, non ho rilevato variazioni statisticamente significative negli altri parametri cinetici (ampiezza, tempo di decadimento) delle sIPSC nelle cellule granulari dei diversi gruppi sperimentali.

Discussione

Tra i diversi obiettivi di questo studio ci eravamo riproposti di valutare se l'isolamento sociale successivo allo svezzamento nei topi C57BL/6J potesse rappresentare un utile modello di abuso di EtOH mediante il quale poter permettere di spiegare l'analisi dei meccanismi molecolari e neurochimici coinvolti nell'interazione tra stress ed EtOH. In accordo con i risultati di altri studi condotti sul ratto (Hall et al., 1998; Schenk et al., 1990) e sui topi C57BL/6J (Advani et al., 2007; Lopez et al., 2010 ; Yanai and Ginsburg, 1976) i nostri risultati hanno mostrato che i topi del medesimo ceppo esposti al protocollo di libera scelta di consumo di EtOH durante un isolamento di 6 settimane, hanno assunto volontariamente quantità maggiori di EtOH rispetto agli animali stabulati in gruppo e hanno mostrato un aumento della preferenza per l'EtOH rispetto all'acqua, comparata agli animali di controllo. L'aumento dell'autosomministrazione di EtOH che abbiamo riscontrato nei nostri studi, è stato apprezzabile già durante la seconda settimana di trattamento, quando i topi sono stati esposti alla scelta tra acqua e una soluzione al 15% di EtOH, suggerendo che questi giovani animali presentano un livello di stress, dovuto all'isolamento dai loro simili, che è sufficiente per aumentare la loro suscettibilità all'EtOH già nel primo periodo di isolamento. In linea con questa osservazione, lo stress neonatale indotto dalla "maternal separation", di solito effettuata durante le prime due settimane di vita, induce un aumentato consumo di EtOH nel ratto adulto (Gustafsson and Nylander, 2006; Huot et al., 2001; Ploj et al., 2003; Roman et al., 2005) e nel topo (Cruz et al., 2008). D'altra parte, Lopez e collaboratori (Lopez et al., 2010) hanno dimostrato che se i topi sono stati mantenuti in isolamento durante la loro vita adulta, questi consumeranno quantità simili di EtOH rispetto agli animali che sono stati stabulati in gruppo. Complessivamente questi risultati suggeriscono che l'isolamento post-svezzamento dei topi maschi C57BL/6J è un modello idoneo di eccessiva autosomministrazione di EtOH che è utile per studiare ulteriormente i meccanismi molecolari e neurochimici coinvolti nell'interazione tra stress nelle prime fasi della vita, e abuso di EtOH nella età adulta.

Alterazioni di un numero di risposte comportamentali, includendo l'attività locomotoria ed il comportamento esploratorio, causati dall'isolamento sociale sono stati estensivamente riportati in topi e ratti (Arndt et al., 2009; Fone and Porkess, 2008; Pietropaolo et al., 2008; Voikar et al., 2005). Nel nostro studio, topi socialmente isolati hanno mostrato una ridotta attività motoria, in un ambiente a loro nuovo, comparati agli animali stabulati in gruppo. I nostri risultati differiscono da quelli dove l'isolamento sociale nei topi provoca iperattività motoria (Pietropaolo et al., 2008). Comunque altri autori hanno riportato modifiche deboli o nulle in questa misura (Arndt et al., 2009; Voikar et al., 2005), mentre altri (Valzelli et al., 1974) hanno riportato una riduzione della attività motoria simile al nostro studio. Le ragioni di tale variabilità nei cambiamenti nell'attività motoria in risposta all'isolamento sociale non sono al momento conosciuti.

Come osservato nel laboratorio della prof. ssa Serra, la concentrazione ippocampale di $3\alpha,5\alpha$ -TH PROG in topi socialmente isolati C57BL/6J è diminuita, sempre in accordo con gli studi precedenti, mostrando simili effetti nella corteccia cerebrale, e nel plasma sia in topi (Matsumoto et al., 1999) che ratti (Serra et al., 2000). Il libero accesso all'EtOH di entrambi i gruppi sperimentali dei topi, sia quelli stabulati in gruppo che quelli che sono stati isolati singolarmente tendono ad ridurre leggermente la concentrazione ippocampale di $3\alpha,5\alpha$ -TH PROG anche se questa differenza non è stata statisticamente rilevante. Quindi la nostra iniziale ipotesi che l'aumento di consumo di EtOH e la preferenza dell'EtOH potesse riportare i livelli stazionari di steroidi neuroattivi nell'ippocampo dei topi socialmente isolati ai livelli dei GH è stata smentita. Questo risultato è in accordo con un recente studio di un nostro gruppo, molto simile, effettuato però sui ratti, nel quale i livelli cerebrocorticali di $3\alpha,5\alpha$ -TH PROG sono rimasti diminuiti nei ratti socialmente isolati che hanno avuto libero accesso all'EtOH (Pisu et al., 2010).

Tuttavia, nello stesso studio è stato dimostrato che il consumo volontario di EtOH ha abolito l'ipersensibilità degli animali socialmente isolati verso un nuovo stress acuto come dimostrato dall'attenuazione dell'aumento nelle concentrazioni cerebrocorticali di $3\alpha,5\alpha$ -TH PROG indotto da foot shock stress (Pisu et al., 2010).

L'analisi elettrofisiologica degli fEPSP registrati nella regione ippocampale CA1 dei topi socialmente isolati ha rivelato che l'isolamento sociale ha causato lo spostamento

verso destra della relazione I/O comparata agli animali stabulati in gruppo, suggerendo che l'isolamento è associato con una diminuita eccitabilità neuronale. I nostri dati sono in accordo con gli altri studi che mostrano cambiamenti simili nella regione CA1 nelle cavie (Bartesaghi, 2004). Una ridotta eccitabilità neuronale è in linea con i dati che mostrano un diminuito grado di LTP indotto da HFS nella regione CA1 degli animali socialmente isolati, trovato nella nostra ricerca così come in altri studi (Roberts and Green, 2003). D'altra parte, una ridotta eccitabilità neuronale e una diminuita plasticità sinaptica potrebbero essere rilevanti per il ridotto apprendimento e deficit di memoria che sono stati riportati negli animali socialmente isolati, sia topi C57BL/6J (Voikar et al., 2005) sia ratti (Bianchi et al., 2006; Lu et al., 2003).

In accordo con le precedenti osservazioni nel ratto (Pisu et al., 2010; Serra et al., 2006) lo stress indotto da isolamento sociale ha indotto alterazioni nell'espressione genica delle subunità che formano il recettore GABAA nell'ippocampo dei topi C57BL/6J, vale a dire ha aumentato l'espressione genica sia della subunità $\alpha 4$ e δ e ha diminuito l'espressione della subunità $\gamma 2$ senza cambiamenti nella $\alpha 1$, come è stato visto nel laboratorio del prof. Follesa.

La scoperta, fondamentale di questo studio è stata che l'autosomministrazione di EtOH nei topi socialmente isolati blocca selettivamente l'aumento nella espressione genica della subunità $\alpha 4$ ma non della δ e della $\gamma 2$ indotto da isolamento sociale. L'azione specifica dell' EtOH sulla subunità $\alpha 4$ potrebbe essere correlata all'azione ansiolitica. In accordo con l'ipotesi della subunità $\alpha 4$ sia stata associata con un aumento dell'ansia, (Smith et al., 1998b) e la soppressione della sua espressione previene l'astinenza da steroidi endogeni (Smith et al., 1998a). Inoltre l'aumento dell'espressione genica della subunità $\alpha 4$ del recettore GABAA indotta dall'astinenza indotta da EtOH potrebbe essere bloccata da sia il trattamento con diazepam, o con GHB , acido gamma idrossibutirrico, durante l'astinenza (Follesa et al., 2003). I risultati del nostro studio hanno anche mostrato che il consumo di EtOH ha indotto cambiamenti nella espressione del recettore GABAA nei topi stabulati in gruppo, in particolare riducendo l'abbondanza della subunità $\gamma 2$ ippocampale e aumentando l'espressione della subunità δ . Questi effetti molecolari sono in accordo con l'espressione delle subunità del GABAAR sia nei livelli di mRNA, sia nei livelli di proteine nelle varie regioni cerebrali (Grobin et al., 2000). In accordo abbiamo precedentemente dimostrato che il trattamento cronico con l'EtOH nei neuroni ippocampali ha indotto un marcato aumento nell'espressione genica della

subunità δ mentre c'è una diminuzione della espressione della subunità $\gamma 2$ (Follesa et al., 2005), senza influenzare l'abbondanza di $\alpha 4$ (Matthews et al., 1998), che è stata aumentata solo dopo astinenza da EtOH (Sanna et al., 2003). Quindi i nostri risultati hanno dimostrato che le bevute volontarie di EtOH nei topi socialmente isolati hanno un'influenza selettiva sulla subunità $\alpha 4$ e non può antagonizzare la up-regulation della subunità δ e la down-regulation della $\gamma 2$, corentemente con l'osservazione che l'EtOH in cronico in sé porti all'up-regulation della subunità δ e alla down-regulation della subunità $\gamma 2$ (Follesa et al., 2005; Sanna et al., 2003).

I risultati hanno rivelato che in associazione con l'aumento dell'espressione della subunità $\alpha 4$ and δ nell'ippocampo dei topi isolati c'è un potenziamento nella modulazione sulla corrente tonica GABAergica indotta dell'agonista THIP, registrata nelle cellule granulari di giro dentato. Tale effetto è coerente con le scoperte precedenti nel nostro laboratorio su ratti isolati (Serra et al., 2006), suggerendo ulteriormente che lo stress da isolamento sociale induce un potenziamento dell'espressione dei recettori GABAA responsabili della componente tonica dell'inibizione GABAergica in questa popolazione neuronale. Inoltre, abbiamo visto che l'autosomministrazione di EtOH sembra produrre un debole effetto sull'aumento di tale corrente tonica negli animali isolati. Infatti, in questi topi SI che consumavano EtOH, l'effetto del THIP sulle correnti toniche è risultato lievemente ridotto rispetto all'effetto dello stesso agonista misurato in cellule granulari di giro dentato di topo socialmente isolato che consumava solo acqua, e non era statisticamente significativo in confronto al gruppo di controllo dei topi stabulati in gruppo. Dato che il consumo volontario di EtOH nei topi socialmente isolati è in grado di prevenire l'aumento dell'espressione della subunità $\alpha 4$, ma non quello della δ , l'attenuazione nella corrente tonica potrebbe essere dipendente dalla questo effetto regolatorio dell'EtOH dell'espressione della subunità $\alpha 4$. D'altra parte, il marcato aumento nella corrente tonica indotta dal THIP osservata nelle cellule granulari di giro dentato di topi stabulati in gruppo che si autosomministrano EtOH potrebbe essere collegato alla aumentata espressione della sola subunità delta, suggerendo ancora una volta che l'autosomministrazione volontaria di EtOH regola selettivamente l'espressione di entrambi i geni e la funzione dei recettori contenenti $\alpha 4/\delta$.

L'autosomministrazione volontaria di EtOH nei topi socialmente isolati si associa anche ad un selettivo aumento della frequenza delle sIPSCs mediate dai recettori GABAA sinaptici nelle cellule granulari di giro dentato, un effetto coerente con una aumentata probabilità di rilascio di GABA dalle afferenti. Un numero di studi effettuati in

diverse zone cerebrali hanno riportato in maniera consistente che l'applicazione di EtOH influisce sul rilascio presinaptico di GABA (Ariwodola and Weiner, 2004; Carta et al., 2003; Roberto et al., 2003; Sanna et al., 2004), e osservazioni più recenti suggeriscono che questo effetto possa coinvolgere un aumento dei livelli di calcio all'interno dei terminali presinaptici derivante dai compartimenti intracellulari conseguente all'attivazione delle vie adenilato ciclasasi/PKA- e PLC/PKC-dipendenti (Kelm et al., 2008; Kelm et al., 2010). Nel nostro studio, inoltre le fettine ippocampali sono state perfuse in acuto con EtOH, ma contrariamente a quanto visto precedentemente non sono stati notati effetti sulla cinetica, quindi nessuna variazione tra i due gruppi sperimentali per quanto riguarda frequenza, decay time, ampiezza e area. A differenza a quanto riportato prima, sono stati valutate le mIPSCs in cellule piramidali di giro dentato.

L'analisi della ampiezza e del decay time costante, delle correnti post sinaptiche inibitorie fasiche spontanee (sIPSCs), registrate nelle cellule granulari di giro dentato non hanno rivelato alterazioni significative in risposta all'isolamento sociale o alla autosomministrazione di EtOH, nonostante la down-regulation dell'espressione della subunità $\gamma 2$ in questa popolazione cellulare. Queste scoperte sono simili a quelle fatte in altri studi dove la downregulation dell'espressione della subunità $\gamma 2$ durante il ciclo ovarico (Maguire et al., 2005) e durante la gravidanza (Maguire and Mody, 2008; Sanna et al., 2009) non sono stati accompagnati da cambiamenti nei parametri della cinetica delle correnti sinaptiche. In conclusione i risultati del nostro studio suggeriscono che l'assunzione volontaria di EtOH potrebbe esercitare la sua azione ansiolitica a livello molecolare grazie al blocco selettivo dell'espressione della subunità $\alpha 4$ del recettore GABAA, il quale è stato associato all'aumento degli stati d'ansia (Smith et al., 1998b).

Figure

Figura 1a

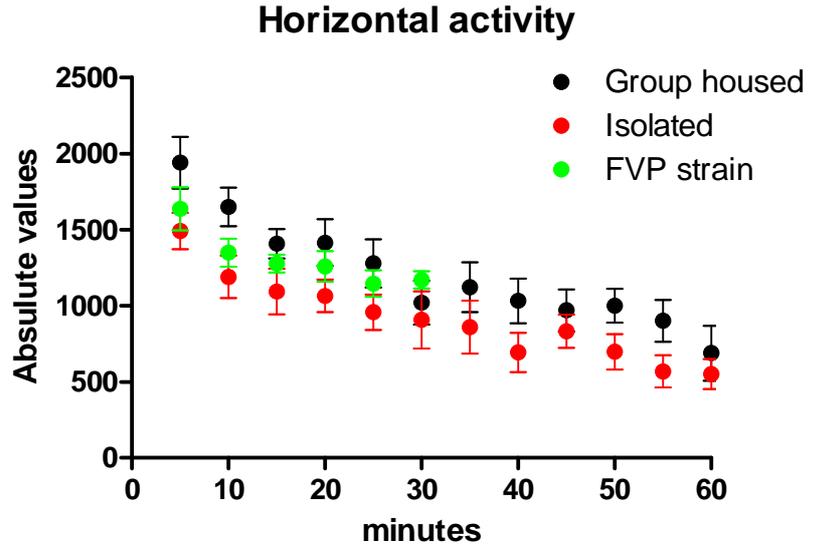


Figura 1b

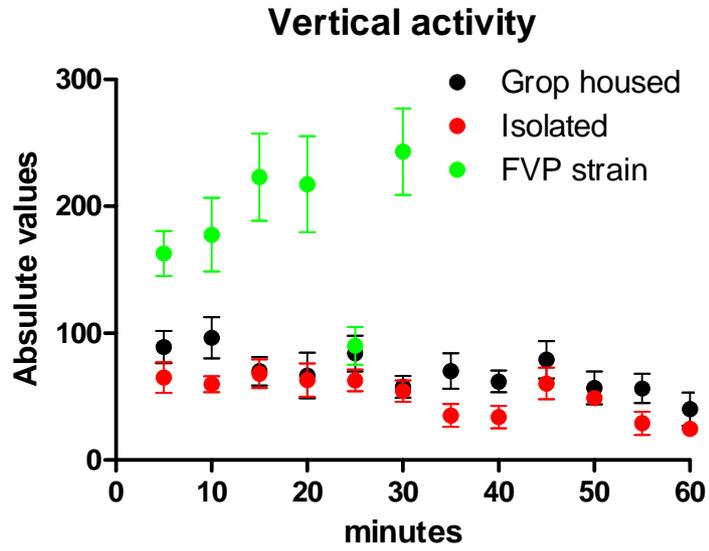


Figura 1c

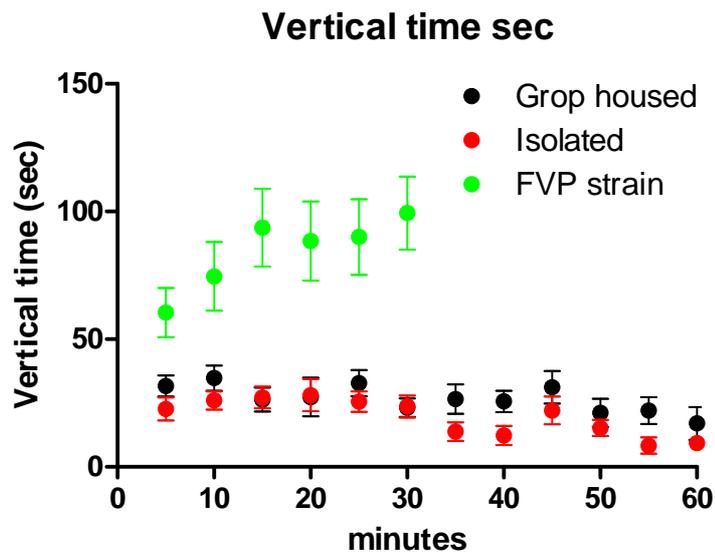


Figura 1d

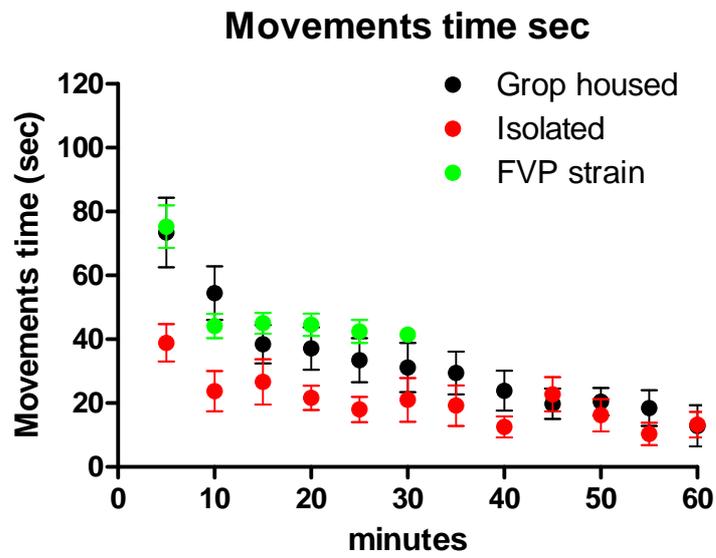


Figura 1e

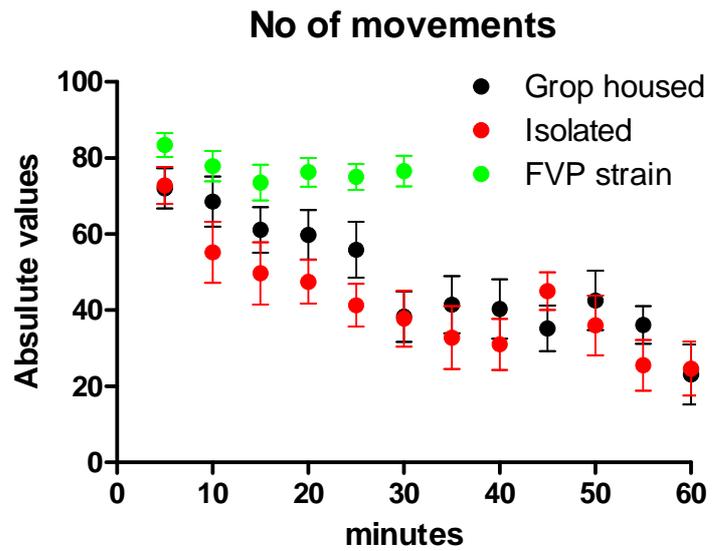


Figura 1f

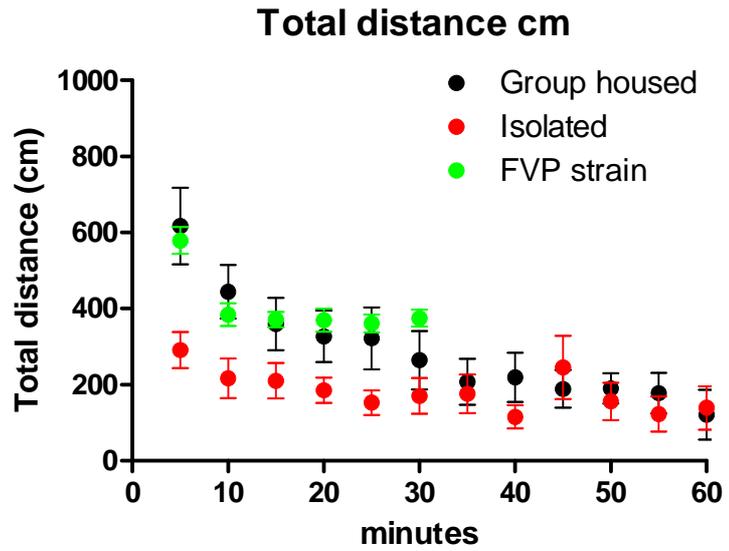


Figura 1g

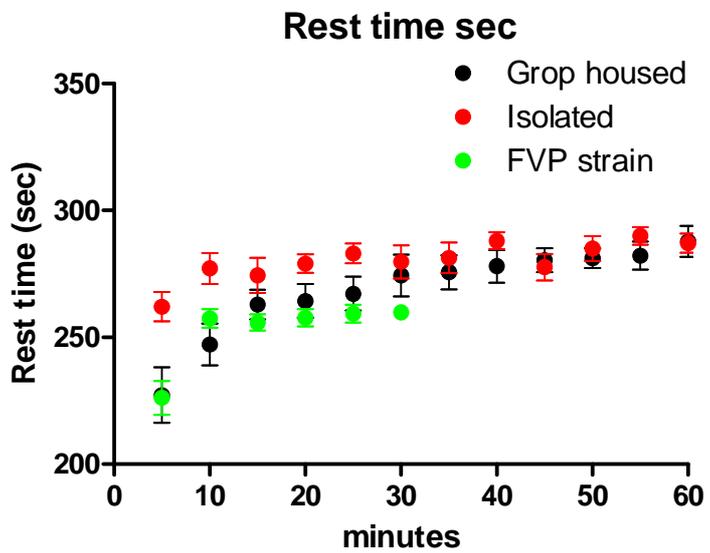


Figura 1h

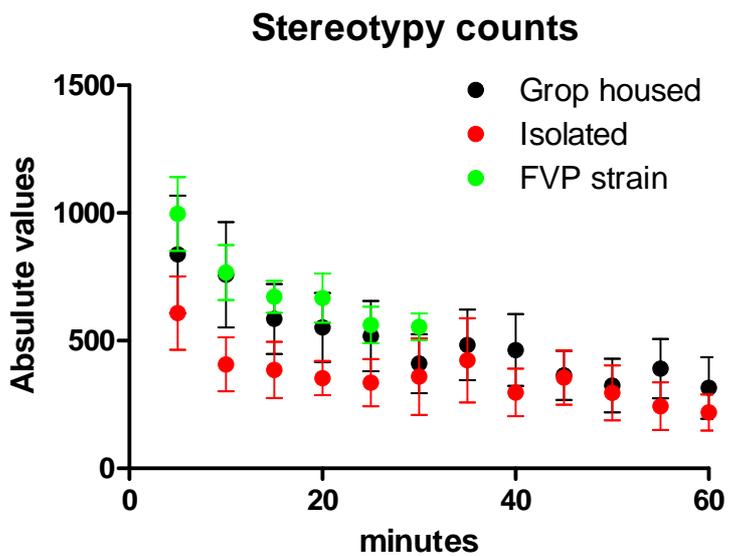


Figura 1i

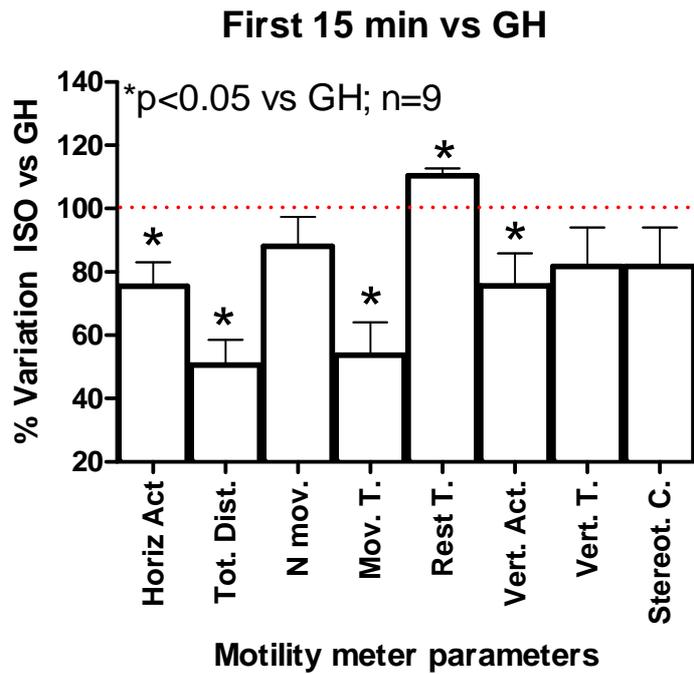
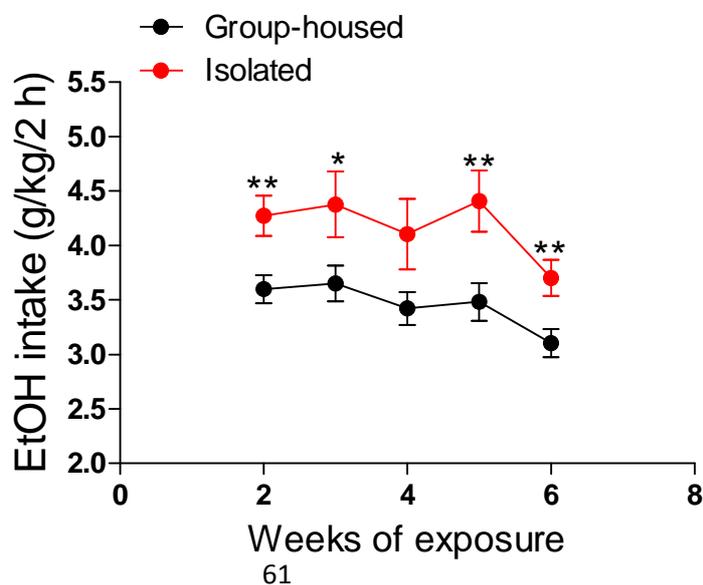


Fig 1. Attività locomotoria spontanea in topi C57BL/6J SI e GH. L'attività motoria è stata valutata dopo un periodo di isolamento di sei settimane. I diversi parametri dell'attività motoria sono stati calcolati tramite bin di 5 minuti, per 60 minuti di seguito. I dati in grafico, riportano le medie \pm S.E.M (n = 9 per gruppo) dei valori assoluti per quanto riguarda i diversi paramtri (1 a- h). Invece in grafico 1i riassume l'effetto dell'isolamento sociale sull'attività locomotoria, misurata nei primi 15 minuti. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. della percentuale vs i topi GH. $P < 0.05$ vs. animali GH.

Fig. 2

Figura 2a



*p < 0.05; **p 0.01 vs. GH (n = 40)

Figura 2b

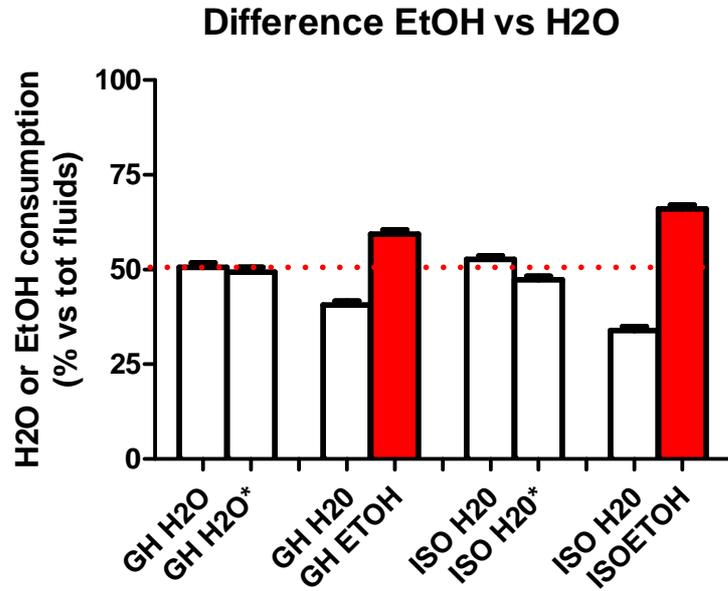


Figura 2c

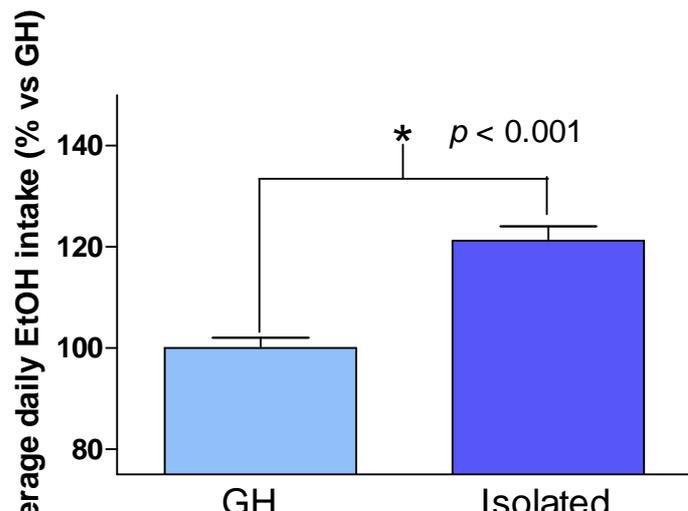
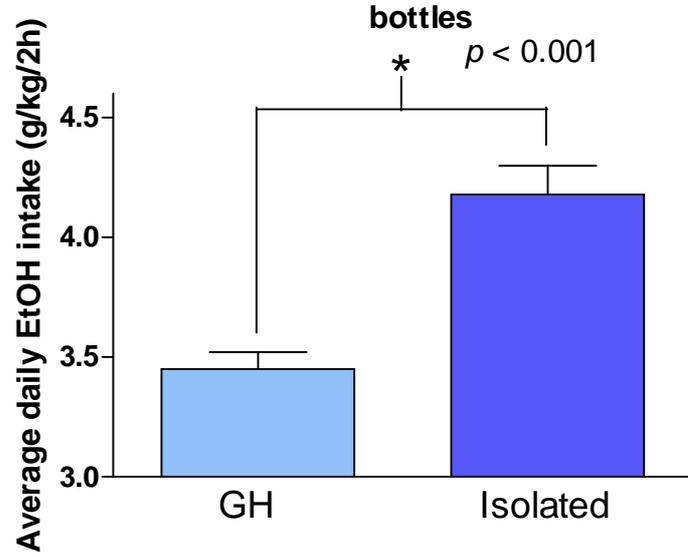


Figura 2d

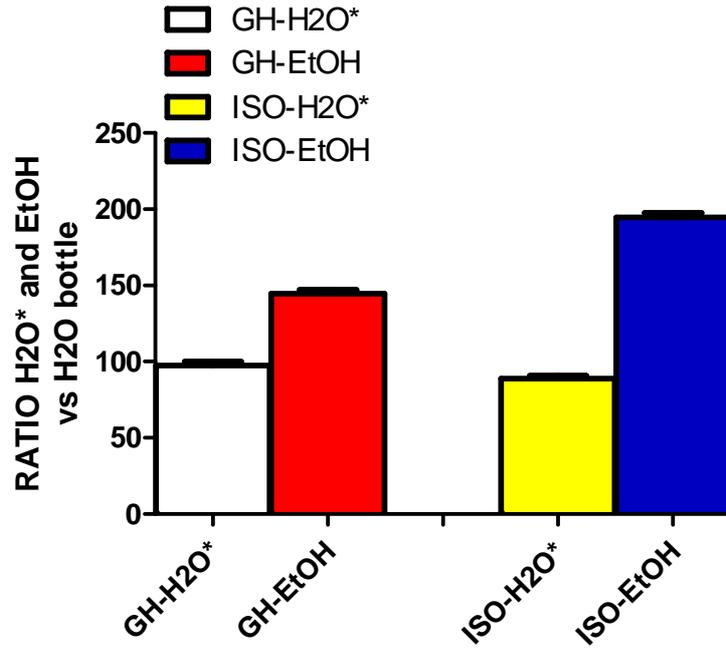


Figura 2e

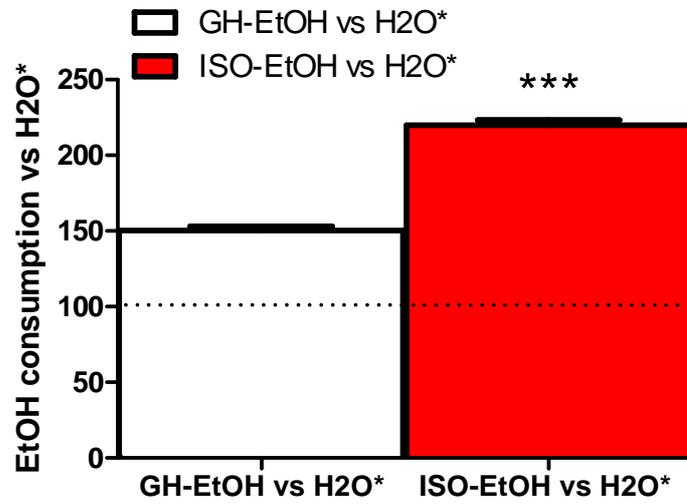


Figura 2f

Figura 2. Effetto dell'isolamento sociale sull'auto somministrazione volontaria di EtOH e preferenza. Il grafico mostra l'assunzione giornaliera di EtOH sia dei topi SI e GH, durante le 5 settimane di esposizione alla soluzione di EtOH al 15%. Preferenza dell'EtOH dei topi GH e SI; il grafico mostra la percentuale di EtOH autosomministrato settimana dopo settimana rispetto il totale del fluido consumato. Il grafico mostra la percentuale di acqua o EtOH rispetto al fluido totale consumato durante l'intero periodo di 5 settimane. *P < 0.05; **P < 0.01; *** P < 0.001 vs. GH (n= 22 per ogni gruppo di animali)

Fig 3

Figura 3a

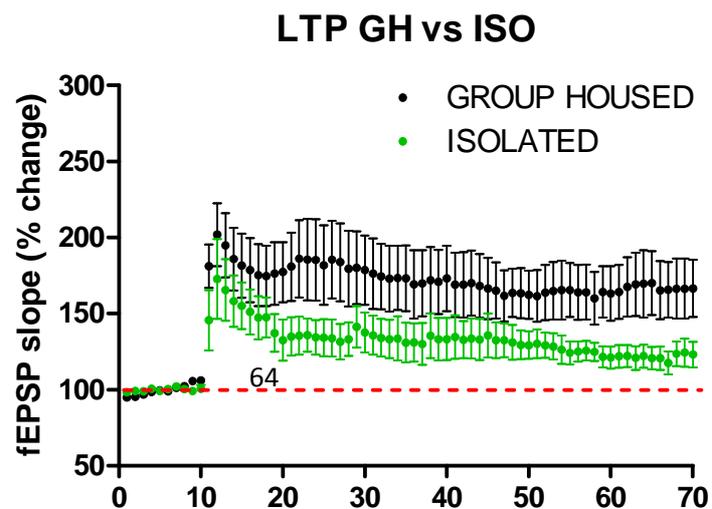
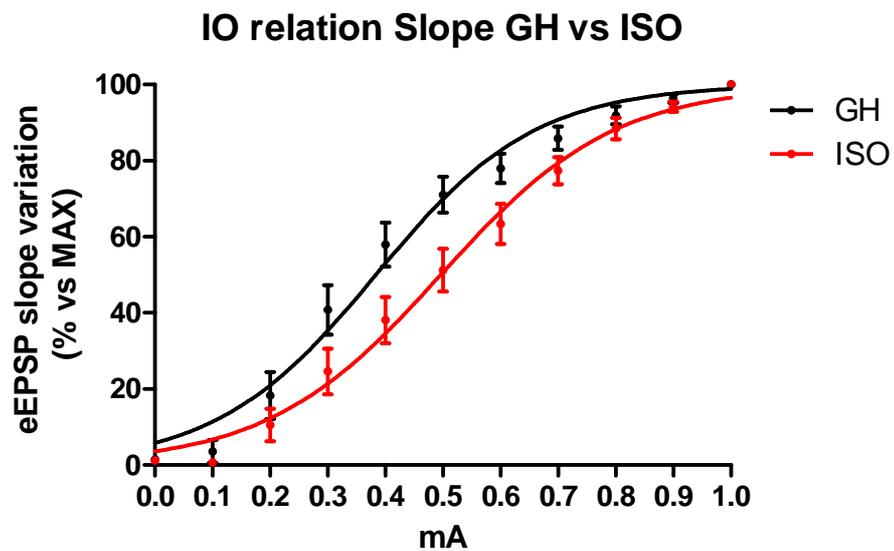


Figura 3b

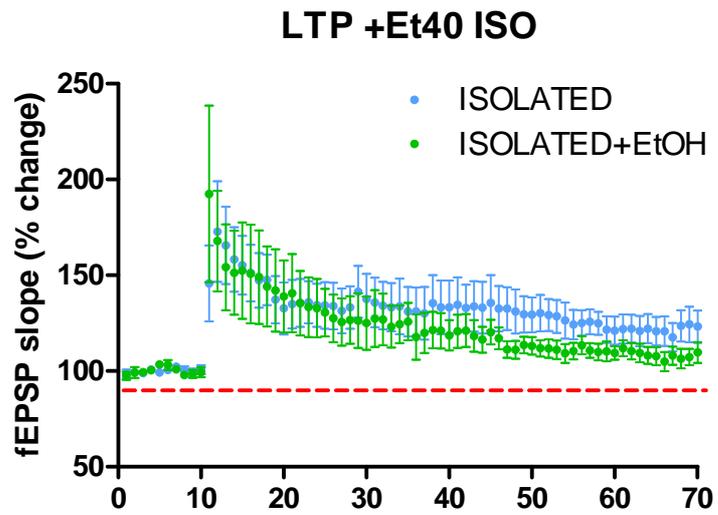


Figura 3c

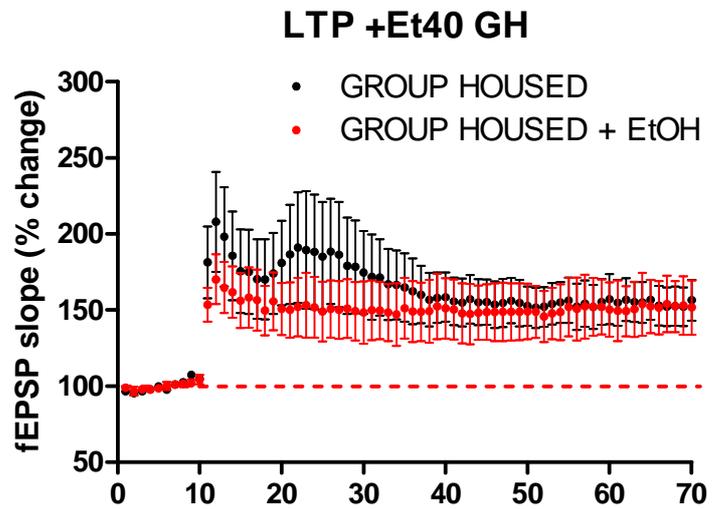


Figura 3d

Figura 3e

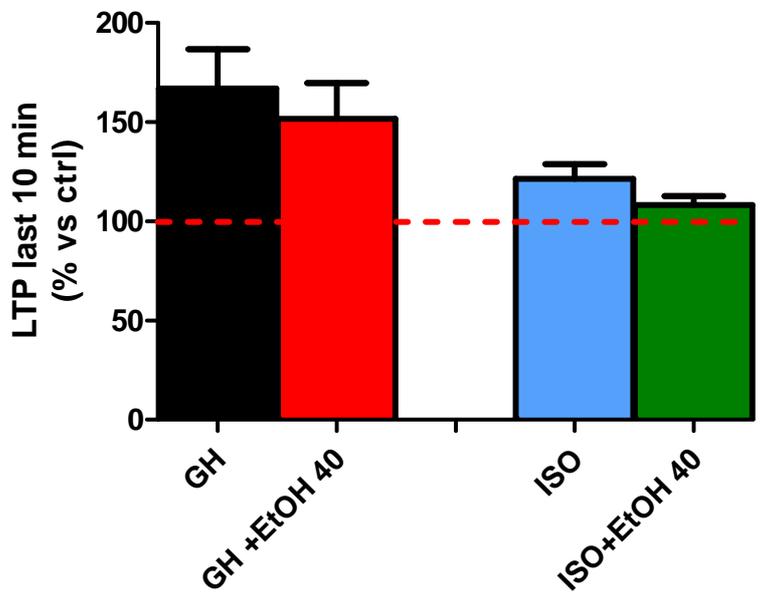


Figura 3f

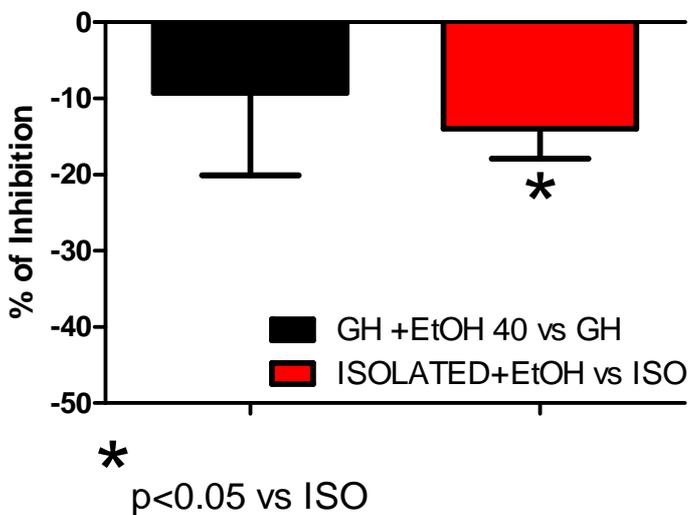


Figura 3. Effetto dell'isolamento sociale sull'eccitabilità ippocampale e induzione dell' LTP nei topi C57BL/6J. I potenziali di campo EPSPs (fEPSPs) sono stati registrati nella regione dendritica CA1 di fettine ippocampali ottenute da animali GH e SI. Relazione Input/out; le curve sono state costruite misurando lo slope dei fEPSP in risposta a una crescente intensità (da 0 a 1.0 mA). I dati espressi sono la media \pm S.E.M. della percentuale della risposta massima. LTP è stato indotto nella regione CA1 tramite HFS della collaterale di Schaffer. I dati rappresentano il cambiamento in percentuale nei valori dello slope indotto da HFS rispetto

la line adi base. Il grafico illustra la misura dell' LTP calcolata dal cambiamento percentuale dello slope durante il periodo da 50 a 60 minuti dopo HFS. $P < 0.01$ vs. GH (n = 11 - 14).

Fig 4

Figura 4a

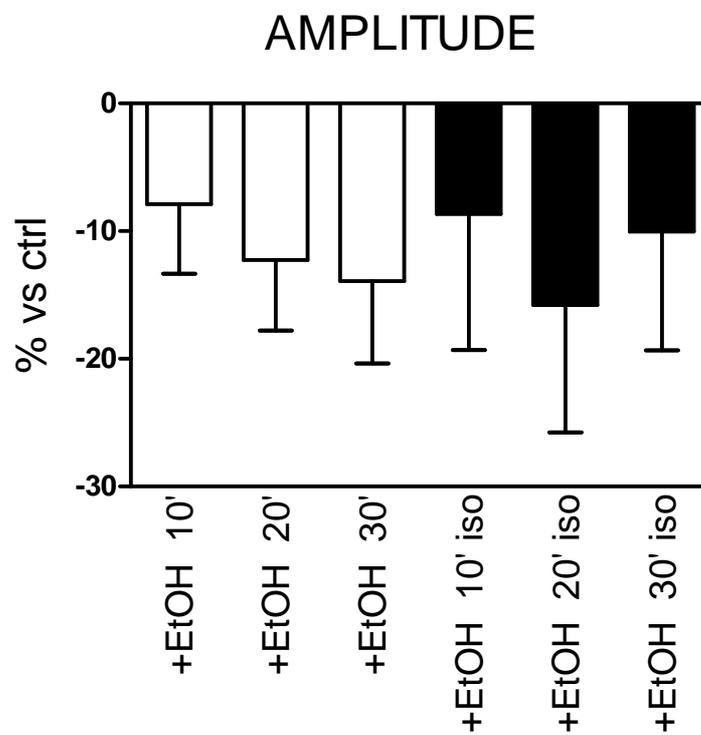
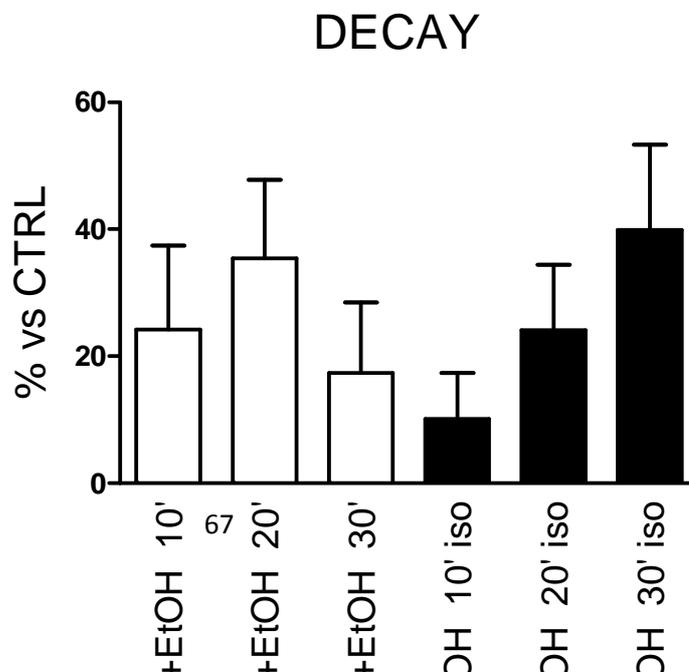


Figura 4b



FREQUENCY

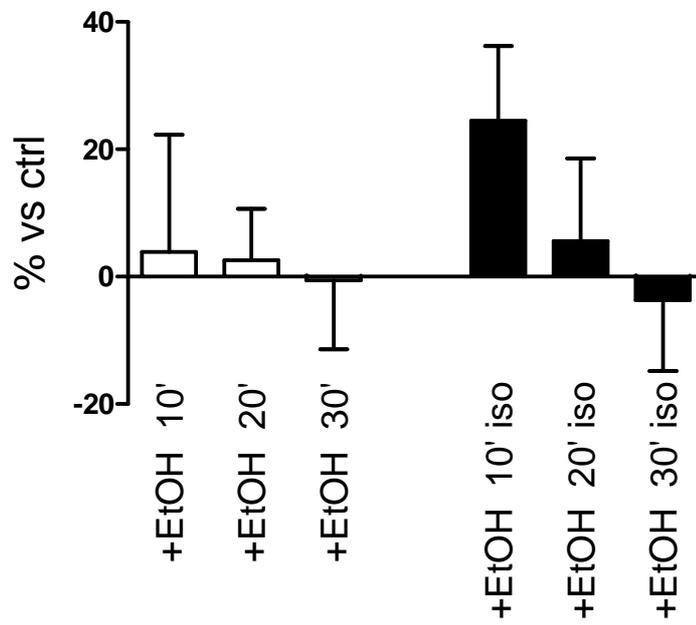


Figura 4c

AREA

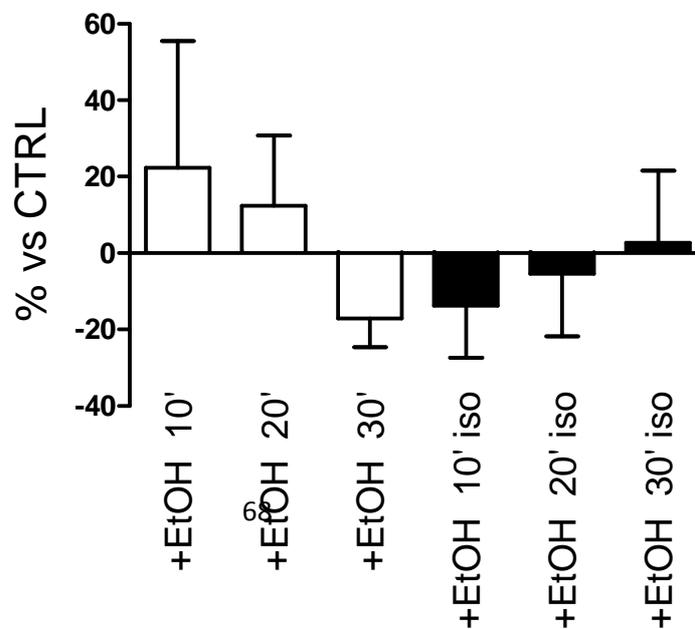


Figura 4d

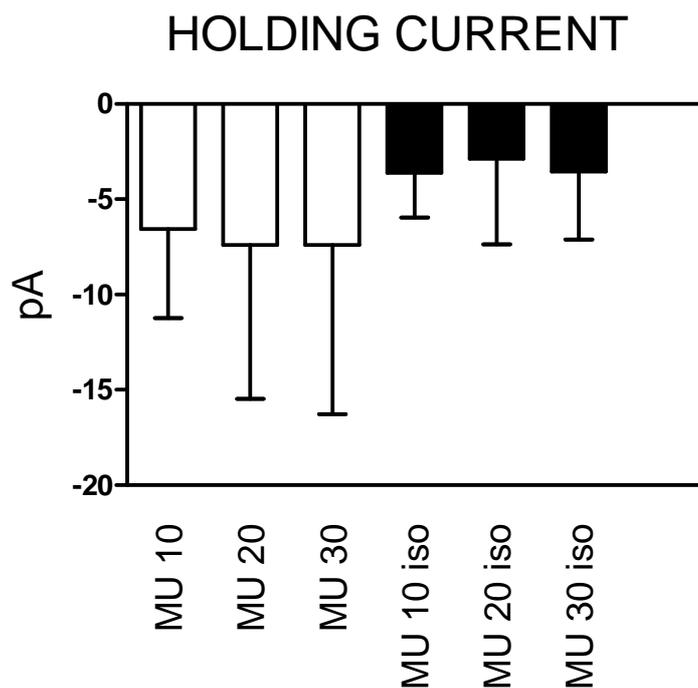


Figura 4e

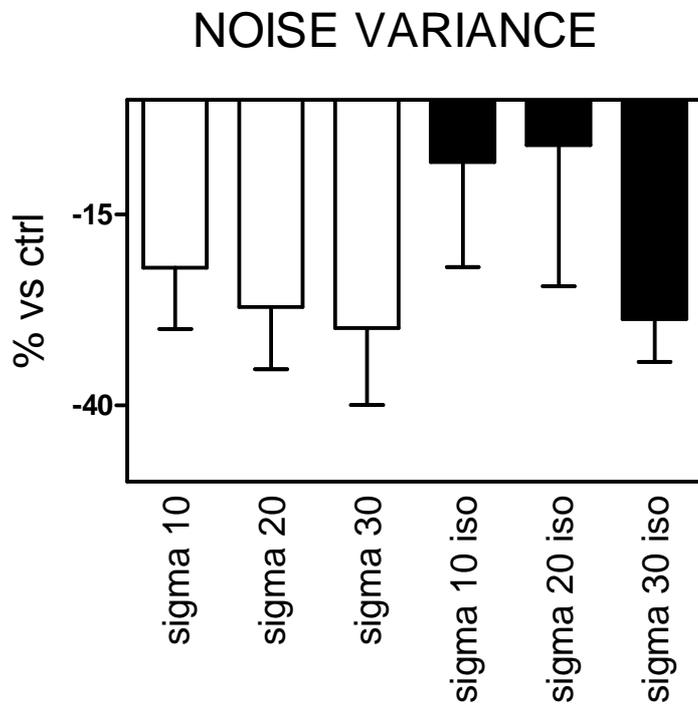


Figura 4f

Figura 4. Effetto della somministrazione in acuto di EtOH per 30' sulle correnti fasiche GABAergiche in cellule piramidali CA1 di topi GH e SI. I grafici riassumono i cambiamenti nell'ampiezza, del decay time, della frequenza, e dell'area. Tutte le registrazioni sono state effettuate in presenza di acido kynurenico (3 mM) per bloccare le correnti Glutamatergiche. I dati sono espressi come medie \pm S.E.M..

* $P < 0.05$ vs. GH (ANOVA seguito da test di Scheffe). Non si evidenziano differenze sostanziali tra i due gruppi, per quanto riguarda lo shift della baseline e la noise variance.

Fig. 5

Figura 5a

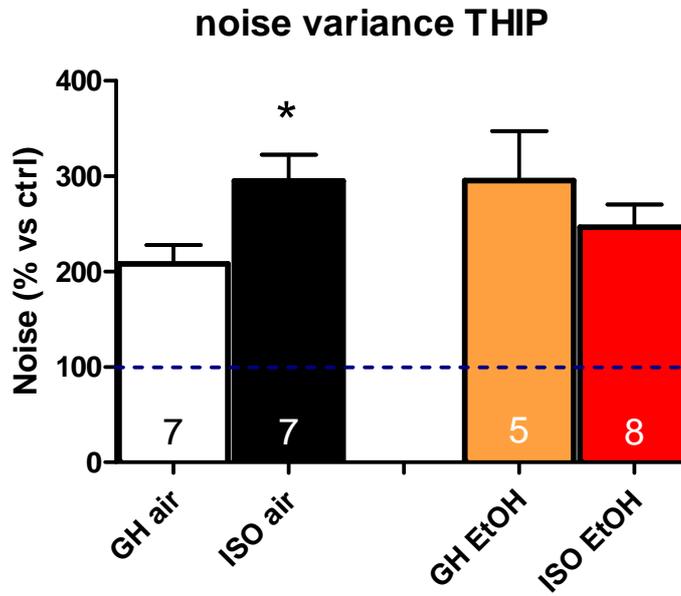


Figura 5b

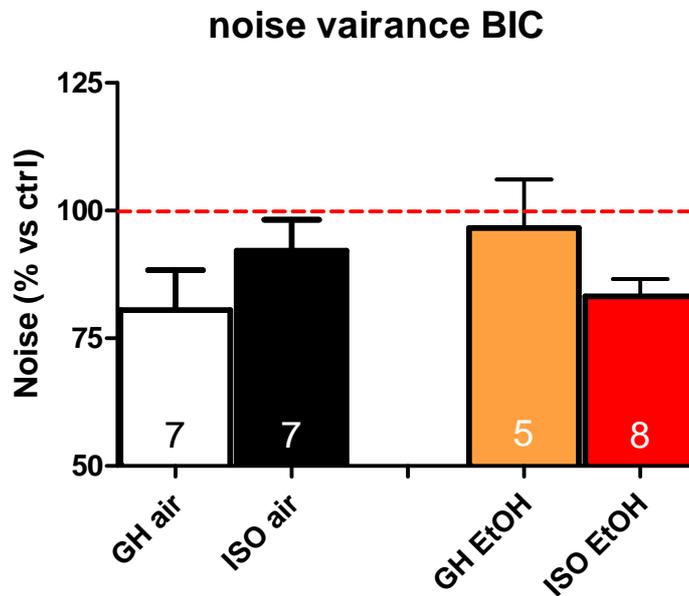


Figura 5c

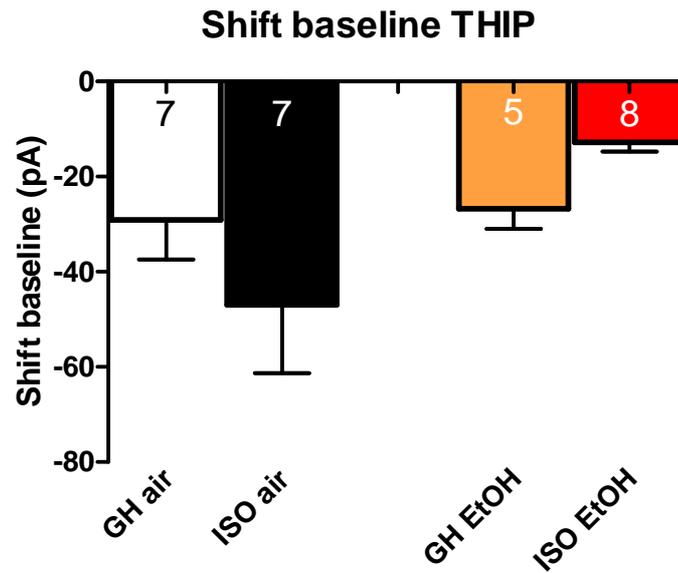


Figura 5d

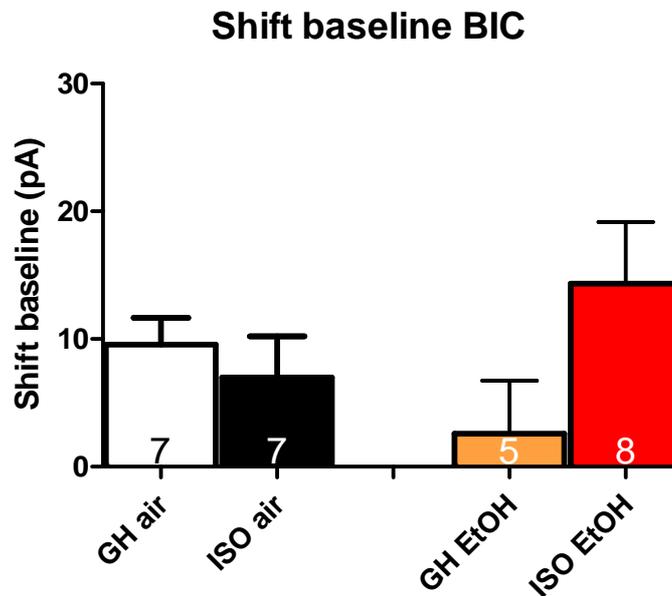


Figura 5. Effetto dell'assunzione forzata di EtOH tramite gabbie da inalazione sulla corrente tonica GABAergica registrata in cellule granulari di giro dentato da topi GH e SI. Tutte le registrazioni sono state eseguite in presenza di acido kynurenico (3 mM) per bloccare le

correnti glutamatergiche. I grafici riassumono i cambiamenti nella noise variance, e nella holding current, indotte da un'applicazione di THIP. I dati mostrati sono medie \pm S.E.M.. * $P < 0.05$ vs. GH (ANOVA followed by Scheffe's test).

Fig. 6

Figura 6a

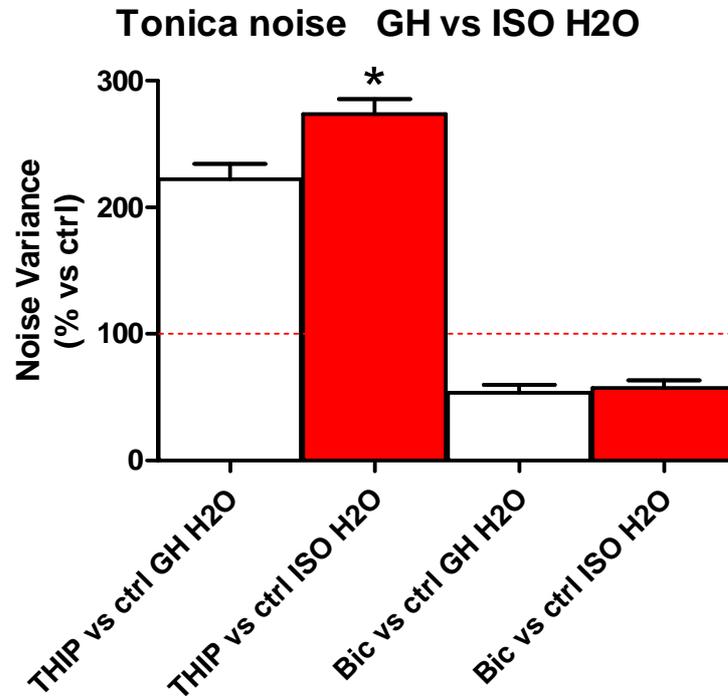


Figura 6b

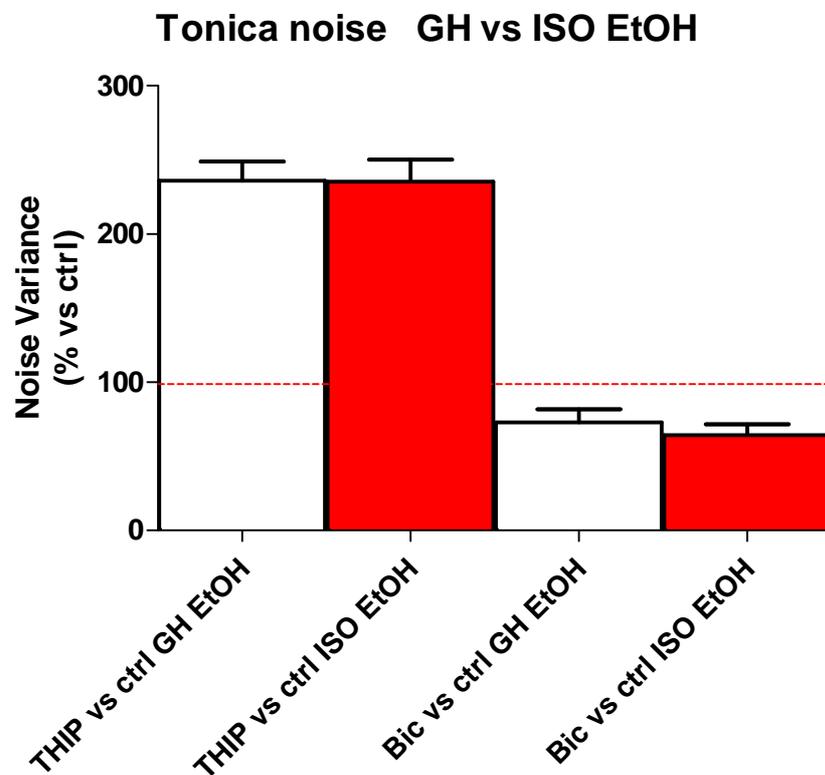


Figura 6c

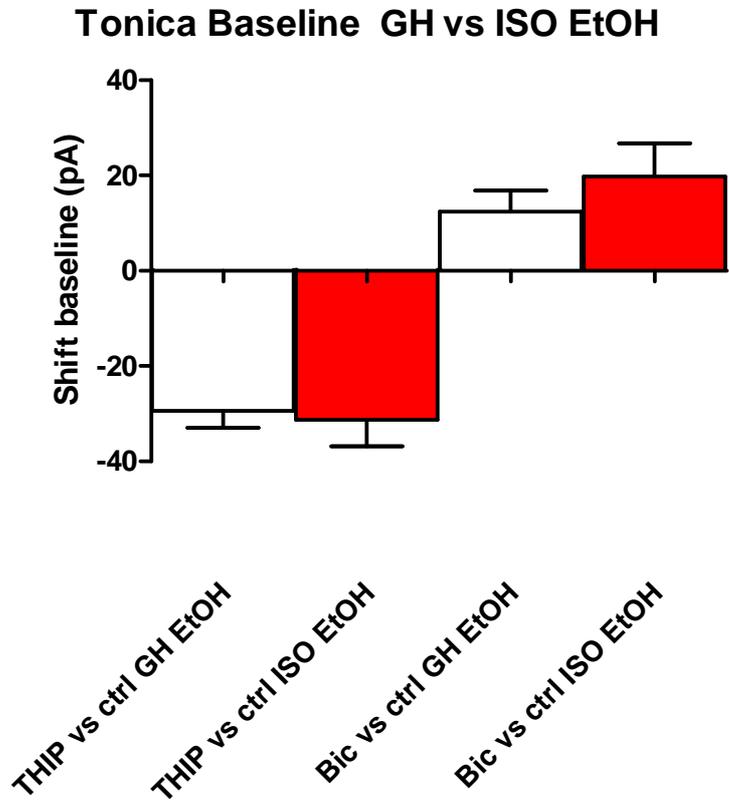


Figura 6d

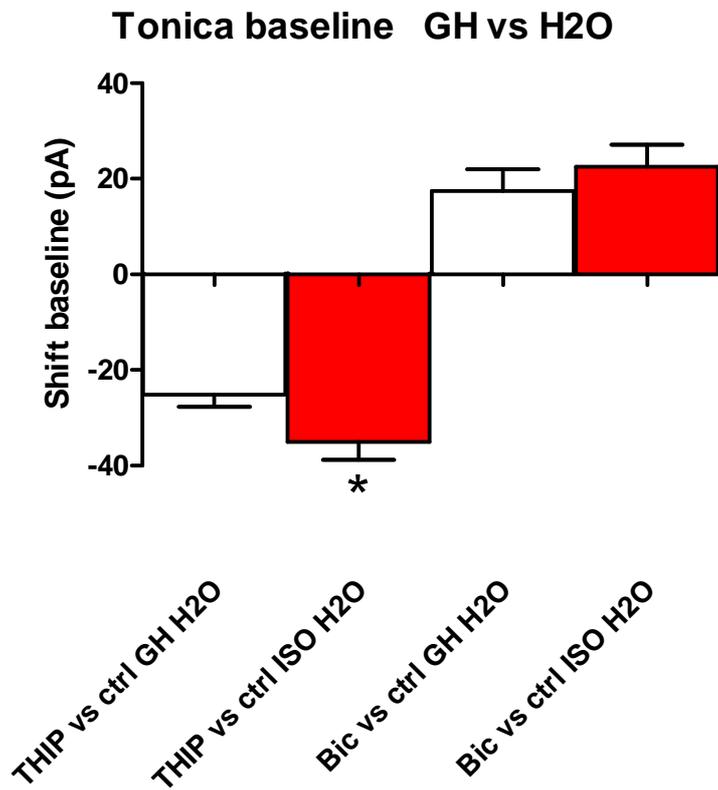


Figura 6 Effetto del consumo volontario di EtOH sulla corrente tonica GABAergica registrata in cellule granulari di giro dentato da topi GH e SI. Tutte le registrazioni sono state eseguite in presenza di acido kynurenico (3 mM) per bloccare le correnti glutamatergiche. I grafici riassumono i cambiamenti nella noise variance, e nella holding current, indotte da un'applicazione di THIP. I dati mostrati sono medie \pm S.E.M.. * $P < 0.05$ vs. GH (ANOVA followed by Scheffe's test).

Fig. 7

Figura 7a

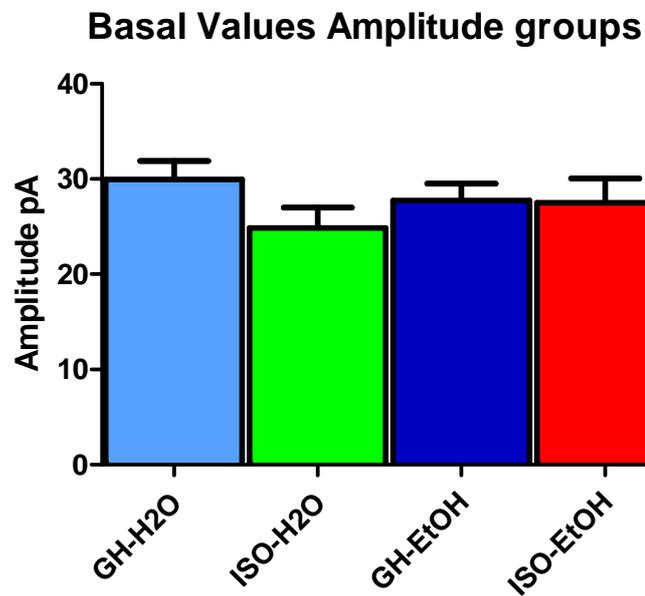


Figura 7b

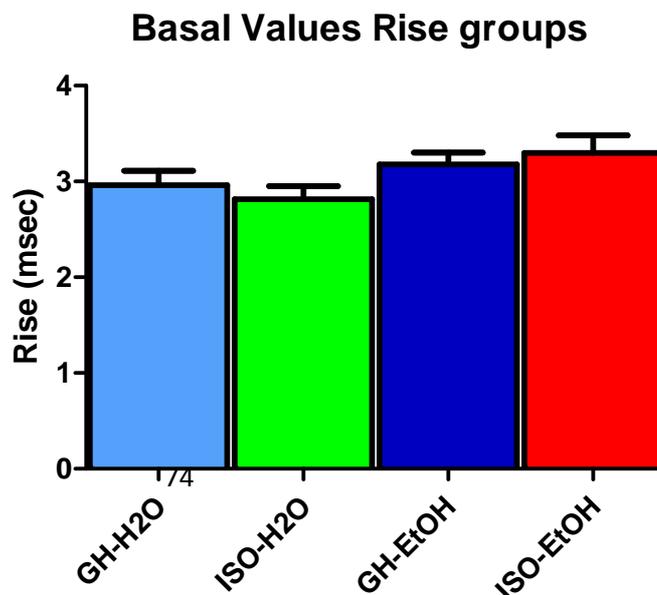


Figura 7c

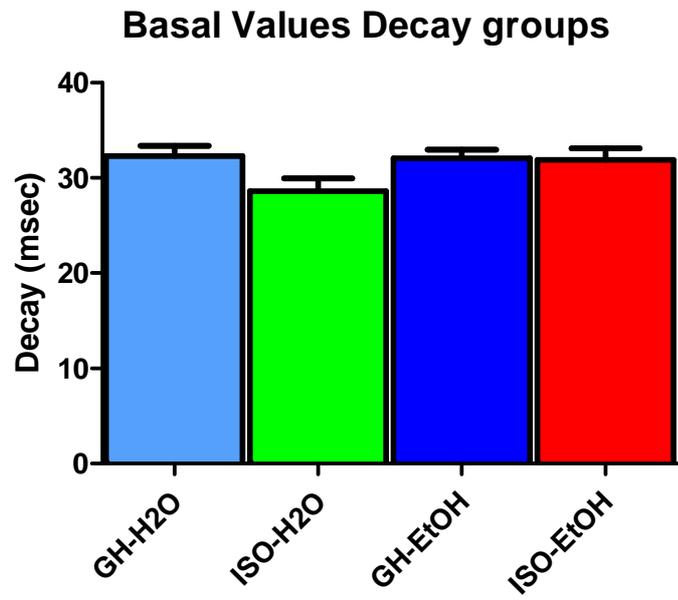


Figura 7d

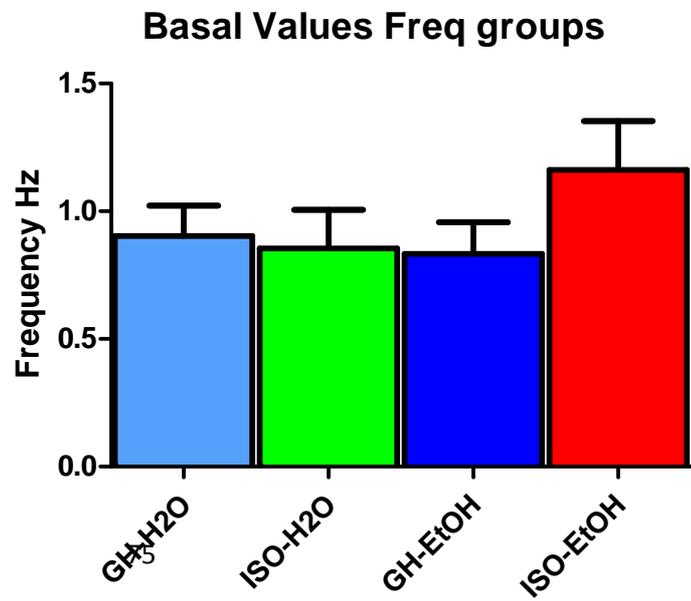


Figura 7. Effetto dell'autosomministrazione volontaria di EtOH sulle correnti fasiche GABAergiche in cellule granulari di giro dentato di topi GH e SI. I grafici riassumono i cambiamenti nell'ampiezza, del rise time, del decay time, e della frequenza. Tutte le registrazioni sono state effettuate in presenza di acido kynurenico (3 mM) per bloccare le correnti Glutamatergiche. I dati sono espressi come medie S.E.M. da 26 ai 31 neuroni. * $P < 0.05$ vs. GH (ANOVA seguito da test di Scheffe)

Bibliografia

- Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Strack AM, Walker CD, Dallman MF (1992). Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to exogenous corticosterone. *Endocrinology* 131: 585-94
- Allan AM, Harris RA (1986). Gamma-aminobutyric acid and alcohol actions: neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. *Life Sci* 39: 2005-15
- Amaral DG, Witter MP. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989;31(3):571-91. Review.
- Andersen, P. 1975. *Organization of hippocampal neurons and their interconnections*. Pages 155-175 in R. L. Isaacson and K. H. Pribram, eds., *The hippocampus: vol 1, structure and development*
- Ariwodola OJ, Weiner JL (2004). Ethanol potentiation of GABAergic synaptic transmission may be self-limiting: role of presynaptic GABA(B) receptors. *J Neurosci* 24: 10679-86
- Ariwodola, O. J., Weiner, J. L., 2004. Ethanol potentiation of GABAergic synaptic transmission may be self-limiting: role of presynaptic GABA(B) receptors. *J. Neurosci.* 24, 10679-86.
- Arndt, S. S., Laarakker, M. C., van Lith, H. A., van der Staay, F. J., Gieling, E., Salomons, A. R., van't Klooster, J., Ohl, F., 2009. Individual housing of mice--impact on behaviour and stress responses. *Physiol. Behav.* 97, 385-93.
- Barbaccia ML, Affricano D, Trabucchi M, Purdy RH, Colombo G, Agabio R, Gessa GL (1999). Ethanol markedly increases "GABAergic" neurosteroids in alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol* 384: R1-2
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Mostallino MC, Concas A, Purdy RH, Biggio G (1996). Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABA(A) receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology* 63: 166-72
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50: 291-313
- Barnard, A.E., Receptor classes and the transmitter-gated ion channels.
- Bartesaghi R (2004) Effect of early isolation on the synaptic function in the dentate gyrus and field CA1 of the guinea pig. *Hippocampus*. 2004;14(4):482-98.
- Bekkers JM, Richerson GB, Stevens CF. Origin of variability in quantal size in cultured hippocampal neurons and hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(14):5359-62.
- Belelli D, Lambert JJ (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6: 565-75
- Bickova M, Dibbelt L, Hill M, Hampl R, Starka L (1998). Allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Horm Metab Res* 30: 227-30
- Belknap JK, Crabbe JC, Young ER. (1993) Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993;112(4):503-1
- Bergamaschi A, Villa A, Malgaroli A. Loose-patch recordings of single quanta at individual hippocampal synapses. *Forti L, Bossi M, Nature*. 1997 Aug 28;388(6645):874-8.
- Bertrand and Changeux, 1995. Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intercellular communication. *Seminars Neurosci.* 7, 75-90.

- Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA. (2006) Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2006 Nov;24(10):2894-902. Epub 2006 Nov 20.
- Biggio G, Purdy RH (2001) Neurosteroids and Brain Function. In: Bradley RJ, Harris RA, Jenner P (eds) *International Review of Neurobiology*. Academic Press
- Bitran D, Shiekh M, McLeod M (1995). Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors. *J Neuroendocrinol* 7: 171-7
- Blitzer RD, Gil O, Landau EM. (1990) Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol. *Brain Res*. 1990 Dec 24;537(1-2):203-8.
- Borghese CM, Storustovu SI, Ebert B, Herd MB, Belelli D, Lambert JJ, Marshall G, Wafford KA, Harris RA (2005). The delta subunit of {gamma}-aminobutyric acid type A receptors does not confer sensitivity to low concentrations of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*
- Bormann J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Jan;21(1):16-9.
- Bowery et al. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1987 Feb;20(2):365-83.
- Brodal. *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*. Oxford, Oxford University Press.
- Brown, N., Kerby, J., Bonnert, T. P., Whiting, P. J., Wafford, K. A., 2002. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol*. 136, 965-74.
- Brussaard AB, Kits KS, Baker RE, Willems WP, Leyting-Vermeulen JW, Voorn P, Smit AB, Bicknell RJ, Herbison AE (1997). Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABA(A) receptor subunit expression. *Neuron* 19: 1103-14
- Burt e Kamatchi, 1991. GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J*. 1991 Nov;5(14):2916-23
- Cagetti E, Liang J, Spigelman I, Olsen RW (2003). Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Mol Pharmacol* 63: 53-64
- Carta M, Mameli M, Valenzuela CF (2004). Alcohol enhances GABAergic transmission to cerebellar granule cells via an increase in Golgi cell excitability. *J Neurosci* 24: 3746-51
- Carta M, Partridge LD, Savage DD, Valenzuela CF (2003). Neurosteroid modulation of glutamate release in hippocampal neurons: lack of an effect of a chronic prenatal ethanol exposure paradigm. *Alcohol Clin Exp Res* 27: 1194-8
- Chronister RB, White LE Jr. . 1975 Limbic lobe morphology: an old approach to a new system *Adv Neurol*;11:15-25.
- Cohen LG, Roth BJ, Wassermann EM, Topka H, Fuhr P, Schultz J, Hallett M. Magnetic stimulation of the human cerebral cortex, an indicator of reorganization in motor pathways in certain pathological conditions. *J Clin Neurophysiol*. 1991 Jan;8(1):56-65.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G (1998). Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13284-9
- Cooper S.J., 1989. Benzodiazepines and appetite: recent pre-clinical advances and their clinical implications. *Human Psychopharmacol*. 4, 81-89.
- Costa E. et al., 1994 In: *The Challenge of Neuropharmacology* (Mohler H., Da Prada M., eds), 46-53.
- Cruz, F. C., Quadros, I. M., Planeta Cda, S., Miczek, K. A., 2008. Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. *Psychopharmacology (Berl)*. 201, 459-68.
- Delorey and Olsen, 1992 *J. Biol. Chem*. 267, 16747-16750.

- Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW.(1990)Fields of origin and pathways of the interhemispheric commissures in the temporal lobe of macaques. *J Comp Neurol*. Dec 1;302(1):29-53.
- Devaud LL, Fritschy JM, Sieghart W, Morrow AL (1997). Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Neurochem* 69: 126-30
- Doble A and Martin Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety.I.L. 1992 *TIPS* 13, 76-81.
- Drasbek, K. R., Jensen, K., 2006. THIP, a hypnotic and antinociceptive drug, enhances an extrasynaptic GABA(A) receptor-mediated conductance in mouse neocortex. *Cereb. Cortex*. 16,1134-41.
- Durand D, Carlen PL.(1984)Impairment of long-term potentiation in rat hippocampus following chronic ethanol treatment.*Brain Res*. 1984 Aug 13;308(2):325-32.
- Duvernoy HM, (1988) The human hippocampus. New York, Springer- Verlag
- Einon DF, Morgan MJ (1977). A critical period for social isolation in the rat. *Dev Psychobiol* 10: 123-32
- Ellis FW (1966). Effect of ethanol on plasma corticosterone levels. *J Pharmacol Exp Ther* 153: 121-7
- expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci* 868: 645-53
- Faingold CL, N'Gouemo P, Riaz A (1998). Ethanol and neurotransmitter interactions--from molecular to integrative effects. *Prog Neurobiol* 55: 509-35
- Follesa P, Biggio F, Mancuso L, Cabras S, Caria S, Gorini G, Manca A, Orru A, Biggio G (2004). Ethanol withdrawal-induced up-regulation of the alpha2 subunit of the GABA(A) receptor and its prevention by diazepam or gamma-hydroxybutyric acid. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 130-7
- Follesa P, Mancuso L, Biggio F, Mostallino MC, Manca A, Mascia MP, Busonero F, Talani G, Sanna E, Biggio G (2003). Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 63: 896-907
- Follesa P, Mostallino MC, Biggio F, Gorini G, Caria S, Busonero F, Murru L, Mura ML, Sanna E, Biggio G (2005). Distinct patterns of expression and regulation of GABA-A receptors containing the delta subunit in cerebellar granule and hippocampal neurons. *J Neurochem* in press
- Follesa P, Porcu P, Sogliano C, Cinus M, Biggio F, Mancuso L, Mostallino MC, Paoletti AM, Purdy RH, Biggio G, Concas A (2002). Changes in GABA(A) receptor gamma 2 subunit gene expression induced by long-term administration of oral contraceptives in rats. *Neuropharmacology* 42: 325-36
- Follesa P, Serra M, Cagetti E, Pisu MG, Porta S, Floris S, Massa F, Sanna E, Biggio G (2000).Allopregnanolone synthesis in cerebellar granule cells: roles in regulation of GABA(A) receptor expression and function during progesterone treatment and withdrawal. *Mol Pharmacol* 57: 1262-70
- Follesa, P., Mancuso, L., Biggio, F., Mostallino, M. C., Manca, A., Mascia, M. P., Busonero, F., Talani, G., Sanna, E., Biggio, G., 2003. Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells. *Mol. Pharmacol.* 63, 896-907.
- Fone, K. C., Porkess, M. V., 2008. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1087-102.
- Freund RK, Palmer MR (1997). Beta adrenergic sensitization of gamma-aminobutyric acid receptors to ethanol involves a cyclic AMP/protein kinase A second-messenger mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1192-200

- Frye GD, Chapin RE, Vogel RA, Mailman RB, Kilts CD, Mueller RA, Breese GR (1981). Effects of acute and chronic 1,3-butanediol treatment on central nervous system function: a comparison with ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 216: 306-14
- Gage P.W. Activation and modulation of neuronal K⁺ channels by GABA. *Trends Neurosci.* 1992 Feb;15(2):46-51. Review.
- Genazzani AR, Petraglia F, Bernardi F, Casarosa E, Salvestroni C, Tonetti A, Nappi RE, Luisi S, Palumbo M, Purdy RH, Luisi M (1998). Circulating levels of allopregnanolone in humans: gender, age, and endocrine influences. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2099-103
- Glykys, J., Mann, E. O., Mody, I., 2008. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J. Neurosci.* 28, 1421-6.
- Gottlieb DI, Cowan WM. (1973) Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connection of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. I. The commissural connections. *J Comp Neurol.* 1973 Jun 15;149(4):393-422.
- Grant KA, Valverius P, Hudspith M, Tabakoff B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol.* 1990 Feb 13;176(3):289-96.
- Grobin AC, Matthews DB, Devaud LL, Morrow AL (1998). The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 139: 2-19
- Grobin, A. C., Papadeas, S. T., Morrow, A. L., 2000. Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA(A) receptor expression: potential mechanisms. *Neurochem. Int.* 37, 453-61.
- Gustafsson, L., Nylander, I., 2006. Time-dependent alterations in ethanol intake in male wistar rats exposed to short and prolonged daily maternal separation in a 4-bottle free-choice paradigm. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 2008-16.
- Hall FS (1998). Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol* 12: 129-62
- Hall FS, Huang S, Fong GW, Pert A, Linnoila M (1998). Effects of isolation-rearing on voluntary consumption of ethanol, sucrose and saccharin solutions in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* 139: 210-6
- Hall, F. S., Huang, S., Fong, G. W., Pert, A., Linnoila, M., 1998. Effects of isolation-rearing on voluntary consumption of ethanol, sucrose and saccharin solutions in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 139, 210-6.
- Harris RA (1999). Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol Clin Exp Res* 23: 1563-70
- Harrison NL, Simmonds MA (1984). Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323: 287-92
- Harvey R.J. et al., 1993. Molecular cloning reveals the existence of a fourth γ subunit of the vertebrate brain GABA_A receptor. *FEBS Lett.* 331, 211-216.
- Hedblom E. and Kirkness E.F., 1997. A novel class of GABA_A receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J. Biol. Chem.* 272, 15346-15350.
- Hjorth-Simonsen, S. Laurberg (1977). Commissural connections of the dentate area in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* Volume 174, Issue 4, pages 591–605, 15 August 1977
- Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Meaney, M. J., Plotsky, P. M., 2001. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 158, 366-73.
- imidazobenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. *Science* 234: 1243-7
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol.* May 22;295(4):580-623.
- Izquierdo I. and Medina J.H., 1991. GABA_A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *TIPS* 12, 260-265.

- Izumi Y, Murayama K, Tokuda K, Krishnan K, Covey DF, Zorumski CF.(2007)GABAergic neurosteroids mediate the effects of ethanol on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci.* 2007 Oct;26(7):1881-8. Epub 2007 Sep 20.
- Janak PH, Redfern JE, Samson HH (1998). The reinforcing effects of ethanol are altered by the endogenous neurosteroid, allopregnanolone. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 1106-12
- Kanke Y, Doller HJ Jr, Segen BJ, Gibson KD. (1982)Development of the biochemical and morphological changes induced by administration of a beta-xyloside to chick embryos. *Teratology.* Feb;25(1):81-8.
- Katz, B., and R. Miledi, 1969. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J. Physiol. (Lond.).* 203:689-706.
- Kawaguchi Y, Hama K. (1988)Physiological heterogeneity of nonpyramidal cells in rat hippocampal CA1 region. *Exp Brain Res.* 72(3):494-502
- Khisti RT, Kumar S, Morrow AL (2003). Ethanol rapidly induces steroidogenic acute regulatory protein expression and translocation in rat adrenal gland. *Eur J Pharmacol* 473: 225-7
- Khisti RT, Penland SN, VanDoren MJ, Grobin AC, Morrow AL (2002). GABAergic neurosteroid modulation of ethanol actions. *World J Biol Psychiatry* 3: 87-95
- Knowles WD, Schwartzkroin PA (1981) Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J Neurosci.* 1981 Mar;1(3):318-22.
- Knowles WD, Schwartzkroin PA (1981)Axonal ramifications of hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurosci.* Nov;1(11):1236-41.
- Kokate TG, Svensson BE, Rogawski MA (1994). Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 1223-9
- Kufuji et al., 1991 Generation of two forms of the gamma-aminobutyric acidA receptor gamma 2-subunit in mice by alternative splicing.*J. Neurochem.* 56, 713-715.
- Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA.(1987) Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci.* Jul;7(7):1979-93.
- Lacaille JC, Schwartzkroin PA. Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions.
- Lacaille JC, Schwartzkroin PA.Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology.
- Lambert JJ, Belelli D, Harney SC, Peters JA, Frenguelli BG (2001). Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37: 68- 80
- Laurberg S, Sørensen KE. (1981)Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3).. *Brain Res.* 1981 May 18;212(2):287-300
- Lin AM, Freund RK, Palmer MR (1991). Ethanol potentiation of GABA-induced electrophysiological responses in cerebellum: requirement for catecholamine modulation. *Neurosci Lett* 122: 154-8
- Lopez, M. F., Doremus-Fitzwater, T. L., Becker, H. C., Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in adult C57BL/6J mice. *Alcohol.*
- Lopez, M. F., Doremus-Fitzwater, T. L., Becker, H. C., Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in adult C57BL/6J mice. *Alcohol.*
- Lorente de Nó R. (1934)Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J psychol Neurol Lpz.* 1934
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. (2003)Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol.* 2003 Oct;183(2):600-9.

- Luddens H. and Wisden W. 1991 Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *TIPS* 12, 49-51.
- Luddens H. et al., 1991 More than one alpha variant may exist in a GABAA/benzodiazepine receptor complex. *J. Receptor Res.* 11: 535-551.
- MacDonald R.L. and Olsen R.W. 1994. GABAA receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 569-602.
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005). Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8: 797-804
- Maguire, J., Mody, I., 2008. GABA(A)R plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression. *Neuron.* 59, 207-13.
- Majewska MD (1992). Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38: 379-95
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232: 1004-7
- Martz A, Deitrich RA, Harris RA (1983). Behavioral evidence for the involvement of gamma-aminobutyric acid in the actions of ethanol. *Eur J Pharmacol* 89: 53-62
- Massey PV, Bashir ZI.(2007) Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci.* 2007 Apr;30(4):176-84
- Matsumoto K, Uzunova V, Pinna G, Taki K, Uzunov DP, Watanabe H, Mienville JM, Guidotti A, Costa E (1999). Permissive role of brain allopregnanolone content in the regulation of pentobarbital-induced righting reflex loss. *Neuropharmacology* 38: 955-63
- Matsumoto, K., Uzunova, V., Pinna, G., Taki, K., Uzunov, D. P., Watanabe, H., Mienville, J. M., Guidotti, A., Costa, E., 1999. Permissive role of brain allopregnanolone content in the regulation of pentobarbital-induced righting reflex loss. *Neuropharmacology.* 38, 955-63.
- Matthews, D. B., Devaud, L. L., Fritschy, J. M., Sieghart, W., Morrow, A. L., 1998. Differential regulation of GABA(A) receptor gene expression by ethanol in the rat hippocampus versus cerebral cortex. *J. Neurochem.* 70, 1160-6.
- McKernan RM. and Whiting PJ. (1996). Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *TINS* 19: 139-143.
- Mehta A.K. and Ticku M.K., 1999. An update on GABA_A receptors. *Brain Res. Rev.* 29, 196–217.
- Miles R, Wong RKS, (1986) Excitatory synaptic interaction between CA3 neurons in the guinea pig hippocampus . *J Physiol (London)* 373:397-418
- Miles R. (1990) Variation in strength of inhibitory synapses in the CA3 region of guinea-pig hippocampus in vitro. *J Physiol.* Dec;431:659-76.
- Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I (1994). Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 17: 517-25
- Mody I, Pearce RA (2004). Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27: 569-75
- Mohler H, Fritschy JM, Rudolph U (2002). A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300:2-8
- Morrisett RA, Mott DD, Lewis DV, Wilson WA, Swartzwelder HS. Reduced sensitivity of the N-methyl-D-aspartate component of synaptic transmission to magnesium in hippocampal slices from immature rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990 Nov 1;56(2):257-62.
- Morrisett RA, Swartzwelder HS.(1993) Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J Neurosci.* 1993 May;13(5):2264-72.
- Morrow AL, Janis GC, VanDoren MJ, Matthews DB, Samson HH, Janak PH, Grant KA (1999). Neurosteroids mediate pharmacological effects of ethanol: a new mechanism of ethanol action? *Alcohol Clin Exp Res* 23: 1933-40

- Morrow AL, Suzdak PD, Paul SM (1988). Benzodiazepine, barbiturate, ethanol and hypnotic steroid hormone modulation of GABA-mediated chloride ion transport in rat brain synaptoneuroosomes. *Adv Biochem Psychopharmacol* 45: 247-61
- Morrow AL, VanDoren MJ, Penland SN, Matthews DB (2001). The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev* 37: 98-109
- MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA, Wafford KA (1999). Molecular and functional diversity of the
- Mulkeen D, Anwyl R, Rowan MJ. (1987) Enhancement of long-term potentiation by the calcium channel agonist Bayer K8644 in CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Neurosci Lett*. 1987 Oct 5;80(3):351-5.
- Nie Z, Schweitzer P, Roberts AJ, Madamba SG, Moore SD, Siggins GR (2004). Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* 303: 1512-4
- O'Dell LE, Alomary AA, Vallee M, Koob GF, Fitzgerald RL, Purdy RH (2004). Ethanol-induced increases in neuroactive steroids in the rat brain and plasma are absent in adrenalectomized and gonadectomized rats. *Eur J Pharmacol* 484: 241-7
- Ogilvie KM, Lee S, Rivier C (1997). Role of arginine vasopressin and corticotropin-releasing factor in mediating alcohol-induced adrenocorticotropin and vasopressin secretion in male rats bearing lesions of the paraventricular nuclei. *Brain Res* 744: 83-95
- Olsen R.W. and Avoli M., 1997. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 38, 399-407.
- P. Andersen, T. V. P. Bliss and K. K. Skrede.(1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways . *Exp Br Res* Volume 13, Number 2, 222-238, DOI: 10.1007/BF00234087
- P. Sah, E. S. L. Faber, M. Lopez de armentia, and J. Power. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol Rev* 83: 803–834, 2003; 10.1152/physrev.00002.2003.
- Phillips TJ, Belknap JK, Crabbe JC.(1991)Use of recombinant inbred strains to assess vulnerability to drug abuse at the genetic level.*J Addict Dis*. 1991;10(1-2):73-87
- Pietropaolo, S., Singer, P., Feldon, J., Yee, B. K., 2008. The postweaning social isolation in C57BL/6 mice: preferential vulnerability in the male sex. *Psychopharmacology (Berl)*. 197, 613-28.
- Pisu, M. G., M.C., M., R., D., Maciocco, E., Secci, P. P., Serra, M., 2010. Effects of voluntary ethanol consumption on emotional state and stress responsiveness in socially isolated rats. *Eur. Neuropsychopharmacol*. In press.
- Ploj, K., Roman, E., Nylander, I., 2003. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience*. 121, 787-99.
- Porcu P, Sogliano C, Ibba C, Piredda M, Tocco S, Marra C, Purdy RH, Biggio G, Concas A (2004). Failure of gamma-hydroxybutyric acid both to increase neuroactive steroid concentrations in adrenalectomizedorchietomized rats and to induce tolerance to its steroidogenic effect in intact animals. *Brain Res* 1012: 160-8
- Rivier C (1996). Alcohol stimulates ACTH secretion in the rat: mechanisms of action and interactions with other stimuli. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 240-54
- Rivier C, Bruhn T, Vale W (1984). Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). *J Pharmacol Exp Ther* 229: 127-31
- Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR (2003). Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci U SA* 100: 2053-8
- Roberts AJ, Smith AD, Weiss F, Rivier C, Koob GF (1998). Estrous cycle effects on operant responding for ethanol in female rats. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 1564-9

- Roman, E., Gustafsson, L., Hyytia, P., Nylander, I., 2005. Short and prolonged periods of maternal separation and voluntary ethanol intake in male and female ethanol-preferring AA and ethanolavoiding ANA rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 591-601.
- Sanna E, Mostallino MC, Busonero F, Talani G, Tranquilli S, Mamei M, Spiga S, Follesa P, Biggio G (2003). Changes in GABA(A) receptor gene expression associated with selective alterations in receptor function and pharmacology after ethanol withdrawal. *J Neurosci* 23: 11711-24
- Sanna E, Talani G, Busonero F, Pisu MG, Purdy RH, Serra M, Biggio G (2004). Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci* 24: 6521-30
- Sanna, E., Mostallino, M. C., Murru, L., Carta, M., Talani, G., Zucca, S., Mura, M. L., Maciocco, E., Biggio, G., 2009. Changes in expression and function of extrasynaptic GABAA receptors in the rat hippocampus during pregnancy and after delivery. *J. Neurosci.* 29, 1755-65.
- Saunders RC, Rosene DL, Van Hoesen GW. (1988) Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections. *J Comp Neurol.* 1988 May 8;271(2):185-207.
- Schenk S, Gorman K, Amit Z (1990). Age-dependent effects of isolation housing on the self-administration of ethanol in laboratory rats. *Alcohol* 7: 321-6
- Schenk, S., Gorman, K., Amit, Z., 1990. Age-dependent effects of isolation housing on the self-administration of ethanol in laboratory rats. *Alcohol.* 7, 321-6.
- Schlandler M, Frotscher M. Non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. A combined Golgi-electron microscope study. *Anat Embryol (Berl).* 1986;174(1):35-47.
- Schofield P.R. et al., 1987. Sequence and functional expression of the GABAA receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature* 328, 221-227.
- Seeburg P.H. et al., 1990 *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 29-40.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004). Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27: 262-9
- Serra M, Madau P, Chessa MF, Caddeo M, Sanna E, Trapani G, Franco M, Liso G, Purdy RH, Barbaccia ML, Biggio G (1999). 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats. *Br J Pharmacol* 127: 177- 87
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Biggio G (2005). Social isolation-induced changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Stress* 8: 259-64
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Cara V, Purdy RH, Biggio G (2003). Social isolation-induced increase in the sensitivity of rats to the steroidogenic effect of ethanol. *J Neurochem* 85: 257-63
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Floris S, Cannas E, Mossa A, Trapani G, Latrofa A, Purdy RH, Biggio G (2004). Social isolation increases the response of peripheral benzodiazepine receptors in the rat. *Neurochem Int* 45: 141-8
- Serra M, Pisu MG, Littera M, Papi G, Sanna E, Tuveri F, Usala L, Purdy RH, Biggio G (2000). Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J Neurochem* 75: 732-40
- Serra, M., Mostallino, M. C., Talani, G., Pisu, M. G., Carta, M., Mura, M. L., Floris, I., Maciocco, E., Sanna, E., Biggio, G., 2006. Social isolation-induced increase in alpha and delta subunit gene expression is associated with a greater efficacy of ethanol on steroidogenesis and GABA receptor function. *J. Neurochem.* 98, 122-33.
- Smith, S. S., Gong, Q. H., Hsu, F. C., Markowitz, R. S., French-Mullen, J. M., Li, X., 1998a. GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature.* 392, 926-30.
- Serra, M., Pisu, M. G., Littera, M., Papi, G., Sanna, E., Tuveri, F., Usala, L., Purdy, R. H., Biggio, G., 2000. Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J. Neurochem.* 75, 732-40.
- Sieghart W (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol.Rev.* 47: 181-234

- Sieghart W et al 1999. Structure and subunit composition of GABAA receptors. *Neurochem. Int.* 34: 379-385
- Sieghart W et al 1999. Structure and subunit composition of GABAA receptors. *Neurochem. Int.* 34: 379-385
- Sieghart W, Sperk G (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2: 795-816
- Sieghart W. and Sperk G., 2002. Subunit composition, distribution and function of GABAA receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem.* 2,795–816.
- Sieghart W., 1995. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 47, 181-234.
- Sinclair JG, Lo GF.(1986) Ethanol blocks tetanic and calcium-induced long-term potentiation in the hippocampal slice. *Gen Pharmacol.* 1986;17(2):231-3.
- Sinnott RS, Phillips TJ, Finn DA (2002). Alteration of voluntary ethanol and saccharin consumption by the neurosteroid allopregnanolone in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 162: 438-47
- Sloviter RS, Nilaver G. (1987) Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J Comp Neurol.* 1987 Feb 1;256(1):42-60.
- Smith SS, Gong QH, Hsu FC, Markowitz RS, French-Mullen JM, Li X (1998a). GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* 392: 926-30.
- Smith SS, Gong QH, Li X, Moran MH, Bitran D, Frye CA, Hsu FC (1998b). Withdrawal from 3alpha-OH- 5alpha-pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA-gated current and increases the GABAA receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety. *J Neurosci* 18: 5275-84
- Smith, S. S., Gong, Q. H., Li, X., Moran, M. H., Bitran, D., Frye, C. A., Hsu, F. C., 1998b. Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA-gated current and increases the GABAA receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety. *J. Neurosci.* 18, 5275-84.
- Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD. (1983) A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res.* Jan 17;259(1):137-42.
- Somogyi P, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Takagi H, Wu JY. (1983) Glutamate decarboxylase immunoreactivity in the hippocampus of the cat: distribution of immunoreactive synaptic terminals with special reference to the axon initial segment of pyramidal neurons. *J Neurosci.* Jul;3(7):1450-68
- Stephenson F.A. et al., 1991 *Curr. Asp. Neurosci.* 3, 177-193.
- Stocco DM (2000). The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 164:247-53
- Streissguth AP, Herman CS, Smith DW. Stability of intelligence in the fetal alcohol syndrome: a preliminary report. *Alcohol Clin Exp Res.* 1978 Apr;2(2):165-70.
- Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K, Smith SS(2002). Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA(A) receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* 5: 721-2
- Suzdak PD, Glowa JR, Crawley JN, Schwartz RD, Skolnick P, Paul SM (1986). A selective
- Swanson, L.W., A. Björklund & T. Hökfelt, (eds.), (1996) *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 12, *Integrated Systems of the CNS*, Part III, 584 pp., Elsevier, Amsterdam.
- Swartzwelder HS, Farr KL, Wilson WA, Savage DD.(1988)Prenatal exposure to ethanol decreases physiological plasticity in the hippocampus of the adult rat. *Alcohol.* 1988 Mar-Apr;5(2):121-4.

- Ticku MK, Burch T (1980). Alterations in gamma-aminobutyric acid receptor sensitivity following acute and chronic ethanol treatments. *J Neurochem* 34: 417-23
- Tömböl T, Babosa M, Hajdú F, Somogyi G.(1979) Interneurons: an electron microscopic study of the cat's hippocampal formation, II. *Acta Morphol Acad Sci Hung.*;27(4):297-313.
- Trapani G, Franco M, Latrofa A, Ricciardi L, Carotti A, Serra M, Sanna E, Biggio G, Liso G (1999). Novel 2- phenylimidazo[1,2-a]pyridine derivatives as potent and selective ligands for peripheral benzodiazepine receptors: synthesis, binding affinity, and in vivo studies. *J Med Chem* 42: 3934-41
- Traub RD, Miles R.(1991)Multiple modes of neuronal population activity emerge after modifying specific synapses in a model of the CA3 region of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci.*;627:277-90
- Tretter V. et al., 1997. Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J. Neurosci.* 17, 2728-2737
- Ueno S, Harris RA, Messing RO, Sanchez-Perez AM, Hodge CW, McMahon T, Wang D, Mehmert KK, Kelley SP, Haywood A, Olive MF, Buck KJ, Hood HM, Blednov Y, Findlay G, Mascia MP (2001). Alcohol actions on GABA(A) receptors: from protein structure to mouse behavior. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 76S-81S
- Valzelli L, Bernasconi S, Gomba P.(1974) Effect of isolation on some behavioral characteristics in three strains of mice. *Biol Psychiatry.* 1974 Dec;9(3):329-34.
- van Groen T, Wyss JM.(1990) Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol.* Dec 15;302(3):515-28.
- VanDoren MJ, Matthews DB, Janis GC, Grobin AC, Devaud LL, Morrow AL (2000). Neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one modulates electrophysiological and behavioral actions of ethanol. *J Neurosci* 20: 1982-9
- Voikar, V., Polus, A., Vasar, E., Rauvala, H., 2005. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav.* 4, 240-52.
- Volpicelli JR. (1987) Uncontrollable events and alcohol drinking. *Br J Addict.*82(4):381-92.
- Wallner M, Hancher HJ, Olsen RW (2003). Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15218-23
- Wan FJ, Berton F, Madamba SG, Francesconi W, Siggins GR (1996). Low ethanol concentrations enhance GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal pyramidal neurons only after block of GABAB receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5049-54
- Wei W, Faria LC, Mody I (2004). Low ethanol concentrations selectively augment the tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 8379-82
- Weiner JL, Gu C, Dunwiddie TV (1997). Differential ethanol sensitivity of subpopulations of GABAA synapses onto rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 77: 1306-12
- West JR .Fetal alcohol-induced brain damage and the problem of determining temporal vulnerability: a review. *Alcohol Drug Res.* 1987;7(5-6):423-41
- Whiting P.J. et al., 1990. Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma 2 phosphorylation site. *PNAS U S A.* 87(24): 9966-70.
- Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby
- Wisden W. and Seeburg P.H., 1992 GABAA receptor channels: from subunits to functional entities. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 263-269.
- Wolffgramm J (1990). Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions. *Psychopharmacology (Berl)* 101: 233-9
- Wong et al., 1992 *Mol. Pharmacol.* 42, 996-1003.

- Yamashita M, Marszalec W, Yeh JY, Narahashi T (2005). Effects of ethanol and anesthetics on GABA-induced tonic currents in cerebellar granule cells and alpha6 GABA-A receptors expressed in HEK cells and CHO cells. *Program No. 158.10. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience*
- Yanai, J., Ginsburg, B. E., 1976. Increased sensitivity to chronic ethanol in isolated mice. *Psychopharmacologia*. 46, 185-9.
- Yeckel MF, Berger TW. (1990) Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Aug;87(15):5832-6.
- Yoneyama N, Crabbe JC, Ford MM, Murillo A, Finn DA (2008) Voluntary ethanol consumption in 22 inbred mouse strains. *Alcohol*. 2008 May;42(3):149-60. Epub 2008 Mar 20.
- Ziskind-Conhaim L, Gao BX, Hinckley C (2003). Ethanol dual modulatory actions on spontaneous postsynaptic currents in spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 89: 806-13

