



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

NEUROSCIENZE

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza

Area 05 - Scienze Biologiche – SSD BIO/14 Farmacologia

TITOLO TESI:

**Modificazioni nella funzionalità, nell' espressione dei recettori GABAA
extrasinaptici e nella plasticità sinaptica nell'ippocampo di ratto
durante la gravidanza e dopo il parto.**

Presentata da: **Dott. Luca Murru**

Coordinatore Dottorato: **Prof. Walter Fratta**

Relatore: **Prof. Giovanni Biggio**

Esame finale a.a. 2007/2008

INTRODUZIONE

CICLO SESSUALE NELLA DONNA

“Gravidanza: periodo necessario allo sviluppo del feto nei mammiferi, dal concepimento al parto. Nella donna dura in media 280 giorni.” Questa è la definizione che si trova in genere nei vocabolari, ma bisogna anche ricordare che nella donna questo stato comporta dei cambiamenti a livello psico-fisico, che, brevemente, si possono riassumere in: cambiamenti dell’aspetto fisico, aumento di peso, stato di benessere e aumento della soglia ansiogena a partire dal quarto mese.

La vita sessuale e riproduttiva delle donne è costellata da parole come menarca, menopausa, ciclo mestruale, ovulazione, gravidanza e parto. Tutti questi eventi sono accompagnati da pesanti fluttuazioni ormonali ed implicano marcate alterazioni a livello psichico e fisico, che possono sfociare in vere e proprie sindromi; ne sono un esempio la Sindrome Premestruale e la Depressione Post-Parto.

Una delle prime fasi del ciclo sessuale della donna riguarda il ciclo mestruale che consiste in una serie di eventi fisiologici che mediano l’espulsione di uno o più ovuli dall’ovario. Successivamente l’ovulo può seguire due vie distinte: o essere fecondato e quindi generare una nuova vita o non seguire questo destino ed essere quindi eliminato attraverso la mestruazione cioè lo sfaldamento della parete uterina che viene eliminata insieme all’ovulo.

Tutte le fasi sia del ciclo mestruale che di quello riproduttivo vengono regolate da un preciso equilibrio degli ormoni prodotti sia dagli organi direttamente coinvolti nel ciclo sessuale sia dal sistema nervoso centrale.

Consideriamo ora più dettagliatamente quel che avviene nel ciclo mestruale. Si ricordi che i giorni di un ciclo mestruale vengono numerati a partire dal primo giorno della mestruazione (giorno 1) fino all'ultimo giorno prima della mestruazione successiva. Questa durata, come è di comune esperienza, è normalmente variabile da donna a donna e pari a circa un mese (variabilità tra 25 e 35 giorni).

Dopo aver ovulato, il follicolo si trasforma in un organello denominato corpo

luteo con funzione endocrina per la produzione di estrogeni e progestinici. La regressione del corpo luteo si accompagna ad una caduta abbastanza brusca dei livelli plasmatici dei suoi prodotti, estrogeni e progesterone, e questo fenomeno, a livello uterino, determina l'inizio di una nuova mestruazione, poiché l'endometrio cessa di essere stimolato da tali ormoni luteali.

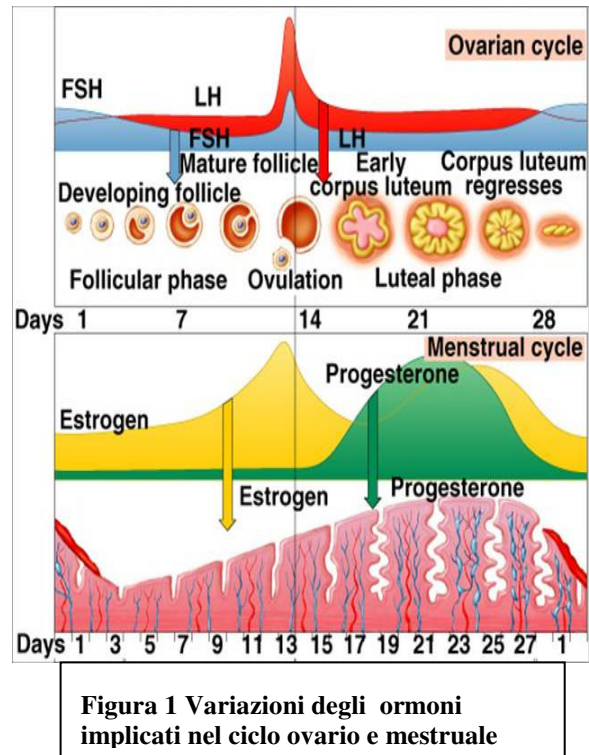


Figura 1 Variazioni degli ormoni implicati nel ciclo ovarico e mestruale

Le fasi del ciclo mestruale sono quindi due: fase follicolare e fase luteale. La prima è caratterizzata dalla proliferazione endometriale dopo lo sfaldamento mestruale mentre la seconda è caratterizzata a livello ovarico dalla presenza del corpo luteo. La seconda fase viene inoltre chiamata, con riferimento all'utero, fase secretiva, poiché, grazie all'influenza del progesterone, le ghiandole presenti a livello dell'endometrio iniziano ad assumere un carattere "secretivo", finalizzato alla preparazione di un ambiente idoneo ad un eventuale impianto embrionale in caso di fecondazione dell'ovulo.

Questi meccanismi sono governati da un sistema fisiologico altamente specializzato chiamato: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. L'ipotalamo secreta GnRH (ormone di rilascio delle gonadotropine) inducendo sulla neuroipofisi il rilascio di due ormoni; **FSH e LH** (ormone follicolo stimolante ed ormone luteinizzante). Ecco in breve le loro principali funzioni:

FSH

- ✓ stimola la crescita e lo sviluppo dei follicoli ovarici
- ✓ stimola la produzione del 17β -estradiolo regolando l'attività dell'enzima aromatasi
- ✓ Nelle ultime fasi della crescita follicolare induce l'espressione dei recettori dell'LH sulle cellule della granulosa del follicolo dominante

LH

- ✓ determina la rottura del follicolo durante l'ovulazione
- ✓ stimola la produzione di progesterone da parte del corpo luteo
- ✓ stimola la sintesi di androstenedione dalle cellule della teca, il principale precursore del 17β -estradiolo
- ✓ induce l'espressione del recettore dell'FSH nelle cellule della granulosa

Inoltre questi due ormoni ipofisari inducono la liberazione di steroidi gonadici come l'attivina ed l'inibina.

Nell'organismo sono presenti tre tipi di estrogeno a seconda del periodo di fertilità in cui si trova una donna: estradiolo (vita fertile), estrone (postmenopausa), estriolo (gravidanza).

Le azioni dell'estrogeno sono le seguenti:

- ✓ Sviluppo dei caratteri sessuali secondari femminili
- ✓ Sviluppo dell' endometrio uterino durante il ciclo mestruale
- ✓ Ispessimento mucosa vaginale
- ✓ Fluidità muco cervicale
- ✓ Azione centrale sul feedback delle gonadotropine variabile (inibizione a basse concentrazioni, stimolazione a concentrazioni elevate)
- ✓ Azioni sull'apparato osseo

Oltre queste azioni dobbiamo aggiungere quelle a livello del Sistema Nervoso Centrale dove attraverso la regolazione dell'eccitabilità neuronale porta a:

- ✓ modificazioni del tono dell'umore e delle emozioni
- ✓ modulazione delle funzioni cognitive
- ✓ effetti neuroprotettivi
- ✓ modulazione delle percezioni dolorifiche
- ✓ regolazione del coordinamento motorio

Le azioni del progesterone sono invece le seguenti:

- ✓ Sviluppo dell' endometrio uterino dopo l'ovulazione
- ✓ Stimolazione della ghiandola mammaria
- ✓ Inibizione della contrazione dell' utero durante la gravidanza

- ✓ Azione centrale di inibizione della secrezione di gonadotropine
- ✓ Aumento della temperatura corporea

Di seguito riportiamo uno schema riassuntivo relativo alle variazioni ormonali di estrogeno e progesterone durante un normale ciclo mestruale e durante la gravidanza:

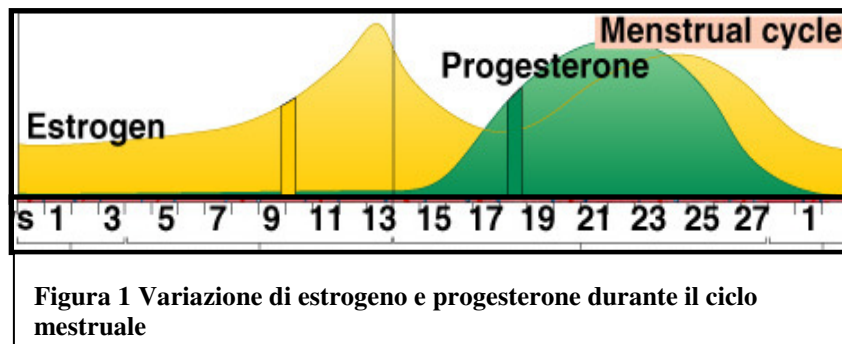


Figura 1 Variazione di estrogeno e progesterone durante il ciclo mestruale

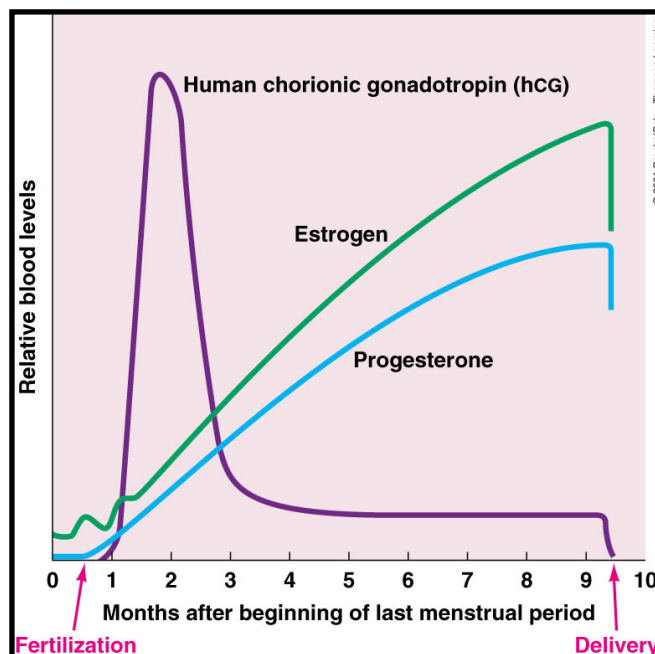


Figura 2 Variazione di estrogeno, progesterone e gonadotropina corionica durante la gravidanza

FATTORI ORMONALI IN GRAVIDANZA

Durante la gravidanza, la placenta forma grandi quantità di gonadotropina corionica, estrogeni, progesterone e somatomammotropina corionica. Di questi fattori i primi tre, ma forse anche il quarto, sono essenziali per il proseguimento della gravidanza.

Gonadotropina Corionica

La mestruazione normalmente compare all'incirca 14 giorni dopo l'ovulazione, quando l'endometrio secretivo si sfalda per la massima parte delle pareti uterine e viene espulso all'esterno. Se ciò dovesse verificarsi dopo l'impianto dell'uovo fecondato, la gravidanza verrebbe interrotta. Ma ciò viene impedito dalla secrezione di gonadotropina corionica umana HCG.

La HCG stimola il corpo luteo a secernere quantità ancora più elevate dei suoi ormoni abituali, progesterone ed estrogeni. E questi ormoni sessuali fanno sì che l'endometrio continui a crescere ed immagazzinare grandi quantità di materiale nutritivo, invece di essere in gran parte perduto con la mestruazione. Ne consegue che le cellule deciduo simili che si sviluppano nell'endometrio durante il normale ciclo sessuale femminile diventano vere cellule deciduali a funzione nutritiva, non appena la blastocisti si impianta. Sotto l'influenza di HCG, il corpo luteo cresce raggiungendo un volume all'incirca doppio di quello iniziale a circa un mese dall'inizio della gravidanza, e la sua ininterrotta secrezione di estrogeni e di progesterone mantiene le caratteristiche deciduali dell'endometrio, necessarie per le prime fasi di sviluppo della placenta e degli altri tessuti del feto. Se il corpo luteo viene asportato prima della 7° settimana di gravidanza, ne consegue quasi sempre l'aborto, talvolta anche fino alla 12° settimana, benché a partire da questa epoca la placenta stessa secerne progesterone ed estrogeni in quantità sufficienti a mantenere lo stato gravidico per il resto del periodo di gestazione. Il corpo luteo, poi, involge lentamente dopo il 3°- 4° mese di gravidanza.

Secrezioni di estrogeni dalla placenta

La placenta, come il corpo luteo, secreta sia estrogeni che progesterone. Ricerche fisiologiche ed istochimiche indicano che anche questi due ormoni, come la maggior parte degli altri ormoni placentari sono secreti dal sincizio trofoblastico. La produzione giornaliera di estrogeni aumenta marcatamente verso la fine della gravidanza fino a raggiungere una quantità assai più elevata di quella giornalmente prodotta verso la metà di un normale ciclo mestruale.

Ma va tenuto presente che la secrezione placentare di estrogeno è del tutto differente da quella ovarica sotto diversi punti di vista. In primo luogo, l'estrogeno secreto è per circa nove decimi estriolo il quale nella donna non gravida si forma solo in piccole quantità. È per questo motivo, considerato il potere estrogeno molto basso dell'estriolo, che in termini di attività estrogenica totale l'aumento degli estrogeni verso la fine della gravidanza è solo nell'ordine di 20-30 volte rispetto alla loro secrezione giornaliera alla metà di un normale ciclo. In secondo luogo, gli estrogeni placentari non vengono sintetizzati ex novo dalla placenta. Questa invece li forma a partire dal deidroepiandrosterone. Questo formato nelle surrenali del feto, viene trasportato con il sangue fetale alla placenta e quivi convertito in estradiolo ed estrone, mentre il 16-idrossideidroepiandrosterone, derivato dal deidroepiandrosterone, viene trasformato in estriolo. Nel corso della gravidanza la grande quantità di estrogeni determina:

1. ingrossamento dell'utero
2. ingrossamento delle mammelle e sviluppo della ghiandola mammaria
3. ingrossamento dei genitali esterni della donna.

Gli estrogeni, inoltre, fanno rilasciare i vari legamenti pelvici in modo da rendere sia le articolazioni sacroiliache sia la sinfisi pubica maggiormente elastiche. Queste modificazioni, ovviamente rendono più agevole il passaggio del feto attraverso il canale del parto.

Vi sono buone ragioni di credere che gli estrogeni agiscano altresì durante la gestazione, influenzando, per esempio, la riproduzione cellulare nelle prime fasi dell'embrione.

Secrezione placentare di progesterone

Anche il progesterone è un ormone essenziale per la gravidanza. Oltre ad essere secreto in modiche quantità dal corpo luteo, all'inizio della gravidanza, viene secreto in forti quantità dalla placenta, fino a raggiungere all'incirca circa 0,25 g al giorno, verso la fine della gravidanza. In effetti, la secrezione giornaliera di progesterone nel corso della gravidanza aumenta di ben 10 volte.

Le speciali funzioni del progesterone, indispensabili per il normale proseguimento della gravidanza, sono le seguenti:

1. come già ricordato in precedenza, il progesterone induce lo sviluppo di cellule deciduali nell'endometrio, le quali rivestono un ruolo per la nutrizione dell'embrione i primi stadi
2. il progesterone ha la speciale proprietà di inibire la contrattilità dell'utero gravido, evitando la possibilità di un aborto spontaneo;
3. il progesterone contribuisce altresì allo sviluppo dell'uovo prima ancora che si impianti, in quanto esalta specificamente le secrezioni tubariche ed uterine, le quali forniscono appropriati materiali nutritivi per lo sviluppo della morula e della blastocisti.

Vi è, inoltre, qualche evidenza sperimentale per ritenere che il progesterone influenzi anche la divisione cellulare nelle prime fasi dello sviluppo embrionale e contribuisce altresì a preparare le mammelle per la lattazione.

Somatammotropina corionica umana

Recentemente è stato scoperto un nuovo ormone placentare chiamato somatammotropina corionica umana che comincia ad essere secreto verso la quinta settimana di gravidanza e la cui secrezione aumenta progressivamente per tutto il resto della gestazione, in proporzione diretta con il peso della placenta; ma le sue funzioni non sono state ancora completamente chiarite.

In primo luogo, somministrata a varie specie animali provoca lo sviluppo almeno parziale delle mammelle e in alcuni casi induce lattazione. Ma i tentativi effettuati su soggetti umani di promuovere la lattazione con l'impiego di questo ormone non hanno avuto successo.

In secondo luogo, ha in lieve misura effetti simili a quelli dell'ormone della crescita e come questo provoca un aumento delle proteine tissutali. Ma per indurre tale effetto sono necessarie dosi da 100 a 200 volte maggiori rispetto a quelle di ormone somatotropo.

In terzo luogo, si è trovato recentemente che effetti importanti sul metabolismo materno, effetti che forse hanno un ruolo rilevante per la nutrizione del feto.

L'ormone riduce la sensibilità all'insulina ed anche l'utilizzazione del glucosio da parte dell'organismo materno, rendendo perciò disponibili per il feto maggiori quantità di questo zucchero. E poiché il glucosio è il principale substrato utilizzato dal feto a scopo energetico l'importanza di questo effetto risulta ovvia. Inoltre promuove la mobilizzazione di acidi grassi liberi dalle riserve adipose della madre, fornendo così una fonte alternativa di energia per il suo metabolismo.

Secrezione ovarica di relaxina

Oltre agli estrogeni ed al progesterone, si può isolare dal corpo luteo e dalla placenta un'altra sostanza ormonale, detta relaxina un polipeptide di peso molecolare di circa 9.000. L'iniezione di questa sostanza determina rilasciamento dei legamenti della sinfisi pubica, nel ratto e nella cavia in estro. Effetto però molto modesto nella donna gravida.

FATTORI ORMONALI CHE ESALTANO LA CONTRATTILITÀ UTERINA

Rapporto estrogeni / progesterone

Il progesterone inibisce la contrattilità dell'utero nel corso della gravidanza, impedendo così l'espulsione del feto. D'altra parte, gli estrogeni hanno una netta tendenza ad esaltare la contrattilità uterina. Entrambi questi ormoni vengono secreti in quantità crescenti durante la maggior parte della gravidanza, ma a partire dal settimo mese la secrezione degli estrogeni continua ad aumentare mentre quella di progesterone resta costante o forse anche diminuisce leggermente. Si è perciò postulato che il rapporto estrogeni/progesterone aumenti tanto, verso la fine della gestazione, da

costituire un fattore responsabile, almeno in parte, della esaltata contrattilità uterina.

Azione dell'ossitocina sull'utero

L'ossitocina è un ormone secreto dalla neuroipofisi, il quale specificamente provoca la contrazione dell'utero.

Vi sono 4 motivi per ritenere che l'ossitocina possa avere particolare importanza nell'esaltare la contrattilità dell'utero in prossimità del termine della gravidanza:

1. la reattività dell'utero a una determinata dose di ossitocina aumenta negli ultimissimi mesi di gravidanza;
2. la secrezione di ossitocina aumenta considerevolmente al momento del travaglio;
3. benché, dopo ipofisectomia, sia in animali che nella specie umana, sia ancora possibile il parto al termine della gestazione, in queste condizioni, tuttavia, il travaglio risulta notevolmente più lungo;
4. recenti indagini su animali indicano che la stimolazione e lo stiramento del collo dell'utero, come accade durante il travaglio, può dare origine ad un riflesso che esalta la secrezione di ossitocina da parte della neuroipofisi.

Recenti evidenze hanno inoltre dimostrato che durante la gravidanza si osservano delle brusche variazioni nell'espressione genica dei recettori GABA_A disposti sulla membrana dei neuroni che producono ossitocina (Brussaard *et al.*, 2000). Nei neuroni ipotalamici che producono ossitocina si osserva una diminuzione a breve termine dell'espressione dei recettori GABA_A postsinaptici poco prima del parto. In questi neuroni è stato dimostrato che durante la fase non produttiva vi è una equità di presenza di recettori GABA_A che contengono la subunità α_1 e recettori con subunità α_2 . Durante la gravidanza invece si osserva un aumento di α_1 rispetto alla α_2 . Questo comporta un aumento dell'inibizione dell'eccitabilità dei neuroni che producono ossitocina che ancora non deve svolgere le sue peculiari funzioni. Poco prima del parto, quando la disponibilità di ossitocina deve essere alta, si osserva uno shift dell'espressione di α_2 che diventa maggiore della α_1 inducendo una diminuzione della inibizione

di questi neuroni che inizieranno a rilasciare una quantità alta di questo importante ormone

STATI EMOZIONALI NELLA DONNA

I disordini riguardanti la sfera emozionale sono comuni e disabilitativi. Le donne hanno un aumentato rischio per i disordini d'ansia e appare che fattori di regolazione ormonale contribuiscano alla preponderanza di questa vulnerabilità (Pigott, 2003).

I disordini d'ansia e dell'umore sono spesso esacerbati durante la tarda fase luteale, e l'evidenza di un peggioramento causato da sintomi premestruali è stato suggerito con le scoperte di studi prospettici (Wittchen *et al*, 2002; McLeod *et al*, 1993) e retrospettici (Cameron *et al*, 1988; Williams *et al*, 1997) in donne con GAD, disturbo da panico, OCD o ansia sociale.

Sintomi ansiosi, quali paura, preoccupazione o nervosismo, non sono coerentemente osservati nella sindrome premestruale, anche se potrebbe esserci un'aumentata vulnerabilità ad uno stato simil-panico, nel periodo premestruale, caratterizzato da irritabilità e tensione anticipatoria.

Si conosce ben poco dell'ansia durante la gravidanza, il periodo postpartum e la lattazione. Ancora poco è conosciuto sulle interazioni delle fluttuazioni dei livelli di estrogeni e progesterone e i sintomi dei disordini ansiosi nel periodo perinatale, o sull'effetto della gravidanza sull'efficacia dei farmaci ansiolitici. In generale, sembra che la gravidanza non sia protettiva verso tutti i disordini ansiosi.

Dopo il parto le neo-madri potrebbero essere particolarmente vulnerabili ai disordini ansiosi. Pare che i disturbi da panico (Cohen *et al*, 1994; Sholomskas *et al*, 1993; Wisner *et al*, 1996) e l'OCD (Williams and Koran 1997; Maina *et al*, 1999; Sichel *et al*, 1993) siano esacerbati o emergano proprio durante questo periodo. Ossessioni intrusive relazionate al far del male al nascituro, sono comuni in donne con OCD postpartum (Levine *et al*, 2003).

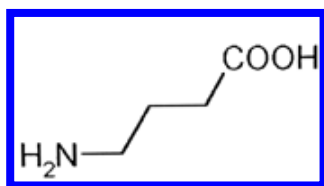
Dati emergenti suggeriscono che durante la lattazione si osservano sintomi benefici che potrebbero fungere da protezione dall'ansia postpartum, provvedendo ad una graduale fisiologica transizione dallo stato gravido a quello non gravido (Carter *et al*, 2001). Studi su animali hanno infatti dimostrato un

incremento del neurotrasmettitore inibitorio GABA durante la lattazione (Kendrick *et al.*, 1992).

Un'importante sistema fisiologico implicato nel regolare gli stati d'ansia è infatti il sistema GABAergico. E' bene ricordare che tra i metaboliti del progesterone, che come accenato precedentemente, occupa un ruolo fondamentale come regolatore ormonale delle varie fasi del ciclo sessuale, annoveriamo l'allopregnanolone e il THDOC che sono considerati come i più potenti e efficaci modulatori positivi endogeni della funzione dei recettori GABA_A.

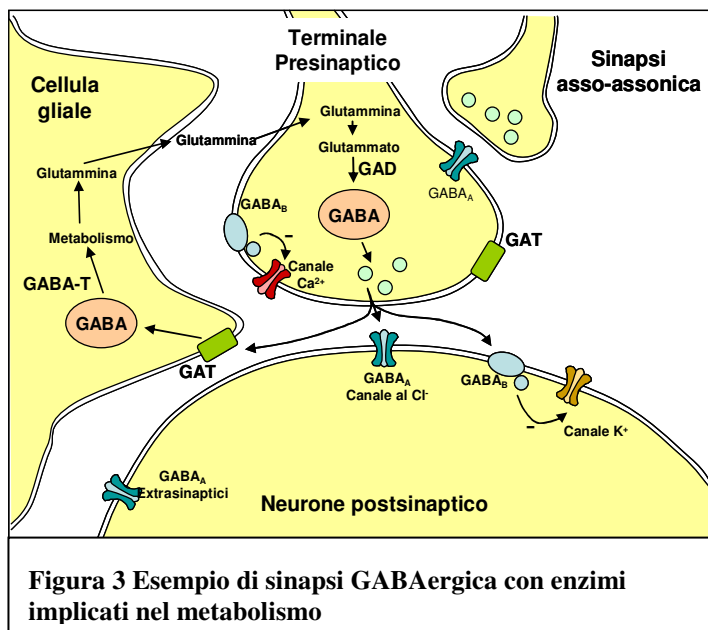
SISTEMA GABAERGICO

Acido γ -aminobutirrico



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) 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). L'effetto GABAergico è mediato dall'azione su recettori metabotropici e ionotropici, localizzati nei terminali pre- e post- sinaptici.

L'azione sinaptica del GABA è terminata ad opera dalle proteine di reuptake del neurotrasmettitore (GATs) presenti nelle membrane citoplasmatiche dei terminali nervosi e delle cellule gliali astrocitarie circostanti.



Quindi, la degradazione è catalizzata dall'enzima GABA- α -chetoglutarico-transaminasi (GABA-T), che lo deamina a semialdeide succinica la quale viene ossidata, a sua volta, ad acido succinico ad opera della semialdeide-succinico-deidrogenasi NAD-dipendente. Il gruppo amminico 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.

RECETTORI GABAERGICI

Il GABA è capace di interagire con due classi di recettori specifici, recettori ionotropici, che comprendono i recettori denominati GABA_A e GABA_C, e recettori metabotropici denominati GABA_B

Recettore GABA_A

Il recettore GABA_A è il principale e più diffuso sito d'interazione del neurotrasmettitore GABA, attraverso il quale i neuroni GABAergici esercitano le loro azioni fisiologiche.

Il recettore GABA_A 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 GABA_A è un complesso etero-pentamerico formato da cinque subunità

glicoproteiche (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 é accoppiato direttamente ad un canale ionico che, nel caso del recettore GABA_A, 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 alfa 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 chinasi Ser/Thr- e Tyr-dipendenti (Fig. 4). Questa topologia tetraelicale delle subunità si ritrova in tutti i membri della superfamiglia recettoriale (Fig. 4).

Nel corso degli ultimi 19 anni, sono state identificate, mediante clonazione del DNA complementare (cDNA) specifico, diverse classi di subunità (α , β , γ , δ , ϵ , π e ρ) dal SNC dei mammiferi (Barnard *et al.*, 1998), e

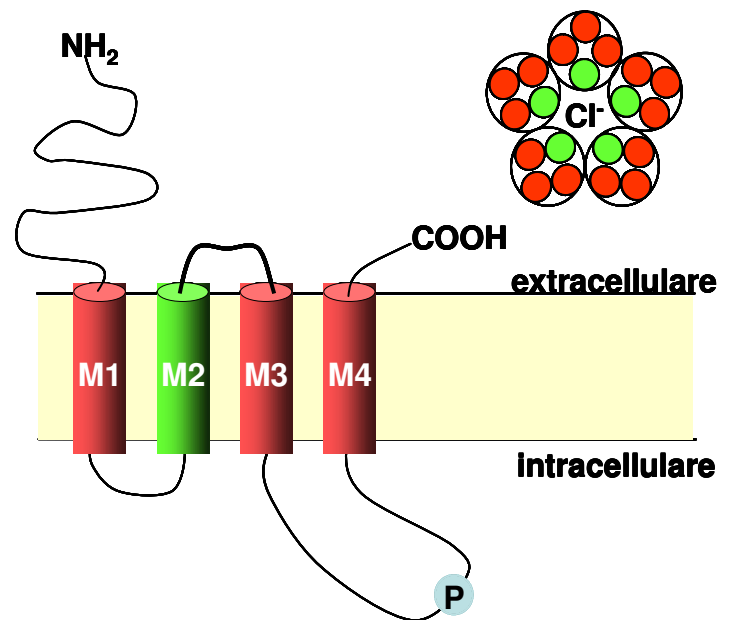


Figura 4 Tipica struttura aminoacidica di una subunità del recettore GABA_A con i 4 domini transmembrana; in evidenza M2 che costituisce le pareti del canale. In alto a destra recettore costituito dalle 5 subunità

recentemente, 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 π possano sostituire la subunità γ in questi recettori (Hedblom and Kirkness, 1997), mentre la subunità θ potrebbe sostituire una subunità β (Sieghart *et al.*, 1999).

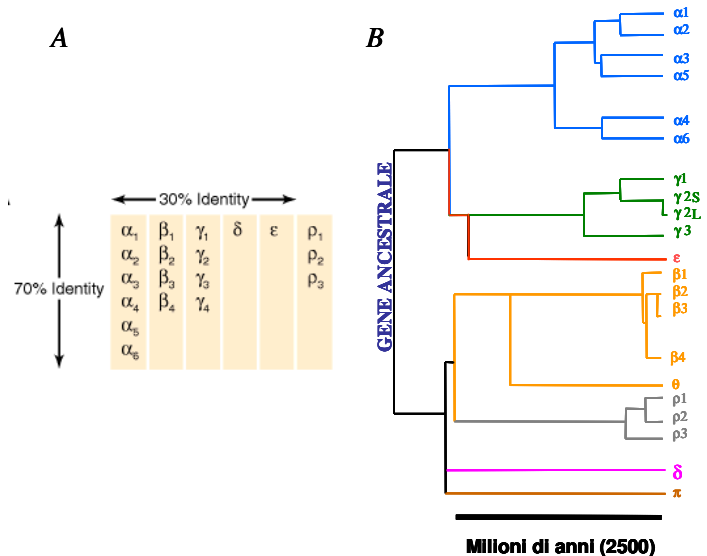


Figura 5 A. Grado di omologia delle differenti subunità del recettore GABA_A. **B.** Derivazione da un gene ancestrale delle diverse isoforme

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).

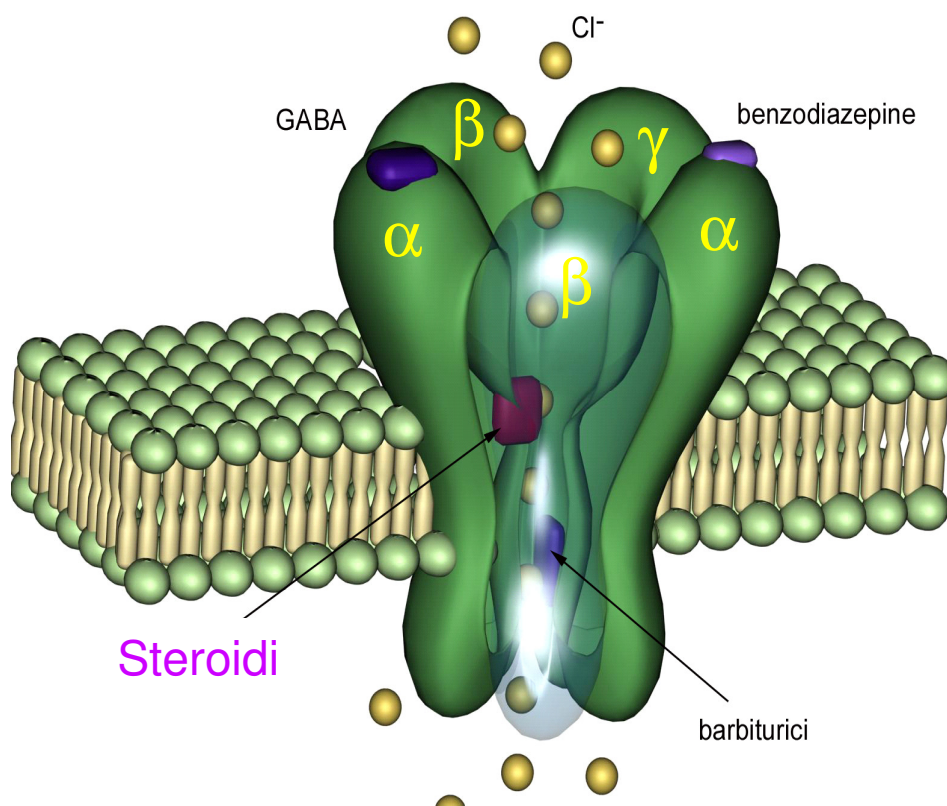


Figure 6 Struttura in 3D di un recettore GABA_A correlata ad una rappresentazione dei siti d'azione di differenti classi di farmaci

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 GABA_A

Per quanto riguarda la sensibilità farmacologica dei recettori GABA_A, 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 GABA_A e l'etanolo, 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⁻ e 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 GABA_A 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 GABA_A 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'etanolo e del drinking behaviour (Cooper, 1989) e nell'epilessia (Spencer *et al.*, 1994).

Diversi tipi d'inibizione mediata da recettori GABA_A

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. 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, chiamate quanti, si fondono spontaneamente con la membrana presinaptica. L'esocitosi indipendente dall'attività elettrica si svolge nelle sinapsi del Sistema Nervoso Periferico e del Sistema Nervoso Centrale e genera correnti postsinaptiche inibitorie spontanee di piccola ampiezza (Katz, 1969), anche chiamate correnti post-sinaptiche eccitatorie o inibitorie in miniatura (mEPSC o mIPSC, o "minis") (Bekkers and Stevens, 1989).

Questi *minis* mostrano una bassa frequenza (Bekkers *et al.*, 1990; Forti *et al.*, 1997) che indica bassa probabilità di rilascio di neurotrasmettitore in assenza di depolarizzazione pre-sinaptica anche se nell'ultimo decennio è stata descritta l'esistenza sia di sinapsi ad alta che a bassa probabilità di rilascio di neurotrasmettitore. Soffermiamo la nostra attenzione sulle caratteristiche dei

minis osservate durante un'analisi elettrofisiologia di una sinapsi GABAergica. I parametri fondamentali studiati di una mIPSC, come mostrato in figura, sono:

- ✓ l'ampiezza o altezza delle mIPSC misurata in pA (picoAmpere) evocata dall'interazione di un quanto di neurotrasmettitore con il recettore GABA_A.
- ✓ il rise-time cioè il tempo necessario (ms) affinché venga raggiunta l'ampiezza massima della mIPSC.
- ✓ il decay-time o tempo di decadimento della corrente, cioè il tempo necessario perché la curva torni ai valori basali (linea di base). Si tratta di un parametro molto importante per determinare il grado di attivazione dei recettori rispetto al tempo. Nel caso di cinetiche di decadimento che presentano più componenti, viene utilizzata, come parametro matematico, la costante del tempo di decadimento τ_w , che è una costante ponderata, e che tiene conto della costante rapida (τ_f) e di quella lenta (τ_s), ed è calcolata mediante la formula seguente: $\tau_w = (\tau_f \times A_f) + (\tau_s \times A_s) / (A_f + A_s)$, dove A_f e A_s sono le ampiezze in corrispondenza di τ_f e τ_s (Banks *et al.*, 1998; Vicini *et al.*, 2001)
- ✓ l'area, un parametro ugualmente importante che è ovviamente correlata sia all'ampiezza della mIPSC sia al valore del decay-time.

L'attività spontanea è un'attività indotta dalla cellula e generalmente registrata

in modalità "gap-free" o registrazione continua. Le risposte evocate invece sono indotte dall'operatore e registrate come singoli eventi.

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).

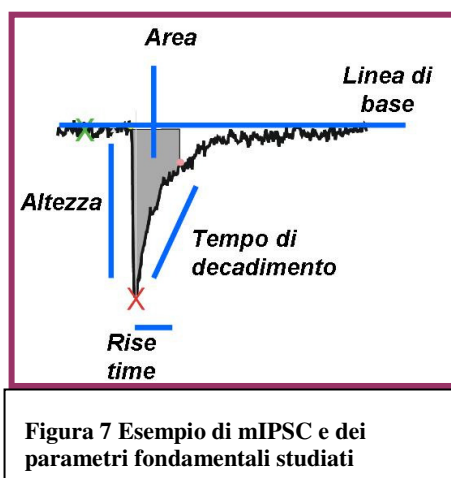


Figura 7 Esempio di mIPSC e dei parametri fondamentali studiati

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.

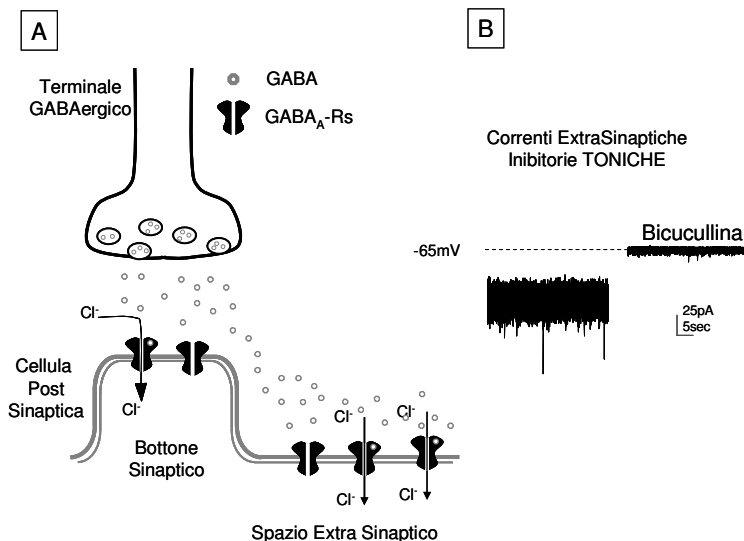


Figura 8 A. Rappresentazione del rilascio di GABA con attivazione sia dei recettori sinaptici sia di quelli extrasinaptici; B. Tracciato esemplare di correnti extrasinaptiche inibitorie toniche

Recentemente, è stato chiarito che distinti sottotipi di recettori GABA_A partecipano a due tipi di controllo inibitorio. Questa peculiarità è dovuta non

solo a diversi tipi di recettori GABA_A 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 GABA_A sinaptici (dovuta al rilascio locale di GABA dai terminali presinaptici) è responsabile della classica inibizione "fasica" (i recettori hanno la classica struttura: $\alpha_n\beta_n\gamma_n$), mentre la persistente attivazione dei

recettori GABA_A extrasinaptici (non ancorati al citoscheletro tramite la gefirina) genera una forma d'inibizione chiamata "tonica" (Fig. 16).

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:

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 μ M	~0,2 μ M
Sensibilità alle benzodiazepine	Sensibili	Insensibili
Sensibilità ai neurosteroidi	Sensibili	Molto sensibili
Caratteristiche cinetiche	Rapida desensitizzazione	Bassa desensitizzazione
% della trasmissione GABAergica	< 5%	> 90%

Tabella 1 Riassunto delle proprietà delle correnti fasiche e toniche mediate dal recettore GABA_A

In particolare:

- ✓ i recettori sinaptici sono costituiti da differenti subunità come α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , le varie β e le varie γ ; mentre i recettori extrasinaptici sono formati dalle subunità $\alpha_4\beta\delta$ nei neuroni granulari del giro dentato dell'ippocampo e dalle subunità $\alpha_6\beta\delta$ nei neuroni granulari del cervelletto di ratto.
- ✓ 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 .

- ✓ I recettori extrasinaptici mostrano un tempo di desensitizzazione molto lungo a differenza dei recettori sinaptici che hanno una desensitizzazione rapida.
- ✓ I recettori extrasinaptici mediano correnti toniche che costituiscono circa il 90% di tutto il tono inibitorio GABAergico del SNC.

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 gliari, 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 rappresenta 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 ($< 100 \mu\text{M}$) 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.

Recettori GABA_B

I recettori GABA_B, a differenza dei GABA_A, sono recettori metabotropici accoppiati a proteine G inibitorie (Bowery *et al.*, 1987), sono attivati selettivamente dal derivato del GABA, β -p-clorofenil GABA (baclofen) e, al contrario dei recettori GABA_A, sono insensibili alla bicucullina e al muscimolo. Sono accoppiati a canali permeabili al Ca^{2+} e al K^+ (Mott & Lewis, 1994). La loro localizzazione a livello del SNC è ubiquitaria come anche la localizzazione a livello sinaptico. Troviamo infatti recettori GABA_B sia a livello presinaptico, dove grazie all'interazione col GABA regolano il rilascio di GABA e glutammato, promuovendo una inibizione della loro liberazione, sia a livello postsinaptico dove l'attivazione di tali recettori media l'apertura di canali al K^+ con conseguente iperpolarizzazione postsinaptica (Gage, 1992).

I recettori GABA_B sono i recettori metabotropici del neurotrasmettitore inibitore GABA. L'interazione del GABA con questo complesso recettoriale attiva un sistema dei secondi messaggeri che modulano l'attività di canali al Ca^{2+} e al K^+ , controllando in tal modo il rilascio presinaptico di neurotrasmettitore e riducendo quindi la neurotrasmissione a livello postsinaptico. Quindi la funzione principale dei recettori GABA_B a livello presinaptico è quella di autoregolare il rilascio di GABA quando le concentrazioni sinaptiche del neurotrasmettitore diventano eccessivamente alte. Sono state evidenziate, sulla base di differenze farmacologiche, eterogeneità dei recettori pre e post sinaptici.

I recettori $GABA_B$ sono quindi importanti per tenere sotto controllo l'eccitabilità neuronale. Una riprova scientifica di questa importante funzione fisiologica è evidenziata da esperimenti in topi Balb/c che sono privi della subunità $GABA_{B1}$ (knok-out $GABA_{B1}$). Questi topi sono vitali ma mostrano convulsioni spontanee e alterazioni della memoria. Sotto l'applicazione di un agonista $GABA_B$, non mostrano né il tipico rilassamento muscolare, né ipotermia o modificazioni delle onde δ di un tracciato elettroencefalografico EEG se comparati con topi wild-tipe.

Queste recenti scoperte, ottenute sia grazie a esperimenti comportamentali sia grazie alla neuropsicofarmacologia, hanno permesso di dimostrare che la mancanza della subunità $GABA_{B1}$ comporta una perdita di tutte le riposte biochimiche ed elettrofisiologiche del $GABA_B$ nei topi privi di subunità $GABA_{B1}$. Da queste evidenze si può concludere che il $GABA_{B1}$ è un componente essenziale dei recettori $GABA_B$ pre e post-sinaptici.

Recettori $GABA_C$

I recettori $GABA_C$ sono localizzati principalmente nella retina, espressi sulla membrana delle cellule bipolari e, come i $GABA_A$, sono recettori ionotropi accoppiati a un canale al Cl^- ma distinguibili dai recettori $GABA_A$ e $GABA_B$ in quanto insensibili sia alla bicucullina che al baclofen. Sono invece molto sensibili al blocco della picrotossina così come i $GABA_A$. Sono formati unicamente da subunità ρ e per questo sono detti omomerici (Bormann, 2000).

STEROIDI SINTESI E METABOLISMO

Steroidogenesi

Tutte le molecole steroidee possiedono una struttura base, detta ciclopentenperidrofenantrene, costituita da 3 anelli a 6 atomi di carbonio e da 1 a 5 atomi di carbonio. Gli ormoni steroidei si dividono in 3 gruppi principali, a seconda del numero di atomi di carbonio che possiedono:

1. pregnano- struttura di base dei corticoidi e dei progestinici a 21 atomi di carbonio (C21);
2. androstano- comprende gli androgeni a 19 atomi di carbonio (C19);

3. estrano- a cui appartengono gli estrogeni aventi 18 atomi di carbonio (C18). (Miller WL.,1998)

Come gli altri ormoni steroidei anche quelli ovarici derivano dal colesterolo. L'ovaio può sintetizzare il colesterolo a partire da precursori a 2 atomi di carbonio oppure utilizzare come substrato delle lipoproteine a bassa densità (LDL) circolanti.

Gli enzimi steroidogenici fanno parte del gruppo delle ossidasi con citocromo P450. La prima tappa della biosintesi steroidea è la trasformazione del colesterolo in pregnenolone mediante l'idrossilazione del C20 e del C22 e la successiva scissione della catena laterale grazie all'ossidasi P450_{scc} mitocondriale. La biosintesi steroidea prosegue seguendo 2 vie:

- ✓ quella dei Δ^5 -3 β -idrossisteroidi, che porta alla formazione di 17-idrossipregnenolone e di deidroepiandrosterone (DHEA)
- ✓ quella dei Δ^4 -3-chetosteroidi, con formazione di progesterone, 17 α -idrossiprosterone e androstenedione (A).

Attraverso la via dei Δ -3 β -idrossisteroidi il pregnenolone viene convertito a 17 α - idrossipregnenolone, che la P450_{c17} desmolasi trasforma in DHEA. Quest'ultimo viene convertito in A dalla 3 β -idrossisteroidodeidrogenasi. L'A e il testosterone (T) suo derivato per azione della 17 β -idrossisteroidodeidrogenasi, sono rapidamente trasformati nei corrispondenti estrogeni fenolico-steroidi C18 (estrone ed estradiolo), mediante reazioni microsomiali di aromatizzazione. L'aromatizzazione è mediata dall'aromatasi P450, situata nel reticolo endoplasmatico. (Speroff *et al*, 1997)

Nella via dei Δ^4 -3-chetosteroidi il pregnenolone viene direttamente convertito in progesterone, tramite una 3 β -idrossisteroidodeidrogenasi e una Δ^5 ,4-isomerasi; quest'ultimo, idrossilato a 17 α - idrossiprosterone, costituisce il precursore degli androgeni C19 (A e T).

Tutte le cellule steroidogeniche ovariche possiedono gli enzimi necessari per la produzione di progesterone, androgeni ed estrogeni. Tuttavia, nel follicolo ovarico prevale la via biosintetica dei Δ^5 -3 β -idrossisteroidi, che porta alla produzione di androgeni ed estrogeni ma non di progesterone, mentre la via dei Δ^4 -3-chetosteroidi predomina nel tessuto luteinico (Speroff *et al.*, 1997).

Biosintesi

Gli estrogeni circolanti sono principalmente di natura ovarica ed in misura minore derivano dalla conversione degli androgeni surrenalici nel tessuto adiposo. L'A ed il T prodotti dalle cellule ovariche sono rapidamente trasformati in estrone e, soprattutto in estradiolo. L'estriolo, invece, è prodotto solo in parte dall'ovaio, e deriva dalla metabolizzazione periferica di estrone ed estradiolo inquadrabile nei processi generali di detossificazione metabolica (Speroff *et al.*, 1997).

Non esiste una quota di progesterone prodotta a livello periferico nella donna gravida per cui il progesterone che si ritrova in circolo è esclusivamente di origine ovarica o surrenalica. Il progesterone viene escreto con le urine in parte (10- 20 %) sotto forma di pregnadiolo, in parte sotto forma di pregnatriolo, metabolita diretto del 17- idrossiprogesterone.

Metabolismo

Gli steroidi e i metaboliti attivi vengono escreti sotto forma di solfo- e glucurono-coniugati. Tale coniugazione da parte del fegato e della mucosa intestinale porta, di solito, ad una riduzione dell'attività dello steroide cui consegue l'escrezione con l'urina o con la bile. In alcuni casi però la coniugazione non determina l'inattivazione dello steroide oppure la forma attiva viene ripristinata a partire da quella inattiva a livello dei tessuti bersaglio.

Recettori e meccanismo d'azione

L'attività degli steroidi sessuali si esplica attraverso l'azione su un sistema di recettori intracellulari. I recettori per gli ormoni steroidei fanno parte di una superfamiglia che comprende recettori per gli ormoni tiroidei, la vitamina D3 e l'acido retinico. Per questo motivo alcuni ormoni possono legarsi a più di un recettore appartenente alla stessa superfamiglia. Questi recettori condividono 3 domini detti "regolatore", "legante il DNA" e "legante l'ormone". L'attivazione del recettore porta alla separazione dello stesso dalle proteine inibenti, ad un cambiamento conformazionale, ad una fosforilazione e, come risposta ormonale, all'alterazione della trascrizione di specifici geni. Il complesso ormone-recettore, infatti, legandosi a specifiche sequenze di DNA, regola la sintesi proteica intracellulare. Gli estrogeni sono in grado di indurre la

sintesi del loro recettore e di quelli per gli androgeni per i progestinici. Questo processo, detto di reintegrazione, ha luogo nel citoplasma anche se i recettori neosintetizzati raggiungono prontamente il nucleo. I progestinici, invece, i cui recettori mostrano due diverse conformazioni, sono in grado di inibire la sintesi recettoriale sia a livello trascrizionale che translazionale (Speroff *et al.*, 1997). Il sistema nervoso centrale è stato recentemente incluso tra le strutture target degli steroidi sessuali contribuendo alla scoperta di un loro effettivo ruolo nell'insorgenza delle modificazioni del tono dell'umore e delle performances cognitive.

Neurosteroidi

Numerose evidenze sperimentali indicano che alcuni steroidi neuroattivi possono venire sintetizzati anche a livello del sistema nervoso centrale. Pertanto il termine neurosteroidi include tutti quegli ormoni che sono sintetizzati a livello cerebrale sia de novo dal colesterolo che tramite la metabolizzazione in situ di precursori ematici (Mellon, 1994). I neurosteroidi agiscono, come altre sostanze psicoattive, quali le BDZ, i barbiturici ed i convulsivanti, a livello dei recettori GABA_A. La loro attività risulta essere bimodale, in quanto alcuni sono GABA_A agonisti (3 α ,5 α -THP, THDOC e androsterone), altri GABA_A antagonisti (pregnenolone e DHEAS) (Paul and Purdy, 1992)

La loro sintesi probabilmente procede attraverso vie differenti rispetto a quelle utilizzate a livello dei surreni delle gonadi e della placenta. Infatti quelli che hanno una struttura 3-idrossi-5 derivano dal colesterolo dopo la rottura di una catena laterale. Un citocromo P450 mitocondriale, coinvolto in questo processo, è stato ritrovato nel cervello di ratto, in particolare a livello della sostanza bianca. I tessuti cerebrali contengono una 5 α -reduttasi ed una 3 alfa-idrossisteroideossidoreduttasi steroidea, prevalentemente nel compartimento gliale. Questi enzimi riducono il progesterone a 3 α -idrossi-5 α -pregnan-20-one (allopregnanolone) e il deossicorticosterone ad allotetraidrosossicorticosterone (Mellon, 1994). Il DHEA a livello del sistema nervoso centrale origina probabilmente dal pregnenolone tramite una 17 α -idrossilasi-17-20 desmolasi (enzima P450 dipendente), così come accade nel surrene. Una tale attività enzimatica, peraltro, non è mai stata confermata a livello cerebrale, pertanto, ad oggi, l'origine del DHEA nel SNC resta ancora

sconosciuta. Il DHEA può essere metabolizzato nel SNC tramite la stessa via metabolica del pregnenolone e viene convertito ad A e quindi ridotto ad androsterone.

I neurosteroidi con attività sui recettori GABA_A esercitano un effetto anestetico ed ipnotico, mentre quelli con attività GABA_A antagonista possono esercitare anche un'azione proconvulsivante. Alcune delle attività degli steroidi neuroattivi nel ratto sono mediate dall'effetto modulatorio che questi esercitano sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e su quello ipotalamo-ipofisi-gonadi, tramite l'interazione con i recettori GABA_A (Genazzani *et al.*, 1995). I neurosteroidi sembrano essere coinvolti nei meccanismi di stress. I livelli cerebrali di pregnenolone risultano essere aumentati nelle condizioni di stress contribuendo ad incrementare il livello di attenzione e di allerta, necessario particolarmente nelle fasi iniziali dello stress.

D'altro canto gli elevati livelli di 3 α ,5 α -THP e di THDOC riscontrati nel plasma e nel cervello di ratto sottoposto a stress possono proteggere i neuroni da un iperstimolazione e paiono, dunque, esercitare il loro ruolo prevalentemente nelle fasi finali delle reazioni di stress. Le complesse reazioni agli eventi stressogeni potrebbero dunque essere almeno in parte modulate dal bilancio che si viene a creare tra i vari tipi di neurosteroidi.

Un coinvolgimento dei recettori GABA_A è stato dimostrato anche nella depressione e nell'ansia. Queste due condizioni patologiche si accompagnano, infatti, ad un incremento dei livelli cerebrali dei neurosteroidi eccitatori. Partendo dall'evidenza che alcuni neurosteroidi agiscono sull'eccitabilità neuronale è stato possibile ipotizzare, quindi, che gli stessi possano influenzare l'emotività ed il comportamento. La prevalenza degli steroidi neuroattivi eccitatori su quelli inibitori potrebbe essere correlata ad una personalità emozionalmente instabile, mentre una condizione opposta potrebbe determinare una maggiore stabilità. Un coinvolgimento degli steroidi nella modulazione di alcuni tratti della personalità è supportata dalla dimostrazione del fatto che soggetti con personalità più espansiva hanno livelli plasmatici di DHEA più elevati rispetto a soggetti meno espansivi.

I neurosteroidi sembrano svolgere un ruolo di primo piano anche nella modulazione delle funzioni cognitive. PS, DHEAS e DHEA, grazie al loro ruolo GABA antagonista, potenziano la memoria a lungo termine mentre gli steroidi

GABA agonisti, quali $3\alpha,5\alpha$ -THP, il THDOC e l'androsterone, potrebbero ridurre i processi mnemonici. Il ruolo del progesterone e dei suoi metaboliti ridotti nella modulazione delle funzioni cognitive è supportato dal fatto che in molte donne è possibile osservare una modificazione delle *performances* cognitive nelle varie fasi del ciclo mestruale.

Le modificazioni dei livelli dei neurosteroidi in gravidanza sembra essere correlata ad alcune modificazioni del tono dell'umore in questo periodo. Gli alti livelli di THP contribuirebbero alla sensazione di sonnolenza tipica della gravidanza, mentre il venir meno dell'azione ansiolitica di tali steroidi potrebbe facilitare l'insorgenza della depressione post-partum. Analoghe modificazioni steroideo-mediate dei recettori GABA_A sarebbero presenti durante il ciclo mestruale: la riduzione dei neurosteroidi ad azione ansiolitica nella fase premestruale potrebbe contribuire a determinare la caratteristica insorgenza della sintomatologia ad essa correlata.

E' ben noto che gli estrogeni esercitano un effetto modulatorio sulla sintesi ed sul rilascio di neurotrasmettitori e neuropeptidi, stimolano la crescita dendritica, le connessioni sinaptiche e la plasticità neuronale. Le conseguenze della carenza estrogenica a livello del Sistema Nervoso Centrale si evidenziano molto bene in epoca postmenopausale, poiché lo stato di ipogonadismo ipergonadotropo provoca un'alterazione dell'equilibrio esistente tra i sistemi neuroendocrini posti a controllo di numerosi centri dell'ipotalamo e del sistema limbico. La donna in postmenopausa si presenta inizialmente con sintomi clinici che coinvolgono il SNC quali la variazione dello stato dell'umore e del benessere psicofisico e con sintomi di tipo vasomotorio. Nella postmenopausa avanzata si manifestano le alterazioni delle funzioni cognitive, mnemoniche e patologie cronico-degenerative fino ad arrivare alla demenza di Alzheimer ed al morbo di Parkinson. D'altro canto la postmenopausa e l'invecchiamento in genere si associano ad una riduzione dei livelli plasmatici di numerosi steroidi tra cui il DHEA ed il DHEAS che, come si è visto, svolgono un ruolo primario in ambito cognitivo (Baulieu, 1995). L'importante ruolo che i neurosteroidi sembrano esercitare sulla funzione riproduttiva apre il campo a tutta una serie di indagini tese a valutare il rapporto neurosteroidi/estrogeni offrendo nuove prospettive di studio delle patologie della sfera riproduttiva e di quelle cronico-degenerative.

PLASTICITA' SINAPTICA

Al completamento dello sviluppo e della maturazione del sistema nervoso, le capacità di modificarsi del sistema nervoso centrale non vengono spente del tutto. Infatti anche un individuo adulto è in grado di apprendere nuovi comportamenti, di imparare nuove nozioni, di memorizzare nuovi episodi della propria vita. Le modificazioni plastiche del sistema nervoso centrale che sono alla base dei fenomeni di apprendimento e memoria consistono in variazioni dell'efficacia della trasmissione dei segnali tra cellule. Esperimenti condotti negli ultimi 20-30 anni hanno rivelato che l'efficacia di molte sinapsi può essere modificata per durate che vanno da pochi millesimi di secondo ad alcuni mesi. Attualmente si ritiene che durante l'apprendimento si verifichino appunto modificazioni di funzionamento delle sinapsi: tali variazioni possono quindi essere considerate il substrato biologico di una traccia mnemonica.

Plasticità sinaptica a breve termine

Alcune variazioni di efficacia sinaptica sono di breve durata, da alcuni millisecondi ad alcuni minuti. La facilitazione sinaptica è un aumento transitorio di efficacia sinaptica che avviene quando due o più

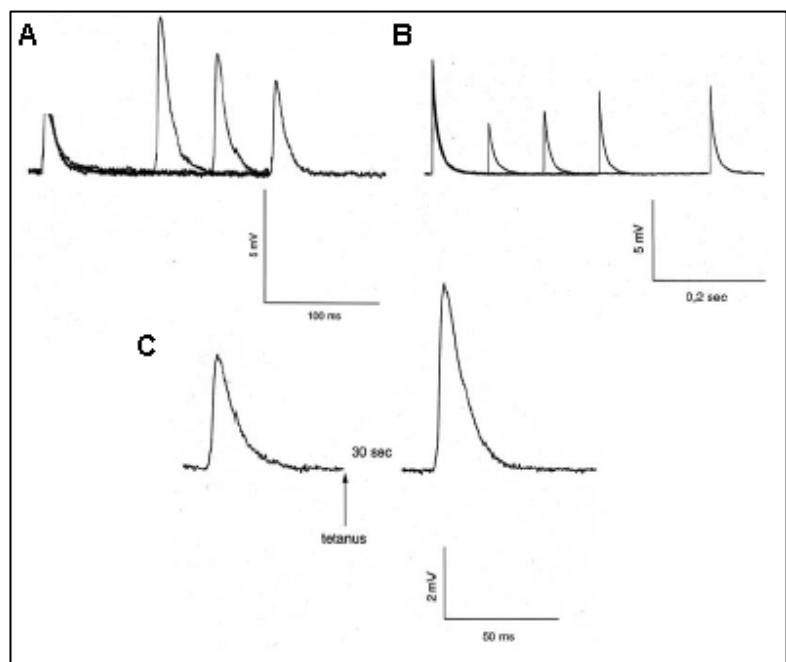


Figura 9. Rappresentazione schematica dei meccanismi di facilitazione e depressione sinaptica

potenziali d'azione raggiungono il terminale sinaptico di un assone in stretta successione, determinando un aumento progressivo della quantità di neurotrasmettitore rilasciato da ogni potenziale d'azione. Di conseguenza le variazioni di voltaggio che il neurotrasmettitore genera nella membrana della

cellula postsinaptica (potenziali post-sinaptici) diventano progressivamente più grandi (Fig. 9 A e C.). Per spiegare il meccanismo della facilitazione sinaptica bisogna partire dal fatto che l'evento fondamentale che provoca il rilascio di neurotrasmettitore è un aumento di ioni calcio (Ca^{2+}) all'interno del terminale sinaptico. Tale aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è causato dall'arrivo del potenziale d'azione ed è rapidissimo, avviene in meno di un millisecondo, per lo meno in corrispondenza della zona attiva, dove avviene l'esocitosi del neurotrasmettitore.

Invece, la ridiscesa del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ai livelli di riposo è più lenta, ed è possibile che un secondo potenziale d'azione raggiunga il terminale prima che il $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sia tornato ai livelli iniziali. In questo caso, il secondo aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ parte da un livello basale più elevato, raggiungendo quindi una concentrazione maggiore nel terminale. La conseguenza è che la più elevata concentrazione di Ca^{2+} causa il rilascio di una maggiore quantità di neurotrasmettitore.

La facilitazione sinaptica dura solo qualche frazione di secondo, e quindi è una forma di plasticità di durata molto breve.

In alcuni tipi di sinapsi un'attivazione ripetitiva provoca invece l'effetto opposto: la **depressione a breve termine** (Fig. 9 B). Questo fenomeno è spiegato dal fatto che in tali sinapsi un singolo potenziale d'azione determina il rilascio di così tante vescicole di neurotrasmettitore (sinapsi cosiddette ad "alta probabilità di rilascio") che l'arrivo di un secondo potenziale d'azione trova meno vescicole pronte per il rilascio. La depressione a breve termine può durare alcuni secondi, finché le vescicole che si sono svuotate non vengono sostituite da altre ed avviate ad essere nuovamente riempite e riutilizzate. Una rapida successione di molti potenziali d'azione, detta tetano, provoca un terzo tipo di plasticità sinaptica a breve termine, detto **potenziamento post-tetanico** (Fig. 10 C) . Questo è spiegato da un aumento talmente elevato di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nel terminale sinaptico, che i sistemi di tamponamento e di estrusione di questo ione vengono saturati e il $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rimane elevato molto più a lungo del normale. Questa prolungata elevazione di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ attiva dei processi che rendono un maggior numero di vescicole disponibili per il rilascio di neurotrasmettitore. In queste condizioni l'arrivo di un potenziale d'azione nel terminale sinaptico provoca il rilascio di una quantità di neurotrasmettitore maggiore del normale. Il potenziamento post-tetanico persiste per alcuni minuti. Va in ogni caso

considerato che, se da un lato si ritiene che questi meccanismi di plasticità sinaptica a breve termine possano essere implicati nella memoria a breve termine, dall'altro non ci sono attualmente ipotesi sufficientemente accreditate che spieghino le relazioni tra di esse.

Plasticità sinaptica a lungo termine

I fenomeni di memoria e di apprendimento che durano per giorni, settimane, mesi o anni richiedono delle modificazioni sinaptiche di più lunga durata. Tali modificazioni sono state scoperte in molte regioni del sistema nervoso centrale, ed in alcuni casi è stato possibile comprendere la relazione esistente tra il fenomeno cellulare (plasticità sinaptica) e quello cognitivo o comportamentale

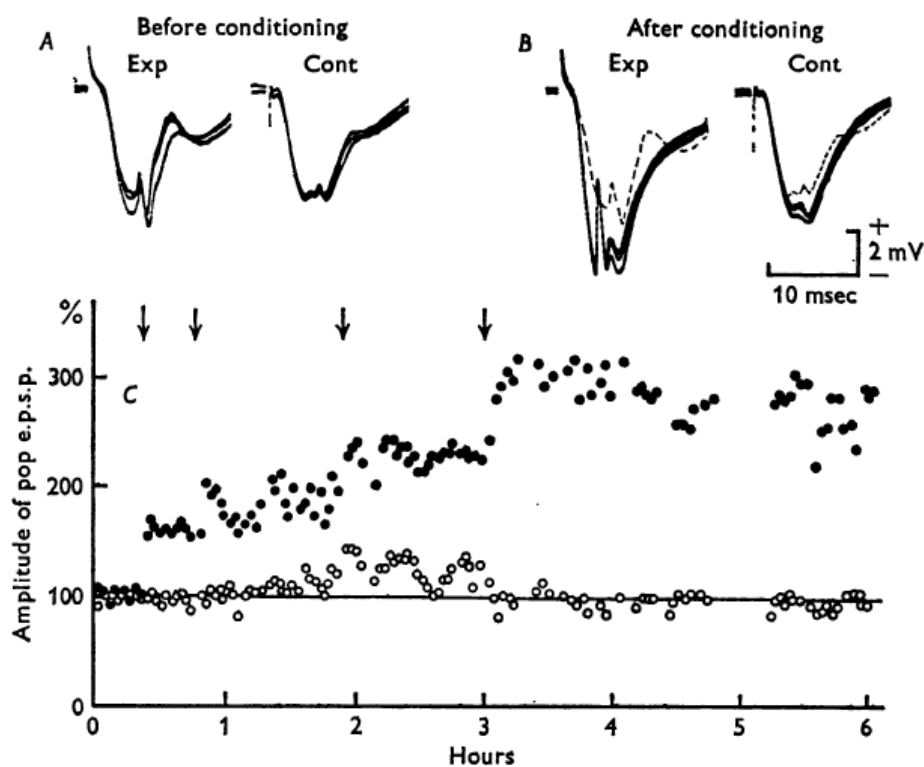


Figura 10. In questi esperimenti nel quale sono stati valutati i parametri standard dei potenziali evocati le risposte, ottenute nello strato sinaptico sia nelle vie di controllo che in quelle sperimentali, sono mostrate in A (prima della stimolazione), in B (2,5 ore dopo il quarto treno di stimolazioni). Il grafico C mostra l'ampiezza dei fEPSP nella via sperimentale (cerchi neri) e nella via di controllo (cerchi bianchi) in funzione del tempo. I punti sono stati ottenuti dalla media computata di trenta risposte attraverso la misurazione dell'ampiezza della curva negativa un millisecondo dopo il suo inizio. I valori sono riportati come percentuali della media dei valori di base. I treni di stimolazione (15 secondi per 10 secondi) sono stati dati attraverso un elettrodo disposto medialmente nei tempi indicati dalle frecce.

(apprendimento e memoria). Qui descriveremo il sistema cellulare più studiato a questo riguardo, che è costituito da una particolare sinapsi di una regione di cervello detta ippocampo. La plasticità sinaptica dell'ippocampo è stata correlata sia con la capacità di imparare a conoscere i luoghi in cui ci muoviamo (memoria spaziale) sia con la memorizzazione degli eventi della nostra vita. Agli inizi degli anni '70 Tim Bliss e collaboratori scoprirono che una breve stimolazione tetanica di un fascio di assoni nell'ippocampo di coniglio provocava un potenziamento della trasmissione sinaptica che persisteva per settimane (Bliss and Lomo, 1973, Bliss and Collingridge, 1993) (Fig. 10). Chiamarono questo fenomeno **potenziamento a lungo termine** ("long term potentiation", **LTP**). Nonostante i primi esperimenti fossero effettuati *in vivo*, gran parte di quello che conosciamo attualmente sui meccanismi di LTP deriva da registrazioni effettuate in fettine di ippocampo *in vitro*.

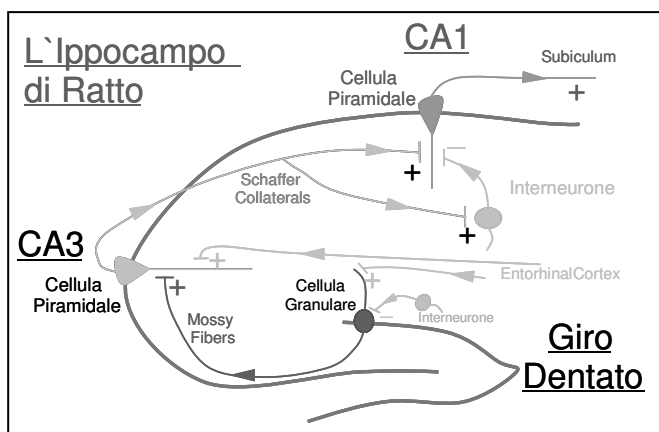


Figura 11. Rappresentazione schematica del circuito dell'ippocampo e delle relative connessioni

La maggioranza degli esperimenti su LTP sono stati effettuati studiando la funzione delle diverse sinapsi eccitatorie dell'ippocampo (Fig. 11). La formazione dell'ippocampo rappresenta una delle strutture, insieme all'amigdala, meglio conosciute e caratterizzate del sistema limbico. In generale il sistema limbico è coinvolto

nelle risposte viscerali e motorie inerenti la difesa e la riproduzione e nei processi legati alla memoria.

Connessioni con il talamo e la corteccia cerebrale vengono utilizzate per l'acquisizione di nuovi dati nella memoria. Col termine di ippocampo si intende sia l'ippocampo propriamente detto sia altre formazioni annesse, come il giro dentato e il subiculum. Queste tre strutture sono organizzate con una architettura molto semplice strutturata in strati, come mostrato nella Figura 11.

L'ippocampo è diviso in diverse zone: CA1, CA2 e CA3 il giro dentato.

La principale via eccitatoria arriva dalla corteccia entorinale attraverso la via Perforante che sinapta con i neuroni granulari del Giro Dentato. I neuriti di

questi neuroni sinaptano con i dendriti dei neuroni piramidali dell'area CA3 attraverso la via delle Mossy Fibers. Fibre collaterali dei neuroni CA3 vanno a sinaptare sia con interneuroni GABAergici che con i neuroni piramidali dell'area CA1 attraverso le fibre collaterali di Schaffer. A loro volta, i neuroni piramidali CA1 proiettano i loro assoni nuovamente alla corteccia entorinale. Le sinapsi eccitatorie sono prevalentemente glutammatergiche mentre tutti i circuiti inibitori, che hanno una prevalente azione di controllo dell'eccitabilità dei neuroni eccitatori, sono prevalentemente GABAergici. I circuiti eccitatori devono la loro funzione a recettori AMPA e NMDA mentre quelli inibitori comprendono recettori GABA_A e GABA_B. La maggiore via efferente riguarda comunque gli assoni dei neuroni piramidali CA1 che proiettano verso il subiculum, i nuclei laterali del setto, i bulbi olfattori, il nucleo accumbens, l'amigdala e l'ipotalamo.

In tutte queste regioni dell'ippocampo l'LTP è un fenomeno particolarmente intenso e riproducibile. La stimolazione delle fibre presinaptiche evoca un potenziale post-sinaptico eccitatorio (EPSP) che può essere registrato con un elettrodo intracellulare da una singola cellula (Fig. 12, traccia "controllo"). Se si stimola un fascio di fibre con un singolo impulso ogni 20-30 secondi, la risposta post-sinaptica rimane immutata. Se invece si somministra un treno di stimoli ad alta frequenza (tetano: 50 o 100 impulsi alla frequenza di 100 Hz) si ottiene un duraturo aumento dell'ampiezza del EPSP evocato, ovvero LTP (Fig. 4 tracce a 10, 30 e 45 minuti dopo il tetano). Quindi questa sinapsi si potenzia quando viene attivata in modo intenso e ripetitivo. Tuttavia, tale tipo di tetano rappresenta per la cellula una stimolazione molto intensa, e non ci sono prove conclusive sull'occorrenza, in condizioni fisiologiche, di scariche di potenziali d'azione sincroni in un fascio di fibre con caratteristiche simili ai tetani evocati sperimentalmente. Si è quindi cercato di sperimentare altri tipi di protocolli di stimolazione che meglio riproducessero i segnali che normalmente sono scambiati tra questi neuroni. Due protocolli che sembrano essere particolarmente efficaci e che allo stesso tempo sono simili alla scarica sincrona dei

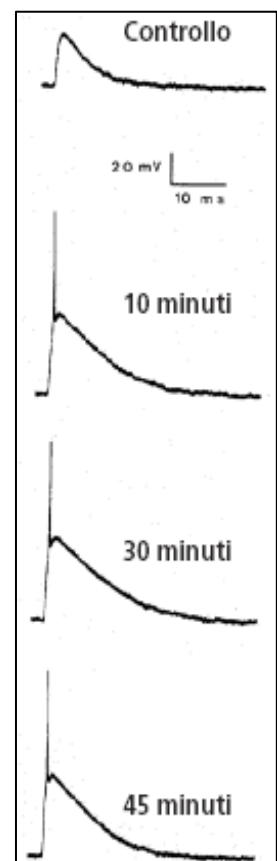


Figura 12 Esempio di variazione di un EPSP a seguito di stimoli ad alta frequenza

neuroni ippocampali durante l'apprendimento sono la "theta-burst stimulation" e la "primed-burst stimulation". La "theta-burst stimulation" consiste in più treni composti ciascuno da 4 impulsi alla frequenza di 100 Hz, ripetuti ogni 200 ms. La "primed-burst stimulation" è composta da un singolo impulso seguito a 200 ms di distanza da un solo treno di 4 impulsi alla frequenza di 100 Hz. L'efficacia di questi due protocolli, che riproducono i segnali che arrivano fisiologicamente alla sinapsi studiata, nell'indurre LTP dimostra che questo fenomeno non è un semplice "artefatto" di laboratorio, ma che può avvenire anche in vivo durante la memorizzazione di nuovi eventi.

Le tre proprietà basilari dell'LTP che lo rendono un ottimo modello per lo studio delle basi cellulari della memoria sono la cooperatività, l'associatività e la specificità dell'afferenza (Fig. 13).

La **cooperatività** consiste nella necessità di attivare non una singola fibra presinaptica, ma un numero sufficientemente grande di fibre che

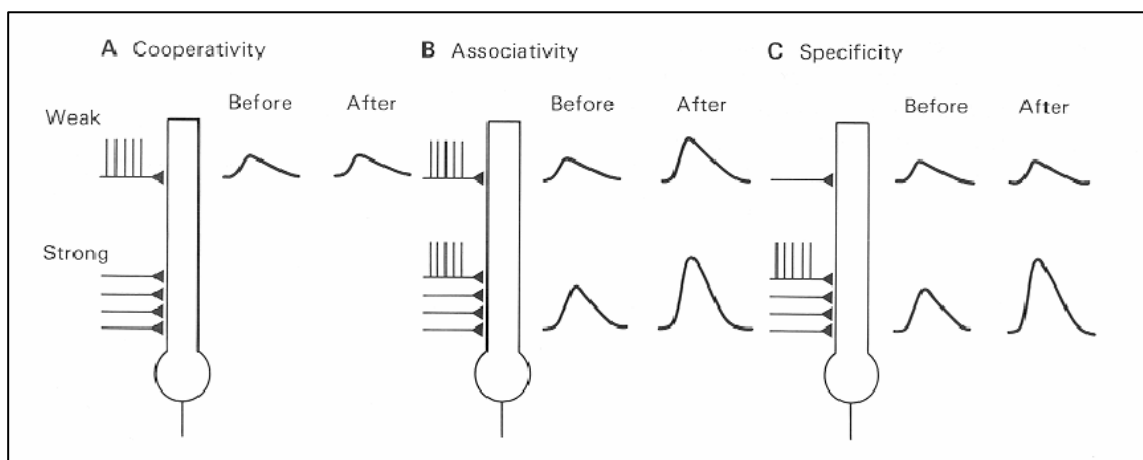


Figura 13. Proprietà del potenziamento a lungo termine: cooperatività, associatività e specificità.

"cooperano" nell'indurre nel neurone postsinaptico l'LTP. Tra l'effetto di una singola fibra e quello del numero sufficiente per indurre LTP esistono degli stati in cui l'attivazione di un numero intermedio di fibre evoca solo un potenziamento post-tetanico, della durata di pochi minuti, o un "potenziamento a breve termine" (PBT) della durata di 5-20 minuti. Esistono quindi delle "soglie" di cooperatività che, in ordine crescente, inducono potenziamento post-tetanico, PBT o LTP.

La **associatività** consiste nella possibilità di indurre LTP in un'afferenza con uno stimolo "debole", al di sotto della "soglia" per l'LTP, se questo viene associato ad uno stimolo "forte" somministrato ad un'altra afferenza che converga sulla stessa cellula. Infine l'LTP è **afferenza-specifico** perché le fibre che non sono attive durante il tetano non condividono il potenziamento indotto nella afferenza tetanizzata. Queste tre proprietà sono spiegabili con un'unica teoria, che in realtà fu enunciata già mezzo secolo fa dallo psicologo Donald Hebb, molti anni prima della scoperta della plasticità sinaptica a lungo termine (Hebb, 1950). Tale teoria predice, come regola di apprendimento neuronale, che una sinapsi si debba potenziare solo nel caso in cui venga attivata mentre la membrana postsinaptica è depolarizzata. In altre parole, per indurre la modificazione plastica di una sinapsi è necessaria la coincidenza temporale di due eventi: un'attivazione della sinapsi e una depolarizzazione dello stesso neurone postsinaptico nella regione cellulare in cui si trova il contatto sinaptico in questione. La necessità di attivare un sufficiente numero di fibre (cooperatività) o di coattivare un'afferenza sufficientemente potente (associatività) è spiegata dal secondo termine della coincidenza: la depolarizzazione del dendrite in cui si trova la sinapsi da potenziare. La specificità dell'afferenza è spiegata dal primo termine della coincidenza: la necessità che la sinapsi da modificare sia attiva. Alle altre sinapsi della stessa cellula non attive durante la depolarizzazione, in cui la membrana postsinaptica viene depolarizzata, mancherebbe questo elemento. Questa regola di induzione della plasticità sinaptica è stata confermata da esperimenti in cui la depolarizzazione postsinaptica veniva evocata direttamente, iniettando corrente depolarizzante con un elettrodo intracellulare. L'appaiamento di tale depolarizzazione con l'attivazione a bassa intensità e bassa frequenza di un'afferenza induceva LTP.

La "regola di apprendimento" che induce plasticità sinaptica è dunque la coincidenza di due eventi cellulari. Deve quindi esistere in queste cellule un sistema molecolare che funzioni come rilevatore di coincidenza. Tale rilevatore di coincidenza è stato identificato in un recettore ionotropico del glutammato noto come recettore NMDA. Tale recettore è un canale di membrana che viene fatto aprire dal legame del neurotrasmettitore glutammato, ma al potenziale di riposo della cellula tale apertura non ha nessun effetto perché il canale resta

bloccato dagli ioni magnesio (Mg^{2+}) presenti nel liquido extracellulare. Quindi il canale in questa situazione è aperto ma la corrente non fluisce a causa della presenza del Mg^{2+} . Una depolarizzazione della membrana in cui si trova il recettore ha l'effetto di espellere, per repulsione di cariche elettriche dello stesso segno, il Mg^{2+} che teneva bloccato il canale. La depolarizzazione da sola perciò sblocca il canale che tuttavia rimane chiuso. Quindi il canale-recettore NMDA può condurre una corrente di ioni solo se si verifica la coincidenza di due eventi: il legame del glutammato e la depolarizzazione della membrana. Il fatto di essere allo stesso tempo un recettore del glutammato e un canale bloccato in modo voltaggio-dipendente dal Mg^{2+} rende il recettore NMDA un rilevatore di coincidenza molecolare. Inoltre, l'andamento insolitamente lento della corrente NMDA insieme alla sua voltaggio-dipendenza rendono le risposte mediate da questo recettore particolarmente soggette agli effetti delle sinapsi inibitorie. Questa sensibilità all'inibizione, insieme alla depressione a breve termine delle sinapsi inibitorie, rende ragione della necessità di treni di impulsi di stimolazione ad alta frequenza per vincere l'inibizione ed aumentare progressivamente la corrente NMDA. Il ruolo centrale del recettore NMDA nell'induzione dell'LTP è dimostrato dal fatto che in tutti gli esperimenti in cui si è bloccato tale recettore con molecole agenti con diversi meccanismi e su diverse parti del complesso molecolare del recettore veniva abolito l'LTP. Tuttavia l'applicazione di un agonista selettivo per i recettori NMDA non è sufficiente per indurre LTP anche se permette di indurre facilmente potenziamento a breve termine. Anzi, addirittura un'attivazione dei recettori NMDA con un agonista, oltre che non indurre LTP, sembra precludere un successivo LTP evocato con uno stimolo altrimenti adeguato.

Fin qui abbiamo visto come il recettore NMDA sia necessario per l'LTP e come funzioni da rilevatore di coincidenza molecolare. Il passaggio successivo è vedere cosa lega la corrente che fluisce in queste condizioni attraverso il canale-recettore NMDA e l'induzione del LTP. La risposta si trova nei tipi di ioni a cui questo canale è permeabile. Infatti, mentre la maggioranza dei recettori-canali che mediano messaggi eccitatori è permeabile solo agli ioni sodio e potassio, il canale-recettore NMDA ha la particolarità di essere permeabile anche agli ioni Ca^{2+} . Questo fa sì che ogni volta che si verifica la coincidenza che permette un flusso di ioni attraverso il canale, gli ioni Ca^{2+} si riversano nel

dendrite della cellula postsinaptica entrando esattamente a livello dell'area del contatto sinaptico attivato. A questo Ca^{2+} se ne aggiunge altro che entra da canali operati dal voltaggio che vengono fatti aprire dalla depolarizzazione sinaptica, che ha la massima ampiezza nell'area del contatto sinaptico e si propaga alle altre regioni del neurone con decremento. L'aumento di Ca^{2+} nel dendrite viene ulteriormente amplificato dal rilascio dai depositi intracellulari. Anche tale rilascio contribuisce all'induzione dell'LTP perché i bloccanti dei canali che permettono la fuoriuscita di Ca^{2+} dai depositi intracellulari impediscono l'LTP. In quest'ultimo meccanismo è implicato un recettore metabotropico del glutammato, che tramite una via di trasduzione del segnale che inizia dall'attivazione di una proteina-G, porta all'apertura dei canali presenti nelle membrane dei depositi intracellulari di Ca^{2+} , provocandone la fuoriuscita nel citoplasma (Dou et al., 2001).

Recenti conferme del ruolo del recettore NMDA nell'LTP e la connessione tra questi eventi cellulari e la memoria spaziale vengono da esperimenti su topi in cui, mediante tecnologie di biologia molecolare, sono stati distrutti o modificati i geni che codificano per il recettore NMDA. In uno di questi studi, è stato eliminato esclusivamente dalle cellule ippocampali un gene indispensabile per la funzionalità di tutti i recettori NMDA. In questi topi knockout, come atteso non può essere indotto l'LTP in cellule che per altro presentano un perfetto funzionamento sinaptico per i segnali che normalmente non inducono plasticità. Tuttavia il dato più interessante è che a questi topi manca anche la capacità di memorizzare e ricordare la posizione di un oggetto in un labirinto o in una piscina in cui nuotano. Si ritiene che questo tipo di deficit nei topi knockout derivi dall'incapacità di formarsi una mappa spaziale del labirinto o della piscina che permetta poi di memorizzare le coordinate della posizione corretta dell'oggetto. Nell'ippocampo normale ci sono cellule che si attivano in corrispondenza di un determinato luogo, per esempio in un certo punto della piscina; nei topi knockout in cui mancano i recettori NMDA, queste cellule hanno perso la capacità di attivarsi in modo specifico per un determinato punto dello spazio in cui si trova l'animale. L'insieme di queste alterazioni presenti nei topi knockout per i recettori NMDA conferma la connessione tra il fenomeno cellulare dell'LTP, l'apprendimento delle cellule che devono mappare

un luogo (place cells) e la memorizzazione della posizione degli oggetti (Tsien et al., 1996).

Se eliminando i recettori NMDA dell'ippocampo si è ottenuta l'abolizione dell'LTP e dell'apprendimento spaziale, si può pensare che la migliore conferma del coinvolgimento di questo meccanismo possa essere l'esperimento opposto: aumentando la funzionalità dei recettori NMDA ci aspettiamo un maggiore LTP e migliori capacità di apprendimento. Questo esperimento sembrerebbe impossibile perché si ritiene che l'evoluzione abbia portato ad una ottimizzazione delle prestazioni fisiche e intellettive delle specie sopravvissute. Tuttavia, è noto che nel corso della vita di un individuo le capacità di apprendimento non rimangono costanti: i periodi in cui le capacità di imparare sono maggiori sono l'infanzia e la giovinezza per poi decrescere passando all'età adulta. Uno dei geni che codificano per una subunità del recettore NMDA, detto NR2B, viene intensamente espresso fino alla giovinezza per poi spegnersi quasi completamente passando all'età adulta. Senza la subunità NR2B il recettore può ancora funzionare, ma la presenza di NR2B aumenta la quantità di ioni Ca^{2+} che entrano attraverso il canale-recettore NMDA perché prolunga la durata della corrente di ioni Ca^{2+} . Recentemente è stato prodotto un topo in cui la subunità NR2B continua ad essere espressa abbondantemente anche in età adulta nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo. Questo topo presenta il fenomeno di LTP che anche nell'adulto viene indotto con estrema facilità come nel topo più giovane, confermando il rapporto di causa-effetto tra il recettore NMDA e l'LTP. Però il risultato più importante di questo studio è che il topo che continua ad esprimere la subunità NR2B, in età adulta ha delle capacità di apprendimento e di memorizzazione superiori rispetto ai suoi coetanei normali. Questo risultato è sensazionale perché può essere visto come una modificazione genetica capace di determinare un aumento delle prestazioni cognitive. Inoltre questa è un'ulteriore dimostrazione dello strettissimo rapporto esistente fra recettore NMDA, LTP e memoria (Cao et al., 2007).

Finora abbiamo descritto le prime fasi del processo di formazione di una traccia mnemonica, ed abbiamo visto come queste fasi consistono nell'attivazione del recettore NMDA che funziona come rilevatore di coincidenza, con la conseguenza immediata di ottenere un aumento di ioni Ca^{2+}

nel dendrite in cui si trova la sinapsi. Quello che avviene dall'aumento di Ca^{2+} in poi è ancora oggetto di dibattito tra vari gruppi di ricerca. Attualmente la lista di molecole che sono implicate nel LTP ha raggiunto dimensioni considerevoli, ed è difficile distinguere quali siano i segnali molecolari che la cellula veramente utilizza per tradurre l'aumento di Ca^{2+} dendritico in LTP. Tuttavia, tra tutte le molecole implicate ve n'è una per cui le dimostrazioni sono definitive. Si tratta di una proteina, detta calmodulina, che lega gli ioni Ca^{2+} che entrano nel dendrite. La calmodulina in assenza di Ca^{2+} è inattiva, ma quando il Ca^{2+} vi si lega acquista la capacità di attivare degli enzimi chiamati "proteina-chinasi Ca^{2+} -calmodulina-dipendenti", abbreviati con la sigla CaMK .

Esistono vari sottotipi di CaMK, ma nel LTP è implicato il sottotipo II, il cui nome completo è CaMKII. Questo enzima ha il compito di modificare alcune proteine aggiungendo loro dei gruppi fosforici, un processo chiamato "fosforilazione". La prima proteina bersaglio della CaMKII è se stessa, che quindi si autofosforila: la conseguenza della autofosforilazione è che così la CaMKII rimane attiva anche in assenza di Ca^{2+} -calmodulina. Quindi, una volta che un aumento di Ca^{2+} , tramite il suo legame con la calmodulina, ha attivato la CaMKII, quest'ultima rimane attiva per un tempo molto lungo nonostante il Ca^{2+} dopo pochi secondi ritorni al livello di riposo. Un recente studio ha dimostrato che, se si modifica la molecola della CaMKII in modo che non possa autofosforilarsi, non si ottiene più LTP. Sembra quindi che un passaggio indispensabile per il LTP sia la autofosforilazione della CaMKII. Quale altro bersaglio della CaMKII può essere responsabile del LTP? Un probabile bersaglio finale del LTP sono i canali-recettori del glutammato permeabili solo a ioni sodio e potassio, detti recettori AMPA. Questi sono i recettori che mediano gli EPSP che vengono misurati come indice dell'efficacia della sinapsi, perché non sono bloccati dal magnesio e quindi possono funzionare a qualunque potenziale di membrana (Malinow, 2003).

Quindi anche un singolo potenziale d'azione in una fibra presinaptica evoca un EPSP dovuto ai recettori AMPA. Il LTP viene osservato come un aumento di ampiezza del EPSP dovuto ai canali-recettori AMPA. È quindi estremamente logico che nel LTP esso sia un bersaglio finale. Infatti si è visto che la CaMKII è in grado di fosforilare i recettori AMPA, aumentandone così la funzionalità. Questo meccanismo quindi permette di ottenere una maggiore

corrente di ioni attraverso i canali-recettori AMPA senza bisogno di aumentare il numero di recettori, semplicemente potenziando la funzionalità di quelli già esistenti sulla membrana del dendrite. Questo meccanismo non esclude però che possa esserci anche un aumento del numero di recettori AMPA nella membrana del dendrite. Infatti recenti esperimenti hanno dimostrato che accade anche questo. Nei dendriti ci sono normalmente, oltre ai recettori AMPA inseriti nella membrana e che sono pronti ad aprirsi all'arrivo del glutammato dalla fibra presinaptica, altri recettori AMPA "di scorta" inattivi perché non inseriti in membrana. Questi ultimi si trovano in membrane interne al dendrite, e quindi non accessibili al neurotrasmettitore e comunque senza effetti sul potenziale della membrana dendritica. L'attivazione della CaMKII provoca uno spostamento di questi recettori AMPA "di scorta" fino alla membrana del dendrite dove una proteina di fusione fa sì che vengano inseriti in modo da diventare attivabili durante la trasmissione sinaptica. Addirittura esistono dei contatti sinaptici in cui inizialmente non è presente alcun recettore AMPA. In tali contatti un singolo potenziale d'azione non provoca nessun EPSP, perché i recettori AMPA non sono presenti e i recettori NMDA al potenziale di riposo sono bloccati dagli ioni magnesio; questo tipo di sinapsi viene detto "silente". Se però si induce LTP, allora i recettori AMPA vengono inseriti nella membrana e il contatto sinaptico inizia a funzionare. Quindi il LTP è dovuto al potenziamento dei contatti sinaptici già esistenti più l'attivazione di contatti prima inattivi.

Tutti i meccanismi descritti fino ad ora spiegano l'induzione del LTP e la sua espressione per un tempo che va fino a un'ora circa. In una seconda fase (fase tardiva del LTP) possono entrare in gioco altri meccanismi, che sono ancora non completamente conosciuti, ma che devono assicurare che il LTP possa permanere per un tempo più lungo.

Per esempio, alcuni studi sembrano indicare che anche la fibra presinaptica modifichi il proprio livello di funzionamento, rilasciando una maggiore quantità di glutammato. Questo effetto sulla fibra presinaptica dipende però dall'induzione dell'LTP descritto sopra che avviene nel dendrite della cellula postsinaptica. Deve quindi esistere un messaggero retrogrado che, rilasciato dalla cellula postsinaptica, torni indietro alla fibra presinaptica e potenzi i sistemi che regolano il rilascio di neurotrasmettitore. Alcune molecole che si ritiene potrebbero fungere da messaggero retrogrado dell'LTP sono il

monossido di azoto (NO), il monossido di carbonio, l'acido arachidonico e il fattore attivante le piastrine (PAF). Si tratta di molecole che diffondono facilmente da una cellula all'altra perché possono attraversare liberamente le membrane cellulari. Tuttavia non tutti gli studiosi concordano sulla partecipazione di queste molecole all'LTP, e il problema del messaggero retrogrado è tuttora insoluto.

Alcuni laboratori hanno dimostrato che in una fase tardiva dell'LTP si hanno delle modificazioni nella trascrizione dei geni da parte della cellula postinaptica. Molti di questi geni potrebbero servire a reinnescare nella cellula nervosa la capacità di modificare la propria struttura. Più precisamente, si può immaginare come un potenziamento permanente della sinapsi tra due cellule possa ultimamente consistere nella formazione di una nuova parte di dendrite (spina dendritica) del neurone postsinaptico e di assone del neurone presinaptico, con la formazione di nuovi contatti sinaptici. Aumentando il numero dei contatti sinaptici tra le due cellule aumenta in modo stabile e permanente l'efficacia della sinapsi, che è esattamente la definizione di LTP. In conclusione, alcune ore o giorni dall'apprendimento, la traccia mnemonica diventerebbe consolidata sotto forma di nuovi contatti sinaptici formati tra i neuroni che sono stati attivati maggiormente in risposta ad una specifica esperienza generando il ricordo di questa.

Un altro tipo di plasticità sinaptica a lungo termine è la **depressione a lungo termine ("long term depression", LTD)**. L'immagazzinamento delle informazioni da parte delle sinapsi richiede modificazioni sinaptiche bidirezionali, vale a dire che se il meccanismo dell'LTP porta ad una maggiore risposta sinaptica, l'LTD porta invece ad una minore risposta in seguito allo stimolo. Sperimentalmente è possibile riprodurre questo meccanismo attraverso una serie di stimolazioni a bassa frequenza (in genere 900 stimoli ad 1 Hz, LFS). L'induzione di LTD in vivo, e in altre condizioni sperimentali come quelle in vitro, è bloccato da antagonisti degli NMDA (Dudek and Bear, 1992, Mulkey and Malenka, 1992, Heynen et al., 1996, Manahan-Vaughan, 1997). Questa forma di LTD, come quella di LTP di cui si è scritto in precedenza, mostra dipendenza dall'attivazione dei recettori NMDA e dall'aumento della concentrazione postsinaptica di Ca^{2+} , e la differenza tra i due tipi di plasticità è data principalmente dalla diversa frequenza di stimolazione necessaria ad

indurle. Infatti 900 stimoli tra 0,5 e 3 Hz inducono generalmente LTD, mentre la stessa stimolazione a frequenze maggiori di 10 Hz, portano a LTP (Dudek and Bear, 1992). Le opposte conseguenze della stimolazione a differenti frequenze sono state attribuite a differenze sistematiche nelle correnti di Ca^{2+} postsinaptiche passanti attraverso i recettori NMDA. E' ora quindi ben stabilito che le variabili critiche sono la depolarizzazione postsinaptica e l'entrata di Ca^{2+} , non la frequenza di stimolazione. Infatti se la stimolazione ad 1 Hz normalmente induce LTD, una iperpolarizzazione durante questo

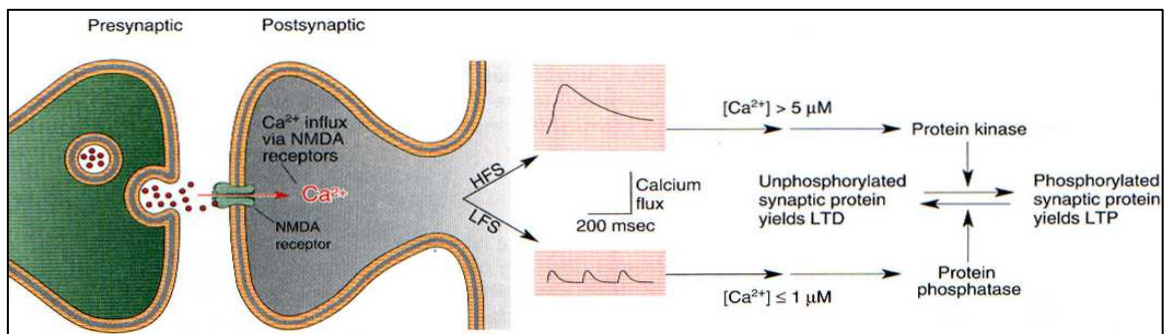


Figura 14. Rappresentazione schematica della differenza tra LTP e LTD dovuta alla diversa frequenza di stimolazione e alla conseguente entrata di concentrazioni diverse di calcio .

condizionamento previene ogni cambiamento, mentre una depolarizzazione permette l'induzione di LTP (Mulkey and Malenka, 1992). Similmente mentre la stimolazione ad alta frequenza induce LTP, il fenomeno che si manifesta se questa stimolazione avviene in presenza di antagonisti NMDA è l'LTD (Cummings et al., 1996).

Quindi il Ca^{2+} risulta essere di primaria importanza per l'induzione di LTP o LTD. In particolare, un modesto ma prolungato aumento della concentrazione di Ca^{2+} ($0,7 \mu\text{M}$ per 60 secondi) induce LTD, mentre elevati e brevi aumenti della concentrazione di Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$ per 3 secondi) portano all'induzione di LTP (Yang et al., 1999). Di conseguenza le dinamiche del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sono fattori cruciali per la polarità delle modificazioni sinaptiche.

In particolare, pare che il Ca^{2+} che entra all'interno della cellula in seguito alla stimolazione a bassa frequenza, riesca ad attivare una serie di reazioni enzimatiche che portano all'induzione di LTD. Lisman, nel 1989 (Lisman, 1989) propose l'LTD come risultato di una cascata di protein fosfatasi, che mediano la defosforilazione delle proteine che risultano essere attivate nell'LTP (Fig. 6). Esperimenti successivi hanno poi confermato il ruolo di queste proteine, in

particolare la protein-fosfatasi 1 (PP1) postsinaptica e la calcineurina (PP2B) nell'induzione di LTD attraverso stimolazioni a bassa frequenza (Mulkey et al., 1993, Mulkey et al., 1994). Ci sono inoltre evidenze che l'attività di PP1 risulta aumentata dalla stimolazione che induce LTD (Thiels et al., 1998).

In pratica, il Ca^{2+} che entra attraverso i recettori NMDA attiva la calmodulina, che, grazie al suo legame col calcio, si attiva e va a sua volta ad attivare la PP2B. In genere PP1 è bloccata a seguito della fosforilazione ad opera della PKA, e diviene attiva solo in seguito a defosforilazione da parte della proteina inibitoria 1, I1. La PP2B defosforila la proteina I1, che media in questo modo l'attivazione di PP1 (Nairn and Shenolikar, 1992). In questo modo la PP1 andrà a defosforilare, e quindi ad inibire, le stesse proteine che, quando attive, determinano l'insorgenza di LTP, e determina quindi l'insorgenza di LTD.

RUOLO DELLE NEUROTROFINE NELLA REGOLAZIONE DELLA PLASTICITA' SINAPTICA A LUNGO TERMINE

Le neurotrofine sono una famiglia di proteine identificate inizialmente come fattori in grado di promuovere la sopravvivenza e la differenziazione neuronale, ma il loro ruolo è oggi ritenuto fondamentale nella regolazione di molti aspetti dello sviluppo e delle funzioni nervose come ad esempio nella formazione delle sinapsi e nella plasticità sinaptica, sia nel sistema nervoso periferico che nel sistema nervoso centrale.

Nei mammiferi vengono espresse quattro differenti neurotrofine: NGF, BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4), le quali interagiscono con uno o più dei tre tipi di recettori a tirosina chinasi (TrkA, TrkB e TrkC). In aggiunta ciascuna neurotrofina attiva, seppure con minore affinità, anche il recettore per le neurotrofine p75 (p75NTR) un membro della famiglia dei recettori per i fattori di necrosi tumorali.

I recettori Trk necessitano della dimerizzazione per poter attivare il loro sistema di trasduzione. Questi recettori dal peso molecolare approssimativo di 140 kDa, generalmente si trovano sottoforma di monomeri localizzati sulla membrana cellulare, e all'arrivo del dimero di fattore trofico verrebbe indotta la dimerizzazione del recettore. Il recettore p75 invece può legare in forma di

monomero il fattore NGF o sottoforma di dimero le altre neurotrofine come il BDNF.

L'attivazione dei recettori Trk da parte del ligando porta all'autofosforilazione del recettore nei suoi residui tirosinici posti nel dominio intracellulare, creando così dei siti di attracco per i secondi messaggeri. Le proteine adattatrici Shc e FRS-2 si legano ad un sito comune e mediano l'accoppiamento di due differenti pathways: l'attivazione della cascata delle MAP chinasi e la via della fosfatidil inositolo-3OH-chinasi. Inoltre il legame di una fosfolipasi C γ (PLC γ) in un differente sito intracellulare permette la produzione di diacilglicerolo, un attivatore della proteina chinasi C (PKC), e dell'inositolo trifosfato (IP3) con conseguente mobilitazione del Ca²⁺ intracellulare. Il risultato finale dell'attivazione di queste differenti vie sarà la regolazione dell'espressione di numerosi e differenti geni implicati nella sopravvivenza e nella differenziazione neuronale.

Per quanto riguarda lo studio della plasticità sinaptica a lungo termine, la neurotrofina che sembra essere maggiormente coinvolta in questo sistema è senza dubbio il BDNF (Brain derived neurotrophic factor), il quale esercita un ruolo di primo piano sia nella fase precoce che nella fase tardiva dell'LTP. Questa proteina inoltre sembra importante per l'instaurarsi del fenomeno della dipendenza in seguito all'assunzione di diverse sostanze d'abuso, e prove sempre più evidenti attribuiscono al BDNF un ruolo fondamentale negli effetti a lungo termine di alcuni farmaci come ad esempio gli antidepressivi.

Il BDNF viene sintetizzato, immagazzinato e rilasciato dai neuroni glutammatergici, per poi interagire attraverso un legame ad altissima affinità col recettore TrkB. BDNF e TrkB sono largamente distribuiti a livello della corteccia prefrontale e nelle regioni ippocampali, e le vescicole secretorie contenenti questa proteina sono presenti sia a livello presinaptico all'interno dei terminali assonici, sia a livello postsinaptico nei dendriti dei principali neuroni glutammatergici come le cellule granulari e le cellule piramidali. All'arrivo di una stimolazione ad alta frequenza il BDNF viene rilasciato in maniera Ca²⁺-dipendente, e l'aumento della concentrazione di Ca²⁺ è dovuta sia al passaggio dello ione mediato dai recettori NMDA, sia all'attivazione dei canali al Ca²⁺ voltaggio dipendenti. L'espressione, e in maniera ancora più particolare, la

trascrizione del gene del BDNF, sono finemente controllate dall'attività neuronale.

Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi sulla comprensione del ruolo del BDNF nella fase precoce dell'LTP e nella memoria a breve termine. Il BDNF facilita l'induzione del E-LTP mediante un'attivazione delle risposte sinaptiche allo stimolo tetanico, inoltre esercita la sua funzione nel mantenimento del E-LTP probabilmente attivando le sinapsi silenti (Shen et al., 2006) o regolando il complesso motore dell'actina (Rex et al., 2007; Yano et al., 2006). Per quanto riguarda la fase tardiva del LTP (L-LTP), ci sono numerosi studi genetici e farmacologici che suggeriscono come il BDNF sia necessario in questa fase. Infatti, per esempio topi knock out eterozigoti per il BDNF (+/-), oppure il trattamento delle fette ippocampali con anticorpi anti-BDNF o anti-TrkB (Kang, Welcher, Shelton, & Schuman, 1997), mostrano un significativo deficit nel L-LTP in seguito alla stimolazione con teta-burst (Korte et al., 1995; Pang et al., 2004; Patterson et al., 2001). Infine quando viene abolita la sintesi di proteine mediante l'applicazione di anisomicina o ematina, l'L-LTP è completamente bloccato nell'ippocampo. L'applicazione esogena di BDNF d'altra parte riduce il deficit dell'L-LTP anche quando la sintesi proteica è inibita (Pang et al., 2004). Quindi, queste evidenze suggeriscono che il BDNF potrebbe essere una delle proteine maggiormente coinvolte nel mantenimento del L-LTP, anche se i meccanismi molecolari alla base di questa azione restano ampiamente sconosciuti.

Azione degli estrogeni nell'ippocampo: similitudini col BDNF

Nel sistema nervoso centrale e in particolare nell'ippocampo, vi sono numerosi fattori coinvolti nella plasticità sinaptica e tra questi, oltre alle già discusse neurotrofine, vanno ricordati gli ormoni steroidei.

Infatti, numerosi sono gli studi che suggeriscono una correlazione fra ormoni steroidei e fattori di crescita. Ad esempio, è ben stabilito che nel sistema riproduttivo femminile, gli effetti trascrizionali dovuti agli estrogeni inducono un aumento della sintesi di fattori di crescita (Ikeda et al., 1982; Dickson et al., 1986). Il coinvolgimento dei fattori trofici in risposta agli estrogeni nel cervello venne suggerito dopo un'attenta osservazione del sinergismo presente tra gli

effetti dell'estrogeno e il fattore IGF-1 nel cervello in via di sviluppo, e dalla scoperta che i neuroni sensibili agli estrogeni esprimono spesso gli mRNA delle neurotrofine (Torand- Allerand et al., 1988; Miranda et al., 1994).

E' stata anche identificata una sequenza nel gene del BDNF che ha un' altissima omologia con la sequenza ERE (elemento di risposta agli estrogeni) trovata anche in altri geni regolati dagli estrogeni (Sohrabji et al., 1995) suggerendo che, mediante questo meccanismo, gli estrogeni possano mediare o regolare la sintesi di BDNF. Inoltre, studi sull'ippocampo di femmine di ratto mostrano una significativa riduzione dei livelli di mRNA del BDNF dopo ovariectomia, e questo effetto veniva revertito dal trattamento con estradiolo (Berchtold et al., 2001). Ulteriori ricerche hanno dimostrato che la somministrazione di estradiolo in cuccioli di ratti maschi dopo gonadectomia, ristabiliva l'espressione di BDNF in cellule piramidali dell'ippocampo coinvolgendo un meccanismo dipendente dalla sequenza ERE in quanto i recettori ER α colocalizzavano col BDNF (Solum and Handa, 2002). Tutte queste evidenze suggeriscono che l'azione dell'estradiolo nell'ippocampo possa includere in qualche modo anche una regolazione del BDNF.

Molteplici sono le similitudini che associano l'attività degli estrogeni con quella del BDNF nell'ippocampo. Tra queste annoveriamo l'attivazione della trasmissione mediata dal glutammato, la modulazione dei recettori NMDA, nello specifico i recettori dotati della subunità NR2B (Yamada and Nabeshima, 2003; Adams et al., 2004), la facilitazione dei processi mnemonici, l'aumento del numero di spine dendritiche e la stimolazione della neurogenesi a livello del giro dentato. Inoltre estrogeni e BDNF hanno degli effetti benefici quali la neuroprotezione in seguito a ischemia, seppure in alcuni studi, in determinate condizioni, sembra che estrogeni e BDNF agiscano invece esacerbando l'ischemia.

Oltre alle azioni comuni mediate da estrogeni e BDNF, è importante sottolineare anche che, a livello molecolare, sembrano essere condivise numerose vie di trasduzione del segnale che portano all'attivazione di specifici fattori di trascrizione; ne sono degli esempi la via che porta all'attivazione delle MAPK, la via della PI3-K, l'attivazione della CaMKII e di CREB.

La prima evidenza che il BDNF potrebbe mediare gli effetti dell'estradiolo nell'ippocampo proviene da ricerche effettuate su neuroni ippocampali in coltura

in via di sviluppo (Segal and Murphy, 2001). Attraverso un'azione BDNF-dipendente, infatti, l'estradiolo è in grado di aumentare il numero di spine dendritiche. Tuttavia, contrariamente alle aspettative e a quanto accade nei ratti adulti, questo effetto era mediato da una riduzione dei livelli di BDNF e non ad un aumento. Questo effetto sembra dovuto probabilmente all'inibizione operata da parte del GABA, il quale esercita, sui neuroni durante il periodo dello sviluppo, un'azione depolarizzante eccitatoria, opposta al suo normale effetto inibitorio esercitato nel cervello adulto. Il modo in cui estradiolo e BDNF interagiscono potrebbero essere quindi età-dipendente tenendo anche conto che la concentrazione ippocampale dei recettori per gli estrogeni ER si modifica marcatamente durante il periodo della vita postnatale.

Per quanto riguarda il ciclo estrale del ratto i livelli di BDNF risultano essere più elevati nell'ippocampo nelle fibre muscoidi nella fase di proestro, rimanendo a concentrazioni alte per circa 24 ore e questo potrebbe implicare che l'estradiolo nelle fibre muscoidi possa mediare una up-regulation del BDNF.

OBIETTIVI

La gestazione nel ratto, utilizzato quale modello animale, dura 21 giorni conteggiati dal momento in cui ci si accerta dell'avvenuto accoppiamento.

Mentre durante la gravidanza della donna si assiste ad un progressivo e parallelo aumento dei livelli ormonali sia di progesterone che di estrogeno, che svolgono le complesse funzioni precedentemente descritte, nella ratte gli andamenti di questi due ormoni sembrano essere lievemente differenti. Infatti mentre il progesterone è soggetto ad un brusco aumento della sua concentrazione ematica (circa 800% di aumento riferito ai livelli plasmatici di progesterone durante la fase di estro del ciclo mestruale) al giorno P15 di gestazione per poi subire una diminuzione man mano ci si avvicina al giorno del parto, per l'estrogeno si assiste ad un drastico, repentino e deciso aumento (circa 200% di aumento riferito ai livelli plasmatici di estrogeno durante la fase di estro del ciclo mestruale) a ridosso del giorno 21, cioè poco prima del parto. Così come accade nella donna, anche nella femmina di ratto, dopo il parto, si assiste ad una cospicua diminuzione dei livelli plasmatici sia di progesterone che di estrogeno. Ci sono dati incoraggianti che imputano proprio a questa drastica diminuzione dei livelli ormonali, successiva al parto, alcune sindromi fisiologiche comportamentali a carico del sistema nervoso centrale. Dal momento che alcuni metaboliti del progesterone come allopregnanolone e THDOC sono tra i più potenti ed efficaci modulatori endogeni dei recettori GABA_A, al fine di valutare se, parallelamente alle variazioni delle concentrazioni plasmatiche di progesterone si osservasse anche una variazione funzionale di questi recettori, uno degli obiettivi della mia tesi è stato quello di valutare se durante la gravidanza nel ratto si osservi una corrispondente variazione della neurotrasmissione GABAergica a livello dell'ippocampo di ratte gravide. Ho quindi monitorato, attraverso l'utilizzo della tecnica del patch-clamp in modalità whole cell, le varie componenti del tono inibitorio GABAergico a livello dei neuroni granulari del giro dentato dell'ippocampo di ratto. Le componenti inibitorie osservate sono la componente fasica, o sinaptica, e quella tonica, o extrasinaptica, come descritto nella parte introduttiva. Tutte le eventuali variazioni funzionali dei recettori GABA_A che mediano le due componenti inibitorie prima citate verranno riferite e valutate rispetto al periodo di estro dove, ricordiamo, si osservano livelli ematici molto bassi di progesterone e quindi dei metaboliti attivi come allopregnanolone che modulano le varie

correnti GABAergiche. Ricordiamo, inoltre, che solo nelle cellule granulari del giro dentato si apprezza una buona componente tonica, perciò, le registrazioni effettuate nelle cellule piramidali dell'area CA1, in cui non si apprezza una robusta componente tonica e quindi una eventuale variazione di questo fattore, durante la gravidanza, verranno utilizzate eventualmente come controllo negativo. Come detto pocanzi, sono state monitorate sia le correnti fasiche che quelle toniche sia in condizioni basali che successivamente all'aggiunta di modulatori positivi dei recettori GABA_A, come l'allopregnanolone. L'utilizzo sia di GABA esogeno sia di allopregnanolone durante le registrazioni elettrofisiologiche è stato necessario per mettere maggiormente in evidenza le correnti toniche e massimizzare le eventuali alterazioni.

I gruppi sperimentali utilizzati per effettuare le registrazioni elettrofisiologiche, scelti in base ai giorni della gestazione in cui sono apprezzabili particolari variazioni ormonali sono i seguenti:

- ✓ ratte in estro
- ✓ ratte che hanno raggiunto il 15°giorno di gravidanza (P15)
- ✓ ratte che hanno raggiunto il 19°giorno di gravidanza (P19)
- ✓ ratte che hanno partorito da 2 giorni (pp2)
- ✓ ratte a cui è stata somministrato l'antagonista per la sintesi degli steroidi finasteride, dal giorno P12 al giorno P19
- ✓ ratte a cui è stata somministrato l'antagonista non selettivo per i recettori intracellulari degli estrogeni clomifene, dal giorno P12 al giorno P19.

I due ultimi gruppi sperimentali, in cui vengono saggiati gli effetti della finasteride e del clomifene, hanno lo scopo di valutare se le eventuali modificazioni delle due componenti inibitorie GABAergiche potessero essere imputabili agli aumenti dei livelli di questi due importanti ormoni (estrogeno e progesterone). Infatti se da un lato l'antagonista finasteride blocca la sintesi di allopregnanolone a partire dal progesterone, l'antagonista recettoriale clomifene blocca invece l'azione dell'estrogeno sui propri recettori. La conseguenza di questi due trattamenti potrebbe permettere quindi di stabilire se le eventuali variazioni a carico del sistema inibitorio GABAergico, indotte dagli aumenti ematici dei livelli di questi steroidi, siano dipendenti dagli incrementi di questi ormoni specifici.

Inoltre, in considerazione del ruolo delle neurotrofine, accennato nell'Introduzione, in particolare del BDNF, e degli ormoni steroidei, in particolare degli estrogeni, nella plasticità sinaptica a lungo termine, il nostro laboratorio ha recentemente intrapreso un progetto mirato a valutare il contributo di questi fattori nella plasticità utilizzando il modello sperimentale della gravidanza nel ratto. La plasticità sinaptica a lungo termine è un meccanismo che determina un aumento o una diminuzione persistente della risposta postsinaptica stimolata, rispetto alla risposta di base, a seguito di stimoli somministrati ad alta frequenza.

Risultati iniziali ottenuti dalla nostra sezione di Neuroscienze, hanno messo in evidenza che l'espressione del BDNF, misurata mediante Western blot, risulta marcatamente aumentata nell'ippocampo al giorno 21 di gravidanza e nelle prime 3 settimane del periodo post partum, rispetto ai livelli riscontrati nelle ratte in estro, di controllo.

Al fine di valutare se questo aumento di espressione del BDNF nell'ippocampo nell'ultima fase della gravidanza e nelle prime settimane dopo il parto fosse associato a parallele variazioni nell'eccitabilità e nella plasticità sinaptica, ho deciso di effettuare delle registrazioni elettrofisiologiche utilizzando i seguenti gruppi sperimentali:

- ✓ ratte in estro (controlli)
- ✓ ratte al 19°giorno di gravidanza (P19)
- ✓ ratte al 21°giorno di gravidanza (P21)
- ✓ ratte che hanno partorito da 7 giorni (pp7)
- ✓ ratte che hanno partorito da 21 giorni (pp21)

Per misurare eventuali variazioni nell'eccitabilità e nella plasticità sinaptica nell'ippocampo di questi animali ho applicato la tecnica della registrazione extracellulare per misurare i potenziali postsinaptici eccitatori di campo (fEPSP) e ho utilizzato un protocollo di stimolazione ad alta frequenza per indurre potenziamento a lungo termine (LTP) della trasmissione sinaptica nelle cellule granulari nel giro dentato.

MATERIALI E METODI

Animali



Fig.15 Esempio di ratto utilizzato per gli esperimenti

I ratti utilizzati appartengono al ceppo Sprague-Dawley CD (Charles River, Como), di età compresa tra 60-80 giorni, con peso corporeo di circa 280-350 grammi. Dopo l'arrivo allo stabulario, gli animali sono stati lasciati ambientare per almeno una settimana. Prima dell'esperimento gli animali vengono stabulati in numero di sei per gabbia.

Per l'accoppiamento, sono stati utilizzati ratti Sprague-Dawley CD (Charles River®, Como, Italia) con peso corporeo di 420-450 grammi.

I ratti maschi e femmine sono stati lasciati in accoppiamento per 1 giorno, dopo di che, le femmine sono state separate dai maschi e sono state poste in gabbie singole dove hanno partorito dopo circa 21 giorni di gestazione. In tutti i casi gli animali sono 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.

Determinazione del ciclo ovarico della ratte

Per ottenere il primo gruppo sperimentale cioè quello che riguarda le ratte in estro è stato necessario monitorare, attraverso strisci vaginali, tutto il ciclo estrale della ratte. Nella ratte il ciclo ovarico, composto da quattro fasi (estro, diestro1, diestro2, proestro) ha una durata di quattro giorni. Le fasi del ciclo ovarico sono state determinate tramite strisci vaginali effettuati con frequenza quotidiana alla stessa ora ogni giorno, per circa due settimane (2-4 cicli) prima dell'esperimento. Ogni fase è infatti caratterizzata da variazioni nel numero e nella morfologia delle cellule contenute nel liquido vaginale che sono facilmente riconoscibili al microscopio binoculare (Jablonka-Shariff *et al.*, 1999).

La fase di estro è caratterizzata da un elevato numero di cellule fuse tra loro a formare una o più masse molto luminose. In questa fase si trovano solo cellule epiteliali poliedriche e anucleate.

Nella fase del diestro 1 si trova lo stesso numero di cellule epiteliali nucleate e di leucociti; il muco appare denso.

Il diestro 2 è caratterizzato dall'esclusiva presenza di leucociti. A questa fase, che rappresenta l'inizio del ciclo ovarico, segue quella del proestro in cui si trovano le cellule dell'epitelio, allungate e nucleate, e i leucociti; il muco è sottile e poco denso.

Determinazione dei gruppi sperimentali

Per quanto riguarda gli esperimenti di Patch-Clamp per la prima serie di esperimenti, che non prevedevano trattamenti, ci sono 4 gruppi sperimentali, estro (E), pregnancy 15 (P15) o 15° giorno di gravidanza, P19 e postpartum 2 (pp2) o 2° giorno dopo il parto.

Nella seconda serie di esperimenti, quelli che prevedevano trattamenti, i gruppi sperimentali sono 2: P19 e P19 che hanno subito il trattamento. Il trattamento con Finasteride è durato 7 giorni durante i quali le ratte venivano iniettate sotto cute 1 volta al giorno ad una concentrazione di 5mg/Kg. La finasteride è stata disciolta in una soluzione di etanolo al 20% e olio di mais 80%, farmaco che, come detto precedentemente inibisce la testosterone 5- α -reduttasi di tipo 2 forse per interazioni del terminale ter-butilico. Inibendo la 5- α -reduttasi, blocca la

conversione del testosterone in diidrottestosterone, riducendo la concentrazione di androgeni nei tessuti.

Il protocollo con Clomifene prevedeva che le ratte fossero trattate 1 volta per die per 7 giorni con il farmaco. Il clomifene è un antagonista dei recettori per gli estrogeni e viene comunemente usato per stimolare la funzione ovarica promuovendo la maturazione e la deiscenza del follicolo.

Mentre per quanto riguarda gli esperimenti di Field Potential abbiamo iniziato a contare i giorni di gravidanza dal giorno dopo quello di accoppiamento (Day 0). Abbiamo deciso di creare i gruppi sperimentali basandoci sulle variazioni ormonali presenti durante la gravidanza delle ratte che come spiegato precedentemente sono diversi rispetto a quelle dell'uomo. La serie di esperimenti prevedeva l'utilizzo di 5 gruppi sperimentali: estro (E), pregnancy 19 (P19) e pregnancy 21 (P21) corrispondenti rispettivamente al 19° e 21° giorno di gravidanza, postpartum 7 (pp7) e postpartum 21 (pp21), ovvero al 7° e al 21° giorno dopo il parto.

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 field potential e 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, acido kinurenico 3 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 (Vibratome, St. Louis, MO) e immerso nella medesima soluzione di taglio costantemente ossigenata. Si ottengono così 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 a contrasto di fase 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 $\text{M}\Omega$ quando riempiti con una soluzione interna contenente: CsCl 140 mM, MgCl_2 2 mM, CaCl_2 1 mM, EGTA 10 mM, HEPES 10 mM, ATP- Na_2 , 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 $\text{M}\Omega$, e se questa varia durante l'esperimento di un valore pari oltre il 20% di quello iniziale, la cellula viene automaticamente scartata.

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).

Registrazioni elettrofisiologiche extracellulari

Per questo tipo di registrazioni abbiamo posizionato il microelettrodo (simile agli elettrodi da patch clamp e con resistenza da 3 a 6 M Ω), riempito con una soluzione concentrata di NaCl (4 M) nella regione di interesse. La stimolazione delle afferenze eccitatorie viene effettuata usando un elettrodo stimolatore (solitamente un elettrodo bipolare concentrico) posizionato approssimativamente a 300 μ m dal sito 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.

Tutte le registrazioni sono state effettuate usando un amplificatore Axoclamp 2B e poi sono state analizzate utilizzando il software pClampfit 8.01 (Axon Instruments[®]). La misurazione della pendenza (slope) dell'fEPSP è stata fatta effettuando il "fitting" del rise time del potenziale di campo evocato.

Tutti i dati sono stati espressi come la media \pm ESM (errore standard della media) e la significatività statistica è stata valutata mediante il "one sample t-test" (l'analisi è stata eseguita con il programma Prism 4.0, GraphPad, San Diego, CA).

Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato il limite di accettazione della significatività statistica.

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) (Fig. 8).

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

uscanti (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 (thresholds) 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 (Fig. 7).

Analisi delle correnti Toniche

La misura dell'attività tonica GABAergica è stata eseguita registrando da cellule granulari del giro dentato di ippocampo. Alla soluzione ACSF è stato aggiunto acido kinurenico (3 mM) per bloccare le correnti ionotropiche glutamatergiche. Come si può notare dalla figura 9, l'attività GABAergica è stata testata con l'uso di bicucullina (20-30 μ M). Per valutare le modificazioni della corrente tonica durante la gravidanza 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.

RISULTATI

ESPRESSIONE DELLA SUBUNITA' δ DURANTE LA GRAVIDANZA E DOPO IL PARTO

L'espressione delle subunità del recettore GABAA $\alpha 4$, δ e $\gamma 2$ nell'ippocampo di ratto durante la gravidanza e dopo il parto è stato esaminata mediante tecniche di immunistochemica utilizzando anticorpi specifici generati in risposta ad un epitopo extracellulare di queste proteine. L'intensità della marcatura relativa a ciascuna subunità dipendeva dalle proprietà dell'anticorpo corrispondente. Quindi sono state utilizzate differenti diluizioni del dato anticorpo in modo da ottenere intensità di marcatura simili. Deve essere quindi ricordato che le differenze nell'intensità di marcatura ottenute con anticorpi subunità specifici non riflettono necessariamente reali differenze nei livelli di espressione delle rispettive proteine.

Nei ratti di controllo in estro (E), sono stati riscontrati livelli moderati di immunoreattività per la subunità δ del recettore GABAA nella maggior parte delle regioni della formazione ippocampale. La quantità di subunità δ appare maggiore nello strato granulare del giro dentato e nello strato piramidale della regione CA1. L'espressione della subunità δ è stata rilevata anche nello strato molecolare del giro dentato. La quantificazione dell'immunoreattività per la subunità δ nei ratti al giorno 15 di gravidanza (P15), P19 e P21 ha rivelato che lo staining specifico aumenta progressivamente nel giro dentato e nella regione CA1 rispetto a quanto osservato nei ratti di controllo. Al contrario, l'immunoreattività per la subunità δ è diminuita fino a valori significativamente minori rispetto a quelli di controllo nei ratti 2 giorni dopo il parto (pp2).

Questa down-regulation dell'espressione della subunità δ era ancora visibile 7 giorni dopo il parto nello strato molecolare e granulare del giro dentato e nello strato oriens dell'area CA1.

ESPRESSIONE DELLA SUBUNITA' $\alpha 4$ DURANTE LA GRAVIDANZA E DOPO IL PARTO

L'immunoreattività per la subunità $\alpha 4$ del recettore GABAA appare essere diffusa in tutta la formazione ippocampale dei ratti di controllo, con particolare intensità nello strato granulare del giro dentato e in quello piramidale dell'area CA1. La marcatura è risultata intensa anche nello strato molecolare del giro dentato. L'espressione della subunità $\alpha 4$ non si modifica significativamente durante la gravidanza, ma aumenta marcatamente sia nel giro dentato che nell'area CA1 2 giorni dopo il parto.

Questa up-regulation dell'espressione della subunità $\alpha 4$ risultava transitoria e non era riscontrabile a 7 giorni dopo il parto.

ESPRESSIONE DELLA SUBUNITA' $\gamma 2$ DURANTE LA GRAVIDANZA E DOPO IL PARTO

Nei ratti di controllo, l'immunoreattività per la subunità $\gamma 2$ è risultata localizzata negli strati oriens e radiatum delle aree CA1 e CA3, nello strato lacunoso-molecolare dell'area CA1, e nelle cellule granulari del giro dentato. Il livello di immunoreattività per la subunità $\gamma 2$ è risultato diminuito nei ratti P15 e P19 nel giro dentato e nell'area CA1.

Al contrario, il livello di immunoreattività per la subunità $\gamma 2$ è risultato aumentato immediatamente prima del parto, rimanendo elevato 2 giorni dopo il parto per ritornare poi a valori di controllo 7 giorni dopo il parto.

TRASMISSIONE GABAERGICA NEL GIRO DENTATO DELL'IPPOCAMPO DI RATTO DURANTE LE DIVERSE FASI DELLA GRAVIDANZA E DOPO IL PARTO

Sulla base di queste evidenze sperimentali abbiamo voluto analizzare funzionalmente la trasmissione GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato e nei neuroni piramidali dell'area CA1 dell'ippocampo. Nel giro dentato, le cellule granulari sono fittamente

addensate e il loro soma è facilmente riconoscibile per le sue ridotte dimensioni e la forma rotondeggiante (vedi schema in Fig 16 A). Registrando in modalità voltage-clamp (V_{hold} , -65 mV) con una soluzione interna all'elettrodo contenente alte concentrazioni di Cl^- , le correnti GABAergiche risultano essere rivolte verso il basso (per convenzione definite *inward*). Come menzionato nella sezione Materiali e Metodi, in questi neuroni la trasmissione GABAergica è mediata da due sottotipi recettoriali. I recettori GABA_A sinaptici, contenenti le subunità $\alpha_n\beta_n\gamma_2$, che mediano le correnti fasiche, e i recettori extrasinaptici, contenenti le subunità $\alpha_4\beta_n\delta$, che mediano correnti toniche (Fig. 16 B). L'attivazione di questi sottotipi recettoriali determina correnti facilmente distinguibili e valutabili dal punto di vista cinetico (Fig 16 C). Infatti le correnti fasiche sono caratterizzate, come suggerisce il nome, da un veloce *rise time*, un picco di ampiezza ben distinguibile dalla *baseline*, e da un tempo di decadimento nell'ordine di 50 ms. D'altra parte, le correnti toniche sono caratterizzate da un tracciato rumoroso che rispecchia una costante attivazione dei recettori extrasinaptici. Come accennato precedentemente, la corrente tonica totale viene quantificata in base al blocco indotto da concentrazioni saturanti dell'antagonista competitivo del recettore GABA_A bicucullina (Fig. 16 C).

Poiché nelle nostre condizioni sperimentali le correnti toniche non sono di elevata ampiezza, al fine di mettere in risalto questo tipo di corrente inibitoria abbiamo applicato GABA esogeno alla concentrazione di 5 μ M, che sui recettori extrasinaptici $\alpha_4\beta_n\delta$ induce un marcato aumento sia del noise sia della holding current (Fig. 17).

Come atteso, l'applicazione di GABA (5 μ M) ha indotto nelle cellule granulari del giro dentato in fettine ottenute da ratte in estro (E) un aumento del noise della corrente tonica del $30.9 \pm 6.3\%$ rispetto alla corrente tonica in condizione di controllo ($n = 67$) (Fig. 17). Quando il GABA esogeno è stato applicato in fettine ottenute dai ratti appartenenti agli altri gruppi sperimentali ho riscontrato un aumento del noise della corrente tonica pari al $46.6 \pm 14.1\%$, $65.3 \pm 17.1\%$, e $44.8 \pm 11.4\%$, rispettivamente per il gruppo P15 ($n = 32$), P19 ($n = 56$) e pp2 ($n = 33$)

(Fig. 18 A). L'analisi statistica ha permesso di mettere in evidenza una differenza statisticamente significativa tra i gruppi E e P19.

Dalle stesse registrazioni, abbiamo anche valutato l'effetto dell'applicazione di GABA esogeno sulla holding current nei 4 diversi gruppi sperimentali. I risultati ottenuti sono in accordo con quelli ottenuti dall'analisi del noise, suggerendo che questi due parametri sono correlati. Infatti, anche per la holding current abbiamo riscontrato un aumento statisticamente significativo tra i valori ottenuti dal gruppo in E e quelli in P19 (Fig. 18 B).

Inoltre, come si può vedere dai tracciati nelle Figura 17, immerse nella corrente tonica sono anche presenti correnti postsinaptiche inibitorie spontanee (sIPSC) di natura fasica ben distinguibili dalla corrente tonica e dal rumore di fondo. Le correnti fasiche possono essere caratterizzate da 4 diversi parametri: la frequenza delle IPSCs, l'ampiezza delle correnti, il decay time o tempo di decadimento e l'area totale della corrente. Al fine di valutare se eventuali cambiamenti avvenissero anche in questo tipo di correnti inibitorie, abbiamo misurato questi parametri nei quattro gruppi sperimentali. Come si vede nella Figura 19, non abbiamo riscontrato alcuna differenza statisticamente significativa dei vari parametri studiati tra i diversi gruppi sperimentali. È necessario, tuttavia, menzionare un lieve, seppur non significativo, aumento della frequenza degli eventi spontanei nel gruppo P15 rispetto al gruppo E.

Effetto del lorazepam sulla funzione del recettore GABA_A durante la gravidanza

Per analizzare ulteriormente le conseguenze funzionali dei cambiamenti indotti dalla gravidanza nell'espressione delle subunità del recettore GABA_A, abbiamo esaminato l'effetto della benzodiazepina lorazepam sulle correnti GABAergiche nelle cellule granulari del giro dentato di ratti P19. Come atteso (Nusser and Mody, 2002), l'applicazione di lorazepam alla concentrazione di 3 μ M per 5 minuti non ha modificato le correnti toniche sia nei ratti in estro che in P19. Al contrario, il lorazepam ha

aumentato marcatamente l'ampiezza, l'area e il decay time delle sIPSC. Nonostante l'effetto del lorazepam risultasse leggermente ridotto nei ratti P19 rispetto a quelli in estro, l'analisi statistica non ha rivelato differenze significative (Fig. 22 A).

Effetto del Ro15-4513 sulle sIPSCs mediate dai recettori GABA_A durante la gravidanza e dopo il parto

Per valutare inoltre la rilevanza funzionale dell'aumento dell'espressione delle subunità $\alpha 4$ e $\gamma 2$ del recettore GABA_A nell'ippocampo 2 giorni dopo il parto, abbiamo voluto testare l'effetto modulatore del Ro15-4513 sulle sIPSCs GABA-mediate nelle cellule granulari del giro dentato. Ro15-4513 è un agonista inverso che si lega nel sito per le benzodiazepine del recettore GABA_A contenente le subunità $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ insieme alla subunità $\gamma 2$ (Barnard et al., 1998), ma è in grado di legarsi e modulare positivamente i recettori formati dalle subunità $\alpha 4$, β e $\gamma 2$ (Knoflach et al., 1996; Wafford et al., 1996).

Nelle cellule granulari del giro dentato dei ratti in estro e al giorno 19 di gravidanza, l'applicazione di Ro15-4513 (3 μ M) riduce (24 e 19%, rispettivamente) il decay time delle sIPSCs. Al contrario, nelle cellule granulari del giro dentato di ratti che hanno partorito da 2 giorni, il Ro15-4513 ha indotto un aumento del decay time pari al 28%. La frequenza e l'ampiezza non risultano modificate significativamente dal Ro15-4513.

TRASMISSIONE GABAERGICA NELLE CELLULE PIRAMIDALI DELL'AREA CA1 DELL' IPPOCAMPO DI RATTO DURANTE LE DIVERSE FASI DELLA GRAVIDANZA E DOPO IL PARTO

Successivamente, abbiamo ripetuto lo stesso protocollo sperimentale registrando dalle cellule piramidali della regione CA1. In questo tipo cellulare, come è stato precedentemente ricordato, non

vengono espressi recettori contenenti le subunità α_4/δ e conseguentemente non presentano una robusta corrente tonica (Fig. 23 A, B). L'applicazione di GABA esogeno (5 μM) ha indotto un modesto aumento del noise e una minima variazione della holding current in tutti i gruppi sperimentali studiati (Fig. 23 B). Anche l'analisi delle correnti fasiche sinaptiche nelle cellule piramidali dell'area CA1 non ha rivelato alcuna differenza significativa nei diversi gruppi sperimentali (Fig. 24).

Effetto modulatore dell'allopregnanolone (AP) sulla trasmissione tonica nelle cellule granulari del giro dentato di ratto durante la gravidanza e dopo il parto

Le correnti toniche registrate dalle cellule granulari del giro dentato, che ricordiamo essere mediate da recettori contenenti le subunità α_4 e δ , hanno una elevata sensibilità all'azione modulatore dei neurosteroidi. Abbiamo quindi valutato l'effetto dell'AP, alla concentrazione di 1 μM , sulle correnti toniche in cellule granulari del giro dentato dei ratti appartenenti ai gruppi sperimentali E e P19. Come si può vedere dalla figura 20, l'applicazione di AP ha indotto un aumento marcato della corrente tonica, sia nel noise che nella holding current, e questo effetto è risultato significativamente maggiore nel gruppo P19 rispetto al gruppo E.

L'analisi della trasmissione fasica registrata nelle cellule granulari del giro dentato mostra che l'effetto modulatore di AP sui diversi parametri relativi alle mIPSCs (frequenza, ampiezza, decay time e area) non sono modificate in maniera significativa nei ratti P19 rispetto a quelli del gruppo E (Fig. 21). Si noti la riduzione della frequenza delle sIPSCs in entrambi i gruppi sperimentali durante l'applicazione di AP (Fig. 21 B). Questo effetto però potrebbe non essere imputabile ad una riduzione della probabilità di rilascio presinaptico di GABA, ma bensì potrebbe essere giustificato da un aumento del noise della corrente tonica che quindi potrebbe aver mascherato le IPSCs di minore ampiezza.

Ruolo degli steroidi neuroattivi e dell'estrogeno nelle variazioni dell'attività tonica delle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza: effetti della finasteride e del clomifene

Dal momento che i selettivi e opposti cambiamenti nell'espressione delle subunità δ e $\gamma 2$ del recettore GABA_A così come il potenziamento delle correnti toniche nelle cellule granulari del giro dentato osservato in ratti a P19 appare temporalmente correlato con l'aumento delle concentrazioni cerebrali di progesterone e allopregnenolone, come precedentemente dimostrato (Concas et al., 1998), così come degli estrogeni (Taya and Greenwald, 1981), abbiamo quindi esaminato se queste azioni potessero essere correlati da un rapporto causa-effetto.

Abbiamo somministrato alle femmine di ratto gravide dal giorno P12 al P18 la finasteride, un inibitore dell'enzima 5 α -reduttasi, o il clomifene, un antagonista del recettore per gli estrogeni, per inibire la sintesi dell'allopregnanolone o l'attivazione dei recettori per gli estrogeni rispettivamente (Azzolina et al., 1997; Homburg, 2005; Finn et al., 2006). Il trattamento con finasteride ha prevenuto l'up-regulation dell'espressione della subunità δ e la down-regulation dell'espressione della subunità $\gamma 2$ osservata nel giro dentato e nella regione CA1 al 19esimo giorno di gravidanza.

Al contrario, la somministrazione del clomifene non ha avuto effetti significativi sui livelli di espressione della subunità δ o della subunità $\gamma 2$ a P19.

Abbiamo inoltre esaminato la funzionalità del recettore GABA_A nelle cellule granulari del giro dentato in fettine di ippocampo ottenute da ratti in estro e P19 che sono stati trattati con finasteride o con il veicolo. Le differenze negli effetti del GABA sulla corrente tonica GABAergica tra i ratti P19 e in estro sono diminuite e rese statisticamente non significative dal trattamento con finasteride (Fig. 25A, B). Al contrario, lo stesso trattamento con finasteride non ha avuto effetto sulle proprietà cinetiche delle sIPSCs GABAergiche nelle cellule granulari del giro dentato di ratti in P19, così come anche il trattamento con clomifene in presenza o assenza dell'allopregnanolone.

Caratterizzazione dei potenziali evocati nel giro dentato di ippocampo di ratto

Successivamente abbiamo voluto applicare il protocollo delle registrazioni extracellulari dei potenziali postsinaptici eccitatori di campo (fEPSP) evocati, per meglio analizzare la trasmissione sinaptica e l'eccitabilità dell'ippocampo di ratto durante e dopo la gravidanza.

In una fase preliminare di questo studio, ho voluto esaminare le caratteristiche dei fEPSP evocati nel giro dentato dell'ippocampo utilizzando fettine di ippocampo ottenute da ratti maschi posizionando l'elettrodo registrante (simile agli elettrodi da patch clamp e con resistenza da 3 a 6 M Ω), riempito con una soluzione concentrata di NaCl (4 M), nella regione dendritica della popolazione di cellule granulari del giro dentato. La stimolazione delle afferenze eccitatorie provenienti dalla corteccia entorinale è stata effettuata usando un elettrodo stimolatore (solitamente un elettrodo bipolare concentrico) posizionato approssimativamente a 300 μ m dal sito di registrazione (Fig. 26 A). Come si può vedere dai tracciati in Fig. 26, l'attivazione mediante un elettrodo stimolatore, delle afferenze glutammatergiche alle cellule granulari del giro dentato provenienti dalla corteccia entorinale attraverso la via perforante genera dei potenziali di campo evocati (Fig. 26 B e C). La stimolazione elettrica delle fibre afferenti determina il rilascio di glutammato che a sua volta induce l'attivazione di recettori AMPA. L'apertura del canale cationico associato a questi recettori induce una depolarizzazione sincronizzata dei neuroni granulari postsinaptici. 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 potenziale di campo. Questo tipo di attività elettrica ha una durata di circa 10-20 msec e un'ampiezza di circa 1 mV. I potenziali evocati sono dovuti alla depolarizzazione del neurone postsinaptico che a sua volta dipende dall'attivazione dei recettori glutammatergici (AMPA e NMDA) ad opera del glutammato rilasciato in seguito alla stimolazione. Viceversa, quando l'elettrodo di registrazione viene posto a livello del corpo cellulare la risposta che si

ottiene viene denominata population spike e quest'ultimo è causato dalla depolarizzazione sincronizzata della popolazione neuronale che si trova in prossimità dell'elettrodo registrante (Figura 26 B e C).

La grandezza delle risposte evocate, fEPSP e population spike, dipendono dal livello di depolarizzazione della popolazione neuronale e questa a sua volta è direttamente dipendente dalla quantità di glutammato rilasciato in risposta alla stimolazione elettrica. Risulta evidente che tanto più elevata è l'intensità di stimolazione, tanto maggiore sarà la risposta misurata.

Come possiamo notare dalla Fig. 27, sia l'ampiezza sia lo slope della risposta aumentano marcatamente all'aumentare dell'intensità di stimolazione. Entrambi i parametri sono utili per quantificare i livelli di attivazione dei recettori glutammatergici, ma il più usato in questo tipo di studi è lo slope o pendenza del potenziale evocato. Nel grafico della Fig. 27 C si può osservare come questo parametro aumenti all'aumentare della stimolazione. L'incremento del valore dello slope raggiunge un plateau a circa 1 μ V di stimolazione.

Questa relazione è definita come curva "input-output" e viene usata per valutare quale sia la capacità massima di risposta di un dato circuito neuronale all'aumentare dell'intensità di stimolazione. In base a questo valore si può quindi determinare l'intensità di stimolazione da utilizzare per l'esperimento. Solitamente, per gli studi di plasticità sinaptica, sia che si voglia studiare un potenziamento che una depressione, si preferisce usare un valore di stimolazione che generi circa il 50 % della risposta massima. In questa maniera sarà possibile avere un margine sia di potenziamento sia di riduzione della risposta sinaptica. Possiamo inoltre notare nella Fig. 27 B, come in seguito a stimolazioni con intensità superiore a 0.8 μ V vi sia l'insorgenza di rapidi e transienti potenziali d'azione sincronizzati.

La grandezza delle risposte sinaptiche evocate è dipendente dall'intensità di stimolazione ed è regolata dal tono inibitorio GABAergico.

In una seconda serie di esperimenti abbiamo voluto esaminare più in dettaglio come la trasmissione sinaptica eccitatoria evocata fosse dipendente dall'intensità di stimolazione, dal sito di registrazione e dal tono inibitorio GABAergico. Per questo abbiamo costruito, nel giro dentato di ippocampo di ratto, una curva input/output registrando sia a livello dendritico sia a livello somatico. In entrambi gli esperimenti, abbiamo successivamente perfuso la fettina di ippocampo in esame con concentrazioni saturanti di bicucullina (30 μM), un antagonista competitivo del recettore GABA_A, per valutare il ruolo di questo recettore nella regolazione dell'eccitabilità del circuito neuronale.

Abbiamo quindi registrando i fEPSP nella regione dendritica del giro dentato. Come si può notare dai tracciati in Fig. 28 A, il graduale aumento di intensità di stimolazione induce un proporzionale aumento dello slope della risposta evocata che a circa 0.7 μV raggiunge un plateau (Fig. 28 C). Anche l'area sotto la curva segue un andamento simile, con un aumento graduale dei suoi valori all'incrementare dell'intensità di stimolazione usata (Fig. 28 D).

Dopo aver perfuso la fettina per circa 10 minuti con una soluzione contenente bicucullina (30 μM) abbiamo ripetuto lo stesso esperimento usando esattamente le stesse intensità di stimolazione precedentemente applicate. I tracciati in Fig. 28 B e i grafici della Fig. 28 C e D mostrano chiaramente come sia lo slope sia l'area delle risposte evocate risultino essere ampiamente aumentate col blocco della trasmissione GABAergica inibitoria. E' interessante notare come durante il blocco dei recettori GABA_A la stimolazione delle afferenze glutammatergiche abbia indotto una risposta sinaptica più prolungata e più complessa. Probabilmente questa alterazione nella risposta è dovuta al fatto che la popolazione neuronale, depolarizzata dal glutammato, non avendo più il freno inibitorio esercitato dal GABA, può generare potenziali d'azione multipli.

Plasticità sinaptica

Per studiare come e se la plasticità sinaptica a lungo termine possa venire modulata dalla trasmissione GABAergica abbiamo effettuato delle registrazioni extracellulari di potenziali evocati nella regione del giro dentato dell'ippocampo di ratto. Questo tipo di registrazioni, come spiegato nella sezione dei Materiali e Metodi è il più indicato per studi di plasticità sinaptica a lungo termine in quanto permette di monitorare l'attività di una vasta popolazione neuronale per tempi prolungati.

Visto il fondamentale ruolo svolto dal giro dentato nell'ippocampo abbiamo voluto iniziare gli esperimenti con lo studio del potenziamento a lungo termine delle afferenze glutammatergiche nelle cellule granulari del giro dentato. Abbiamo registrato per un periodo di controllo di circa 20 minuti il field potential dalla regione dendritica delle cellule granulari. L'intensità di stimolazione usata per questo esperimento era circa il 50% di quella che induceva la risposta massima (Fig. 29 A). Nel tentativo di indurre una forma di potenziamento della trasmissione sinaptica abbiamo usato un protocollo di stimolazione che consiste in 10 treni da 100 stimoli a 250 Hz intervallati tra loro da 10 secondi. Come si vede dai tracciati e dal sottostante grafico in figura 29 B in presenza della sola ACSF l'applicazione della stimolazione tetanica non è stata capace di indurre un significativo potenziamento della trasmissione sinaptica. Lo stesso esperimento è stato anche ripetuto in altre 5 fettine con risultati simili. In media dopo 30 minuti dallo stimolo abbiamo osservato una variazione rispetto alla baseline del $-15.4 \pm 6.6\%$ (n=6).

Come descritto nell'Introduzione, in quest'area dell'ippocampo le cellule granulari sono inibite dai recettori GABA_A localizzati sia a livello sinaptico sia a livello extrasinaptico. Per verificare se questo tipo di trasmissione fosse in grado in qualche maniera di limitare o regolare l'induzione di plasticità sinaptica a lungo termine abbiamo effettuato lo stesso tipo di esperimenti in presenza di bicucullina, un antagonista dei recettori GABA_A. L'applicazione di questo composto ha indotto una

minima variazione dello slope del field potential, ma soprattutto ha generato l'insorgenza di piccoli spike nella fase tardiva del field potential (Fig. 30 A). Questi piccoli spike sono simili a quelli che si possono osservare durante un'attività epilettiforme e sono dovuti alla rimozione del tono GABAergico inibitorio. Dopo un periodo di controllo di circa 20 minuti abbiamo applicato nuovamente lo stesso protocollo di stimolazione tetanica usato precedentemente. Come si può vedere dai tracciati dopo 30 minuti dall'applicazione del tetano lo slope del potenziale evocato risulta essere marcatamente aumentato rispetto alla baseline. (Fig. 30 B). Risultati simili sono stati ottenuti in altre 5 fettine ed in media ho osservato un potenziamento della risposta del $95.6 \pm 41\%$ (n=6) rispetto alla baseline. Questo aumento percentuale è rimasto costante per l'intera durata della registrazione (Fig. 30 C).

LTP nel giro dentato di ratto durante la gravidanza e dopo il parto

Valutate le condizioni sperimentali e le caratteristiche dei fEPSP e della plasticità delle cellule granulari del giro dentato, abbiamo quindi applicato il medesimo protocollo di stimolazione ad alta frequenza per l'induzione di LTP nel giro dentato di ratte in estro, che fungevano da controlli, ratte al giorno 19 e 21 di gravidanza (P19 e P21), e ratte al giorno 7 e 21 post partum (pp7 e pp21).

Nel giro dentato delle ratte in estro, la stimolazione ad alta frequenza ha indotto un aumento dello slope degli fEPSP pari al $36 \pm 1.3\%$. Questo valore non differiva significativamente da quello misurato nelle ratte P19 ($34 \pm 1.9\%$), mentre risultava invece aumentato nelle ratte P21 ($56 \pm 2.0\%$) (Fig. 31), e ancor di più dopo il parto, con valori pari a $85 \pm 1.6\%$ e 75 ± 2.5 , rispettivamente, nelle ratte pp7 e pp21 (Fig. 32). Si noti inoltre come gli fEPSP registrati dopo la stimolazione ad alta frequenza negli animali pp7 e pp21 siano caratterizzati dalla comparsa di population spikes multipli che riflettono la generazione di potenziali d'azione e sono indice di un'aumentata eccitabilità di questa popolazione neuronale.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dalla mia sperimentazione avvalorano ulteriormente l'ipotesi che sia l'espressione che la funzione dei recettori GABA_A nel cervello si modificano durante la gravidanza e immediatamente dopo il parto come conseguenza delle marcate fluttuazioni dei livelli cerebrali di steroidi neuroattivi. Ho in particolare dimostrato che l'ultima fase della gravidanza nei ratti si associa ad un aumento nell'espressione della subunità δ del recettore GABA_A e ad una diminuzione dell'espressione della subunità $\gamma 2$ in varie regioni dell'ippocampo. Al contrario, l'espressione della subunità $\alpha 4$ non si modifica durante tutta la gravidanza ma aumenta marcatamente immediatamente dopo il parto. Queste selettive alterazioni nell'espressione genica delle subunità del recettore GABA_A durante la gravidanza e dopo il parto si associano, rispettivamente, ad un selettivo aumento e riduzione delle correnti toniche mediate dai recettori GABA_A extrasinaptici nelle cellule granulari del giro dentato, mentre le correnti fasiche sIPSCs mediate dai recettori sinaptici non subiscono alterazioni.

Gli effetti della gravidanza sulla composizione in subunità e sulla funzionalità del recettore GABA_A sono stati prevenuti dal trattamento con finasteride, suggerendo come questi siano mediati dall'aumento dei livelli cerebrali di allopregnanolone e di altri steroidi neuroattivi durante le ultime fasi della gravidanza (Concas et al., 1998). Perciò, un aumento delle correnti toniche GABAergiche al giorno 19 di gravidanza potrebbe essere un fenomeno cruciale per ridurre l'eccitabilità e i livelli d'ansia solitamente associati all'ultimo periodo di gestazione e immediatamente dopo il parto (Zuluaga et al., 2005; de Brito Faturi et al., 2006; Skouteris et al., 2008). I livelli cerebrali di ormoni steroidei aumentano marcatamente durante la gravidanza nei ratti (Concas et al., 1998). Infatti le concentrazioni di progesterone, allopregnanolone e THDOC aumentano diverse volte sia nel plasma che nel cervello (paragonati ai valori riscontrati nei ratti di controllo in estro) iniziando al giorno 15 e raggiungendo il picco al giorno 21 di gravidanza, immediatamente precedente il parto, e rimanendo a questi livelli per circa 2 giorni (Concas et al., 1998). Abbiamo precedentemente mostrato che il sostenuto aumento nei livelli cerebrali di steroidi neuroattivi durante la

gravidanza è responsabile dell'associata riduzione nell'espressione delle subunità $\alpha 5$ e $\gamma 2$ del recettore GABAA sia nella corteccia che nell'ippocampo di ratto (Concas et al., 1998; Follesa et al., 1998).

I nostri attuali dati di immunistochemica confermano le nostre precedenti osservazioni riguardo la down-regulation dell'espressione della subunità $\gamma 2$ nell'ippocampo di ratto durante la gravidanza. L'immunoreattività della subunità $\gamma 2$ nell'ippocampo è diminuita dal giorno 15 al giorno 19 di gravidanza, un effetto che è ben correlato temporalmente con un aumento dei livelli di steroidi neuroattivi nel cervello, effetto che viene prevenuto dal trattamento con la finasteride (Concas et al., 1998).

Inoltre, questa riduzione è prontamente revertita in risposta alla successiva caduta nelle concentrazioni di questi ormoni steroidei al giorno 21 di gravidanza e durante le prime 2 settimane dopo il parto. La quantità di immunoreattività per la subunità δ ha mostrato cambiamenti opposti a quelli per la subunità $\gamma 2$ durante la gravidanza e dopo il parto. Nell'ippocampo, la subunità δ è espressa principalmente nelle cellule granulari del giro dentato così come nei neuroni piramidali dell'area CA1 e CA3, dove co-localizza principalmente con la subunità $\alpha 4$ (Pirker et al., 2000; Nusser and Mody, 2002; Wei et al., 2003), e con la subunità $\alpha 1$ negli interneuroni dello strato molecolare del giro dentato (Glykys et al., 2007).

L'immunostaining specifico per la subunità δ nell'ippocampo aumenta progressivamente durante la gravidanza, raggiungendo il picco nei giorni 19 e 21, per poi diminuire marcatamente, tornando ai livelli di controllo dopo 2 e 7 giorni dal parto. In accordo con la maggiore sensibilità dei recettori GABA_A contenenti la subunità δ per i neurosteroidi (Adkins et al., 2001; Brown et al., 2002; Wohlfarth et al., 2002), le fluttuazioni nelle concentrazioni nel plasma e nel cervello di questi ormoni associate a varie condizioni patofisiologiche e farmacologiche sono accompagnati da cambiamenti nell'espressione della subunità δ e, in alcuni casi, a cambiamenti nell'espressione della subunità $\alpha 4$ (Smith et al., 1998a,b; Sundstrom-Poromaa et al., 2002; Griffiths and Lovick, 2005; Lovick et al., 2005; Maguire et al., 2005; Shen et al., 2005).

Abbiamo trovato che l'espressione della subunità $\alpha 4$ nell'ippocampo non cambia durante la gravidanza ma aumenta marcatamente dopo il parto, come conseguenza dell'improvvisa diminuzione delle concentrazioni di steroidi ansiolitici. Questo effetto, osservato in condizioni fisiologiche quali la gravidanza e il parto, è consistente con quello riportato in studi farmacologici con trattamenti prolungati con steroidi neuroattivi e successiva astinenza (Smith et al., 1998a,b; Sundstrom-Poromaa et al., 2002; Biggio et al., 2006; Mostallino et al., 2006). Immediatamente dopo il parto, la marcata riduzione nell'espressione della subunità δ è accompagnata a un aumento nel numero dei recettori contenenti le subunità $\alpha 4$ e $\gamma 2$, che, essendo dotati di una più bassa sensibilità verso il GABA, aumentano la fase di desensitizzazione, e insieme alla localizzazione sinaptica, potrebbero contribuire al revertito aumento delle correnti toniche e allo sviluppo di uno stato di stimolazione nel periodo perinatale. L'idea di un aumentata densità di recettori $\alpha 4\beta_{1-3}\gamma 2$ è supportata dal dato che il Ro15-4513 aumenta (Knoflach et al., 1996; Wafford et al., 1996) il decay-time delle sIPSCs nelle cellule granulari del giro dentato 2 giorni dopo il parto, mentre riduce questo parametro negli animali in estro oppure al giorno 19 di gravidanza.

Questo tipo di cambiamenti nell'espressione delle subunità è simile a quello descritto per il ciclo ovarico, durante il quale la quantità delle subunità δ e $\gamma 2$ è regolata in maniera opposta (Maguire et al., 2005).

I nostri risultati hanno rivelato sostanziali e selettivi cambiamenti nella trasmissione GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza e dopo il parto. In particolare, abbiamo riscontrato un marcato aumento nelle correnti toniche durante l'ultima fase della gravidanza rapportate a quelle dei ratti di controllo in estro, e questo aumento non è stato più visibile 2 giorni dopo il parto. L'applicazione di GABA esogeno ha indotto un ampio aumento percentuale nella noise variance e nel salto di holding current nei ratti P19 rispetto a quelli di controllo. Considerato che la trasmissione tonica nelle cellule granulari del giro dentato è mediata da recettori contenenti la subunità δ , i nostri dati funzionali sono consistenti con un aumento nella densità di questi recettori nella membrana extrasinaptica.

Gli steroidi neuroattivi sono i più potenti modulatori endogeni dei recettori GABA_A (Majewska et al., 1986; Belelli and Lambert, 2005). Questi composti modulano più potentemente ed efficacemente la trasmissione tonica mediata dai recettori contenenti la subunità δ piuttosto che la trasmissione fasica mediata dai recettori contenenti la subunità $\gamma 2$ (Stell et al., 2003).

La scoperta che l'allopregnanolone potenzia maggiormente la trasmissione tonica GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato a P19 piuttosto che 2 giorni dopo il parto o nei ratti in estro, avvalorava l'idea che l'up-regulation dell'espressione dei recettori GABA_A contenenti la subunità δ giochi un ruolo importante durante le ultime fasi della gravidanza. In maniera simile, i cambiamenti nei livelli di steroidi neuroattivi nel plasma, l'aumentata trasmissione tonica nelle cellule granulari del giro dentato, e l'up-regulation dell'espressione della subunità δ sono stati mostrati essere strettamente associati durante il ciclo estrale nei topi (Maguire et al., 2005; Maguire and Mody, 2007).

Questi cambiamenti nella corrente tonica appaiono essere limitati alle cellule granulari del giro dentato, dal momento che né le correnti toniche né quelle fasiche registrate dai neuroni piramidali dell'area CA1 sono state modificate dalla gravidanza o dal parto. Le correnti toniche nei neuroni piramidali dell'area CA1 sono state precedentemente registrate da pochi laboratori e sotto particolari condizioni sperimentali e manipolazioni farmacologiche (Caraiscos et al., 2004).

Le proprietà cinetiche delle correnti sinaptiche nelle cellule granulari del giro dentato non sono state sostanzialmente alterate durante la gravidanza nonostante una diminuzione nell'espressione della subunità $\gamma 2$. Va però sottolineato che un esame più attento dei risultati mette comunque in evidenza una tendenza verso una diminuzione dell'ampiezza delle sIPSC nei P19 rispetto agli animali in E. In accordo con questa osservazione, anche l'effetto modulatore della benzodiazepine lorazepam risultava ridotto (37%) a P19 anche se non significativo. Una possibile spiegazione per la mancata variazione delle correnti sinaptiche potrebbe essere legata al fatto che la plasticità dei recettori contenenti la subunità $\gamma 2$ potrebbe aver luogo in un pool di recettori extrasinaptici che

non sono quindi influenti nel mediare le correnti sinaptiche. O, in alternativa, la diminuzione dell'espressione della subunità $\gamma 2$ potrebbe avvenire a livello di sinapsi che si trovano localizzate nelle ramificazioni più distali dell'albero dendritico delle cellule granulari e più lontane quindi dal soma cellulare a livello del quale viene posto l'elettrodo registrante, e quindi la loro riduzione potrebbe essere molto difficile da rilevare.

La down-regulation della subunità $\gamma 2$ durante la fase di diestro del ciclo ovarico nei topi è stato trovato non essere associata a cambiamenti nei parametri cinetici delle correnti sinaptiche (Maguire et al., 2005). I nostri risultati suggeriscono che la densità dei recettori GABAA contenenti la subunità δ e l' associata corrente tonica sono selettivamente modificati durante la fase tardiva della gravidanza e dopo il parto.

Con i nostri studi abbiamo mostrato che gli opposti cambiamenti nell'inibizione tonica GABAergica nel giro dentato durante la gravidanza e dopo il parto sono correlati a caratteristici cambiamenti ormonali (Concas et al., 1998). Molto recentemente, uno studio simile (Maguire and Mody, 2008) ha valutato nel topo i cambiamenti durante la gravidanza e dopo il parto nell' espressione delle subunità δ e $\gamma 2$ del recettore GABAA nell'ippocampo, ed stata trovata, diversamente dal nostro lavoro, una diminuzione nell'espressione di entrambe le subunità al giorno 18 di gravidanza rispetto al controllo. In questo studio, sia la corrente tonica che la fasica nelle cellule granulari del giro dentato è marcatamente ridotta al giorno 18 di gravidanza rispetto al controllo.

Tutti questi cambiamenti sono invertiti 48 h dopo il parto. A parte la differenza di specie usata e alcune differenze relative alle condizioni sperimentali, il fattore che più giustificerebbe i differenti risultati ottenuti dai due studi potrebbe essere quello degli animali usati come controllo. Infatti, mentre nel nostro studio sono stati usati come controllo ratti nella fase di estro del ciclo ovarico, Maguire e Mody hanno usato femmine di topo alla fase di diestro.

Ciò potrebbe essere rilevante, poiché alla fase di diestro l'espressione della subunità δ (e delle correnti toniche) risultano essere ai livelli massimi durante il ciclo ovarico, mentre nella fase di estro sia l'espressione della δ che le correnti toniche raggiungono i livelli minimi

(Maguire et al., 2005). Quindi, è concepibile che l'uso di questi diversi riferimenti potrebbe aver contribuito al raggiungimento delle differenti interpretazioni dei cambiamenti occorsi durante la gravidanza.

In conclusione, l'opposta regolazione delle correnti toniche extrasinaptiche GABA mediate, in risposta a fluttuazioni delle concentrazioni di steroidi neuro attivi, potrebbe essere un fattore cruciale per l'umore e per gli effetti ansiolitici associati alla gravidanza (de Brito Faturi et al., 2006) così come per lo stato di stimolazione tipico del periodo immediatamente precedente il parto e la fase subito successiva.

In una seconda fase di esperimenti, atti a completare il nostro studio riguardo i cambiamenti indotti durante la gravidanza e dopo il parto abbiamo applicato la tecnica delle registrazioni extracellulari, che risulta essere ancora uno strumento essenziale per lo studio dell'eccitabilità e della plasticità sinaptica relativa ad un intero circuito neuronale o di una intera popolazione di cellule nervose. Questa tecnica elettrofisiologica è valida e importante per studiare ad esempio come un'intera popolazione neuronale, e non un singolo neurone, sia in grado di rispondere ad un aumento o ad una riduzione del tono GABAergico, il principale meccanismo inibitorio deputato a regolare la soglia di eccitabilità dei circuiti eccitatori glutammatergici. A questo proposito, in questi ultimi anni proprio gli studi sul giro dentato dell'ippocampo si sono moltiplicati e hanno avuto un grande sviluppo poiché è stato ormai assodato che sia numerosi processi fisiologici, quali ciclo ovarico e gravidanza, che patologici (epilessia, stress) sono associati con variazioni del tono GABAergico in questa particolare area cerebrale, così come precedentemente dimostrato dal nostro studio.

Questa tecnica sperimentale risulta essere particolarmente vantaggiosa anche per ottenere importanti informazioni sugli effetti di fattori trofici ed ormoni e comprendere il loro ruolo a livello dell'eccitabilità neuronale e della plasticità sinaptica.

I nostri dati suggeriscono come il circuito neuronale eccitatorio dell'ippocampo, in particolare il giro dentato, può essere attivato in maniera graduale in risposta a stimolazioni elettriche di intensità crescente. Questa relazione può essere determinata analizzando sia il

valore dello *slope* sia quello dell'area sotto la curva dei potenziali di campo evocati. L'analisi della curva "input-output" è inoltre essenziale per poter studiare, in particolari esperimenti, la plasticità sinaptica di questi circuiti ippocampali, sia nel caso di potenziamento sia di depressione sinaptica, fenomeni questi alla base di funzioni cognitive importanti come l'apprendimento e la memoria.

I risultati ottenuti sperimentalmente mostrano che, le risposte registrate con l'elettrodo posizionato nella zona dendritica e nella zona somatica del giro dentato presentano una cinetica e un andamento diversi dovuto alla diversa localizzazione del *sink* e del *source* rispetto allo stesso sito di registrazione.

Abbiamo inoltre trovato che la trasmissione GABAergica ha un ruolo preminente nel controllo dell'attività di questo circuito neuronale, in quanto regola efficacemente la trasmissione dei segnali eccitatori, spostando sensibilmente la curva input/output, come misurato sia dallo *slope* sia dall'area dei potenziali di campo registrati sia a livello dendritico sia a livello somatico. Si può notare inoltre come l'effetto più marcato indotto dal blocco dei recettori GABA_A mediante la bicucullina, si ottiene attraverso la valutazione, come parametro, dell'area sotto la curva. In questo caso si può notare infatti come vi sia un aumento del tempo totale della risposta e di come la risposta stessa risulti arricchita di numerosi spike. Questi ultimi sono probabilmente il risultato di una scarica multipla di potenziale d'azione da parte della popolazione neuronale studiata, il cui livello di depolarizzazione è notevolmente aumentato in seguito al blocco del tono GABAergico. Quindi, il GABA gioca un ruolo cruciale nella regolazione della soglia di eccitabilità delle cellule granulari del giro dentato.

I nostri dati mostrano che le registrazioni di *field potentials* sono utili strumenti per la misurazione di fenomeni di plasticità sinaptica. Questa tecnica permette infatti di monitorare per lunghi periodi di tempo l'efficacia sinaptica di un dato circuito in seguito ad un particolare stimolo chimico o elettrico. I nostri esperimenti mostrano che il giro dentato dell'ippocampo di ratto risulta essere una regione estremamente plastica

dove è stato possibile indurre un potenziamento a lungo termine dell'efficacia sinaptica.

La stimolazione tetanica ad alta frequenza (100 stimuli a una frequenza di 250 Hz, ogni 5 secondi per 10 volte) applicata in fettine perfuse con sola ACSF non ha indotto alcun potenziamento della risposta sinaptica. Solo in seguito all'inibizione della trasmissione GABAergica attraverso l'applicazione dell'antagonista GABAergico bicucullina è stato possibile indurre, con il medesimo protocollo di stimolazione, un marcato potenziamento della risposta postsinaptica. Questo dato è in accordo con altre osservazioni simili effettuate nel giro dentato di ippocampo di ratto. E' interessante notare come, sempre nell'ippocampo, ma a livello della regione CA1, l'induzione dell'LTP non sia sotto il diretto controllo della trasmissione GABAergica. Infatti in questa regione la stimolazione delle collaterali di Shaffer è in grado di indurre LTP anche in presenza di una trasmissione GABAergica attiva (ossia in assenza di bicucullina) (Schurmans et al., 1997) (Nagashima et al., 2005). Inoltre, quando la trasmissione GABAergica nella regione CA1 viene potenziata con propofol, un anestetico generale capace di modulare positivamente il recettore GABA_A, il protocollo di stimolazione tetanica risulta non essere più efficace nell'indurre LTP (Nagashima et al., 2005). Nella regione CA1 le cellule piramidali non presentano la potente corrente tonica espressa invece dalle cellule granulari del giro dentato. Come accennato in precedenza, le correnti toniche arrivano a mediare anche il 95% della trasmissione GABAergica totale. L'iperpolarizzazione mediata dall'attivazione dai recettori GABA_A extrasinaptici riduce di fatto efficacemente la depolarizzazione indotta dal rilascio di glutammato, limitando così il massiccio ingresso di Ca²⁺ necessario per promuovere i processi di potenziamento sinaptico. Esperimenti del nostro e di altri laboratori hanno dimostrato che anche l'etanolo, una sostanza capace di influenzare la trasmissione GABAergica, è capace di prevenire completamente l'induzione di LTP quando applicato prima della stimolazione ad alta frequenza. Sebbene il suo meccanismo d'azione non sia completamente noto, esso potrebbe agire attraverso sia un potenziamento diretto della trasmissione

GABAergica, sia indirettamente mediante un aumento della biosintesi e del rilascio locale di neurosteroidi attivi sui recettori GABA_A (Yukitoshi et al., 2007). D'altra parte, l'etanolo potrebbe agire anche inibendo la trasmissione eccitatoria glutammatergica, riducendo le correnti. (Izuni et al., 2005; Morrisett & Swartzwelder, 1993).

Per quanto riguarda il nostro studio sui ratti in gravidanza, i risultati ottenuti suggeriscono che l'ultimissima fase della gravidanza e le prime settimane dopo il parto si associano ad un'aumentata eccitabilità e plasticità delle cellule granulari del giro dentato. Infatti, nelle femmine di ratto al giorno 21 di gravidanza, l'LTP indotto in seguito a stimolazione ad alta frequenza delle fibre afferenti della via perforante, è risultato di ampiezza maggiore rispetto a quello misurato nelle ratte di controllo, nella fase di estro. E' interessante sottolineare che questo effetto non si è osservato nelle ratte al giorno 19 di gravidanza. A questo proposito occorre ricordare che le concentrazioni cerebrali di steroidi neuroattivi, come l'allopregnanolone, potente modulatore positivo dei recettori GABA_A, raggiungono i valori massimi proprio in questo giorno, mentre si riducono repentinamente al giorno 21 e dopo il parto (Concas et al., 1998). E' quindi possibile che l'aumento dei livelli di steroidi neuroattivi, dell'espressione dei recettori GABA_A extrasinaptici contenenti la subunità δ e delle correnti toniche precedentemente dimostrati, possano spiegare il mancato effetto sull'LTP osservato al giorno 19 in quanto in queste cellule sarebbe operativa una trasmissione inibitoria GABAergica sovra regolata.

L'aumentata percentuale di potenziamento sinaptico cresce ancor di più nei ratti dopo la prima e la terza settimana dal parto, rispetto ai ratti di controllo. Oltre che l'aumento marcato dello slope, indice di una maggiore risposta post-sinaptica mediata dai recettori AMPA, si osserva anche un aumento della frequenza dei population spike, che rappresentano verosimilmente i potenziali d'azione generati nel corpo cellulare in seguito alla stimolazione elettrica degli afferenti, quindi suggerendo anche una minore soglia eccitabilità.

Questi risultati elettrofisiologici sono i primi ottenuti in questo progetto di ricerca e, necessariamente, devono essere considerati

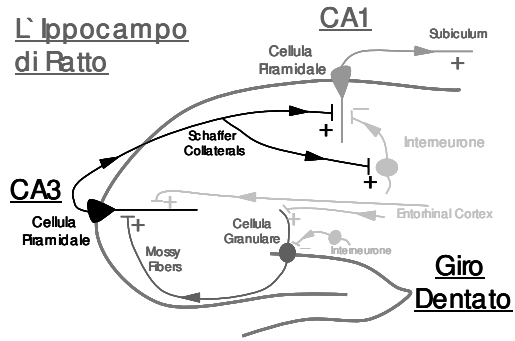
preliminari. Infatti, seppur sia evidente la correlazione temporale con le variazioni di espressione della neurotrofina BDNF nell'ippocampo di questi animali, ancora non abbiamo prove definitive sulla relazione causa-effetto che potrebbe legare questi eventi. Saranno quindi necessari ulteriori esperimenti tesi a valutare, per esempio, se la probabilità di rilascio presinaptico di glutammato è alterata in corrispondenza degli aumenti di BDNF, in quanto dati in letteratura dimostrano che questa neurotrofina aumenterebbe questo meccanismo presinaptico (Lu et al., 2008); valutare il contributo degli estrogeni, i cui livelli aumentano marcatamente proprio nell'ultimissima fase della gravidanza (Taya e Greenwald, 1981) e che potrebbero determinare un aumento di espressione di BDNF (Scharfman e MacLusky, 2005), trattando ad esempio le femmine di ratto con antagonisti del recettore degli estrogeni come il tamoxifene, o valutare il ruolo del BDNF nel periodo perinatale, inibendo la sua espressione (mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisense), bloccando la sua azione a livello recettoriale, o ancora utilizzando il modello degli animali portatori del gene del BDNF mutato.

D'altra parte va ricordato che le concentrazioni di estrogeni aumentano nell'ultimissima fase della gravidanza (Taya e Greenwald, 1981)

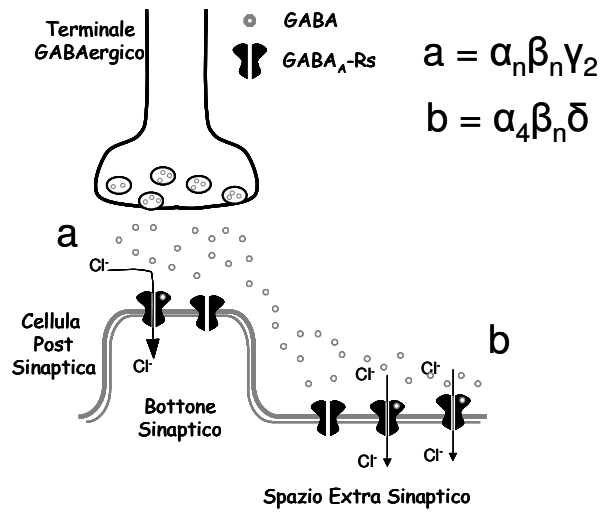
FIGURE

Figura 16

A



B



C

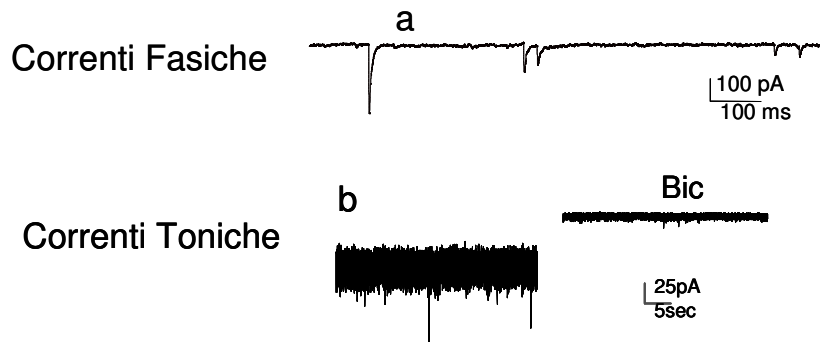


Figura 17

Effetto del GABA esogeno sulla corrente tonica nelle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza e dopo il parto

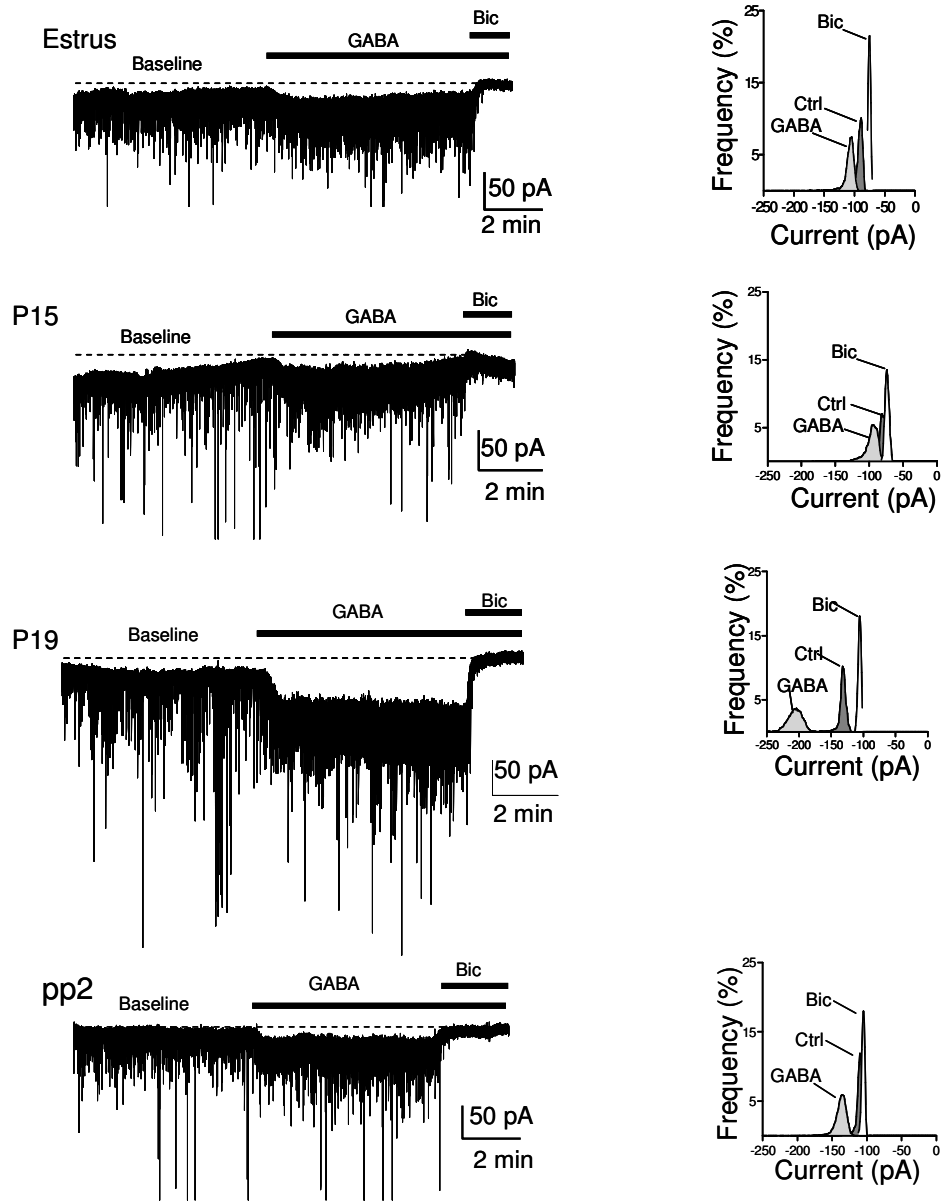
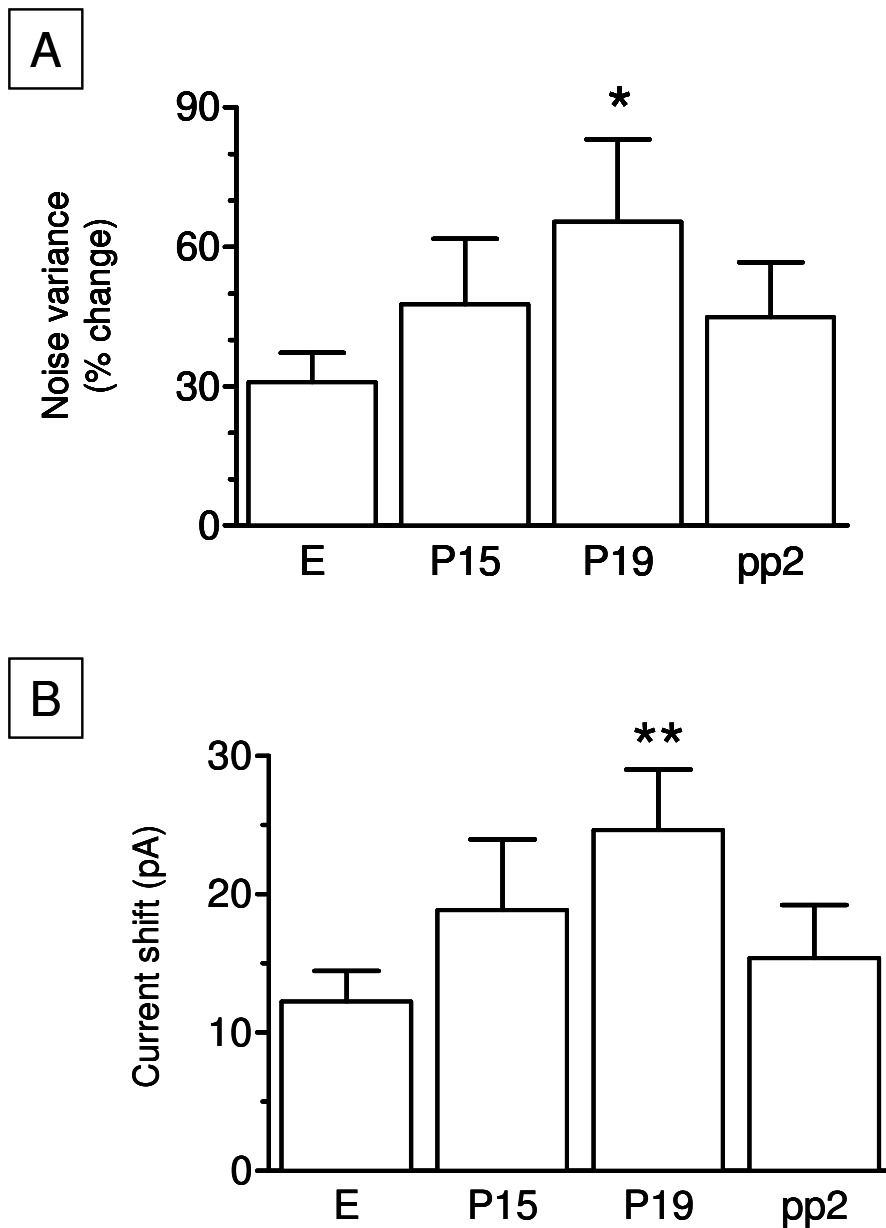


Figura 18

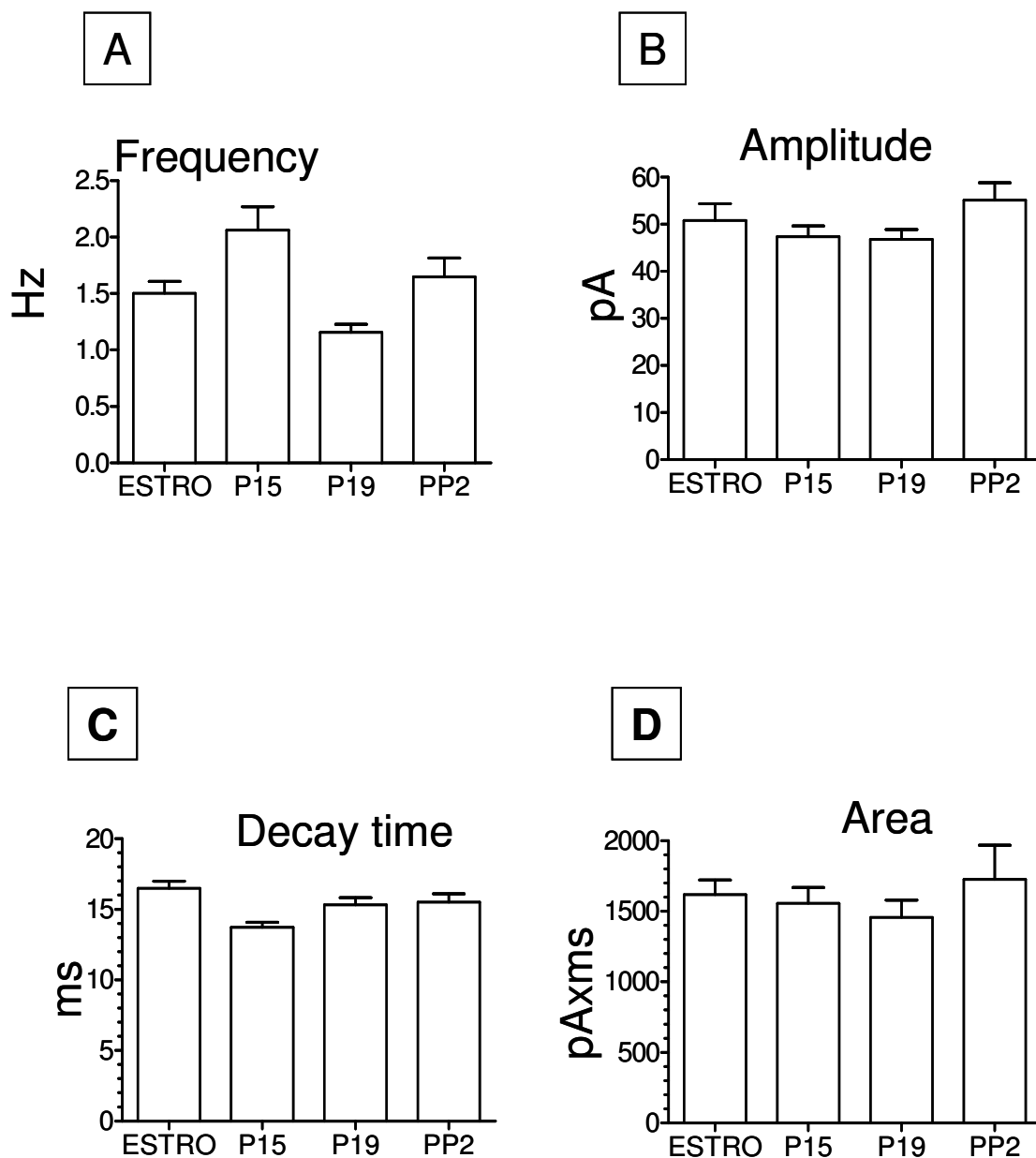
Effetto del GABA esogeno sulla noise variance e sul current shift nelle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza e dopo il parto



n= 32-67 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS estrus

Figura 19

La trasmissione fasica GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato non è alterata durante la gravidanza e dopo il parto



n= 32-67

Figura 20

Effetto dell' AP sulla corrente tonica GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato di ratto durante la gravidanza

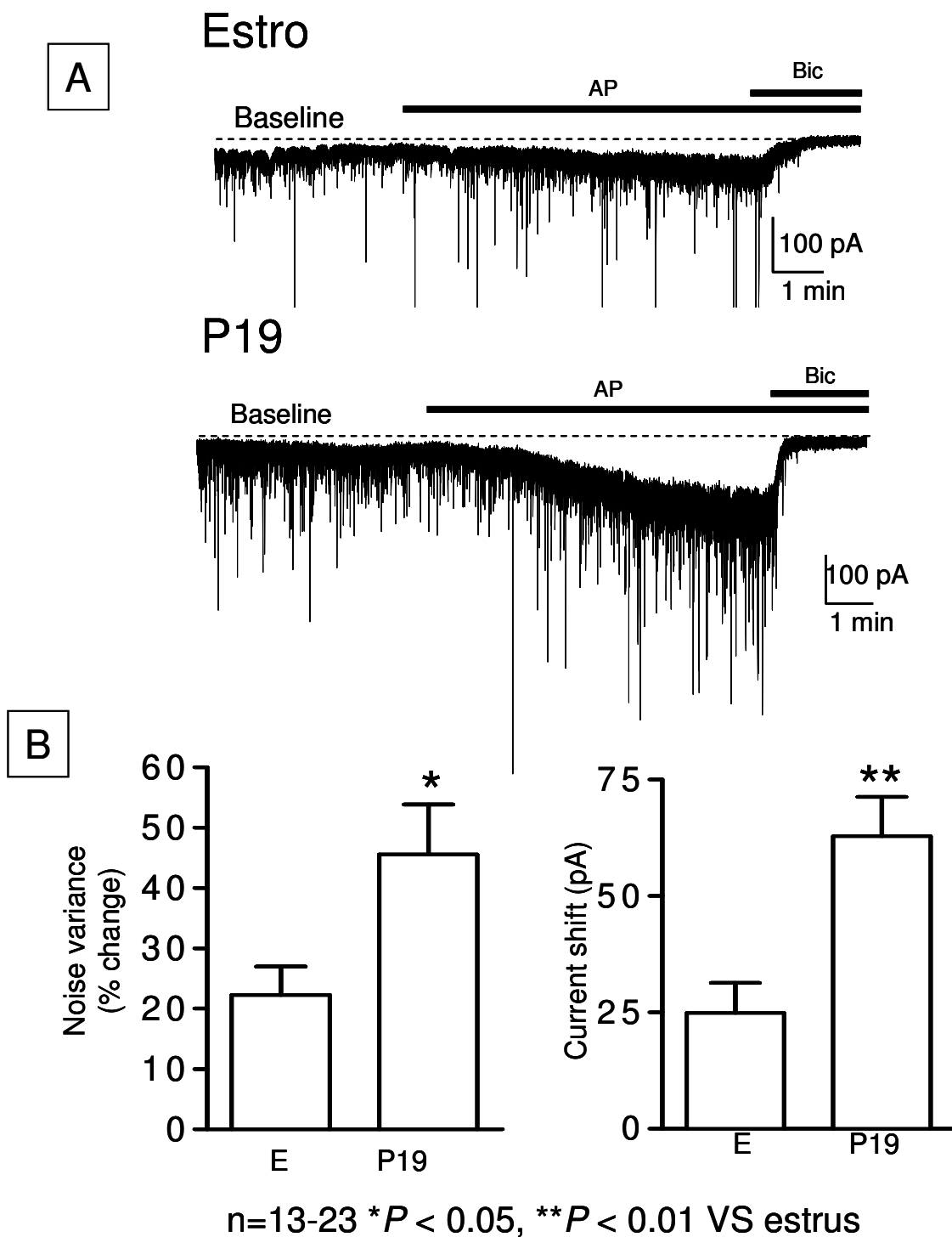
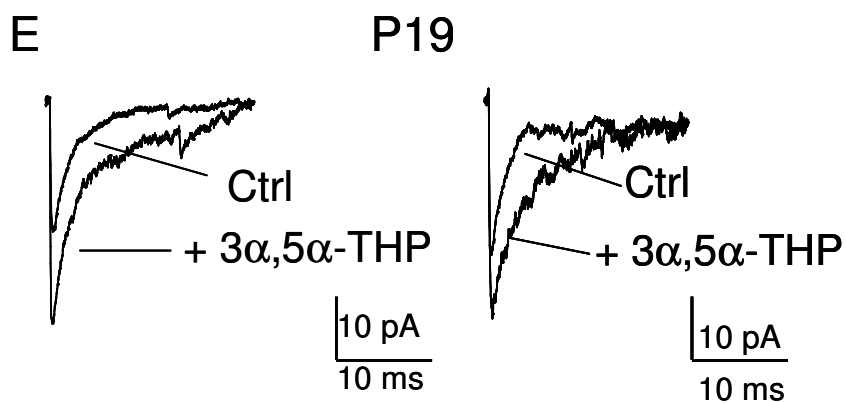


Figura 21

Effetto dell' AP sulla corrente fasica GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato di ratto durante la gravidanza

A



B

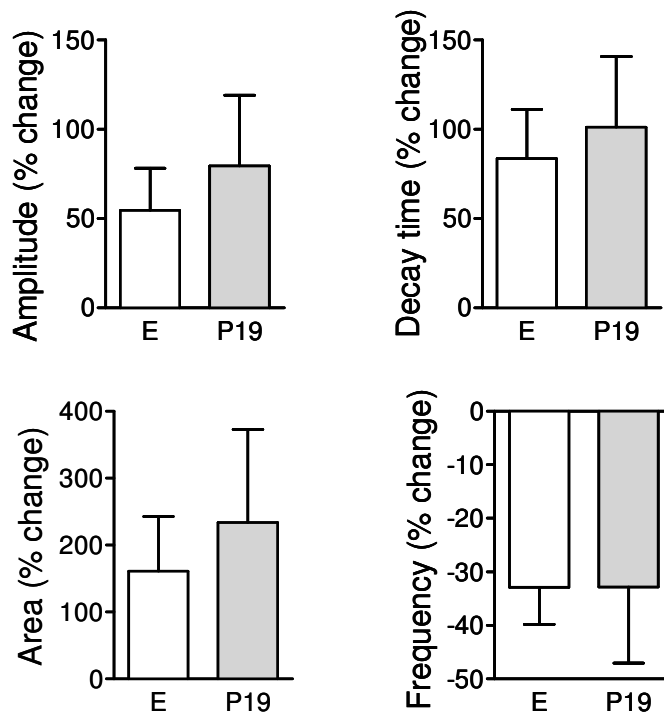


Figura 22

Effetto del lorazepam sulle sIPSCs delle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza

A

Group (<i>n</i>)	Amplitude (% change)	Decay time (% change)	Area (% change)	Frequency (% change)
E (6)	34.1 ± 11.9	41.2 ± 12.6	63.5 ± 12.5	16.0 ± 13.0
P19 (9)	21.6 ± 6.1	33.2 ± 12.6	53.1 ± 11.3	8.4 ± 6.9

Effetto del RO 1545-13 sulle sIPSCs delle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza e dopo il parto

B

Group (<i>n</i>)	Amplitude (% change)	Decay time (% change)	Area (% change)	Frequency (% change)
E (5)	-5.5 ± 7.2	-24.1 ± 4.1*	-31.2 ± 9.5*	-11.2 ± 7.3
P19 (8) pp2 (8)	-10.3 ± 6.8 12.2 ± 10.2	-19.5 ± 5.2* 28.6 ± 8.3*	-23.1 ± 10.3* 25 ± 11.5	-3.6 ± 6.9 -5.8 ± 7.7

Figura 23

Correnti toniche GABAergiche nelle cellule piramidali dell'area CA1 dell'ippocampo di ratto durante la gravidanza e dopo il parto

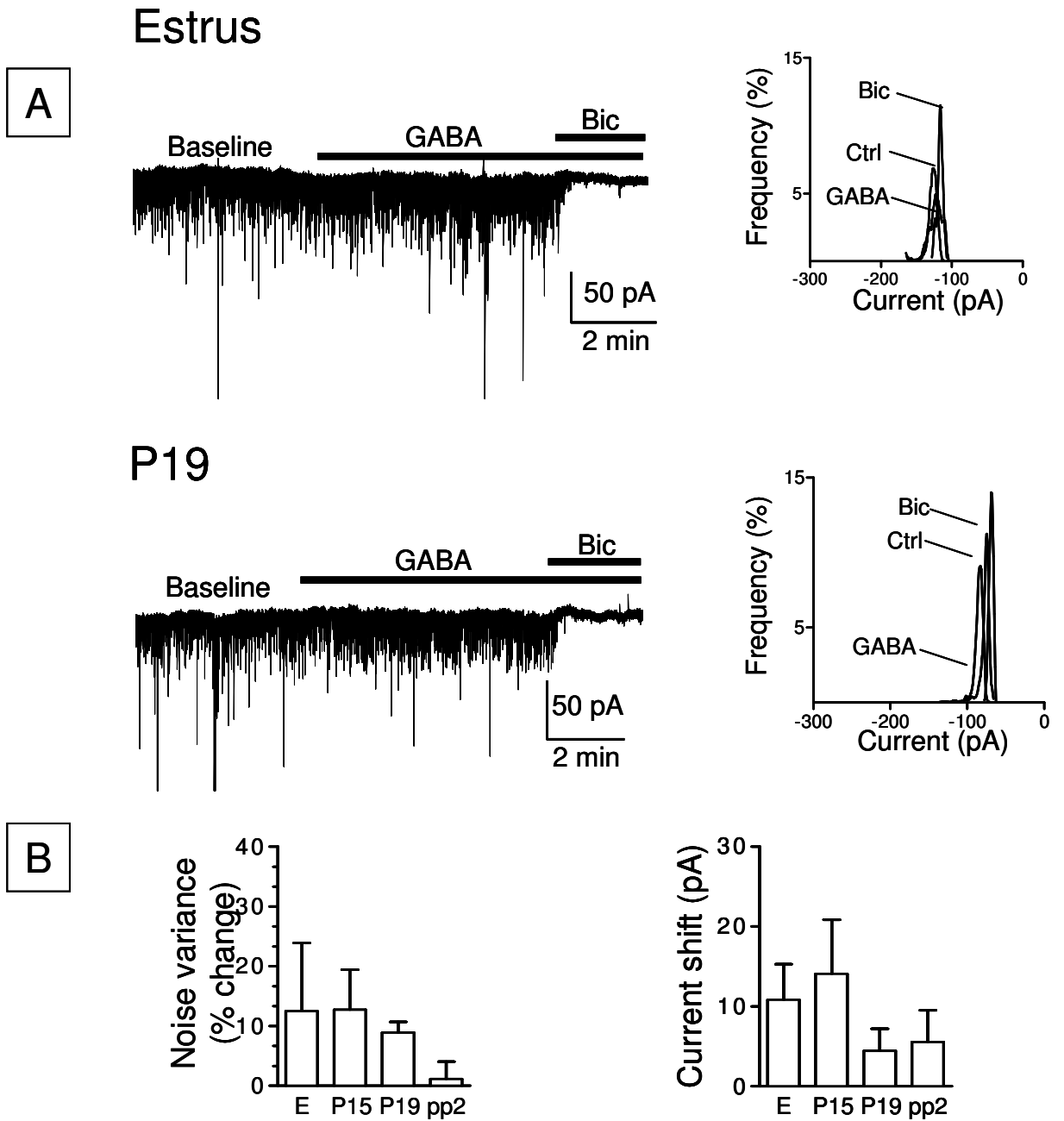
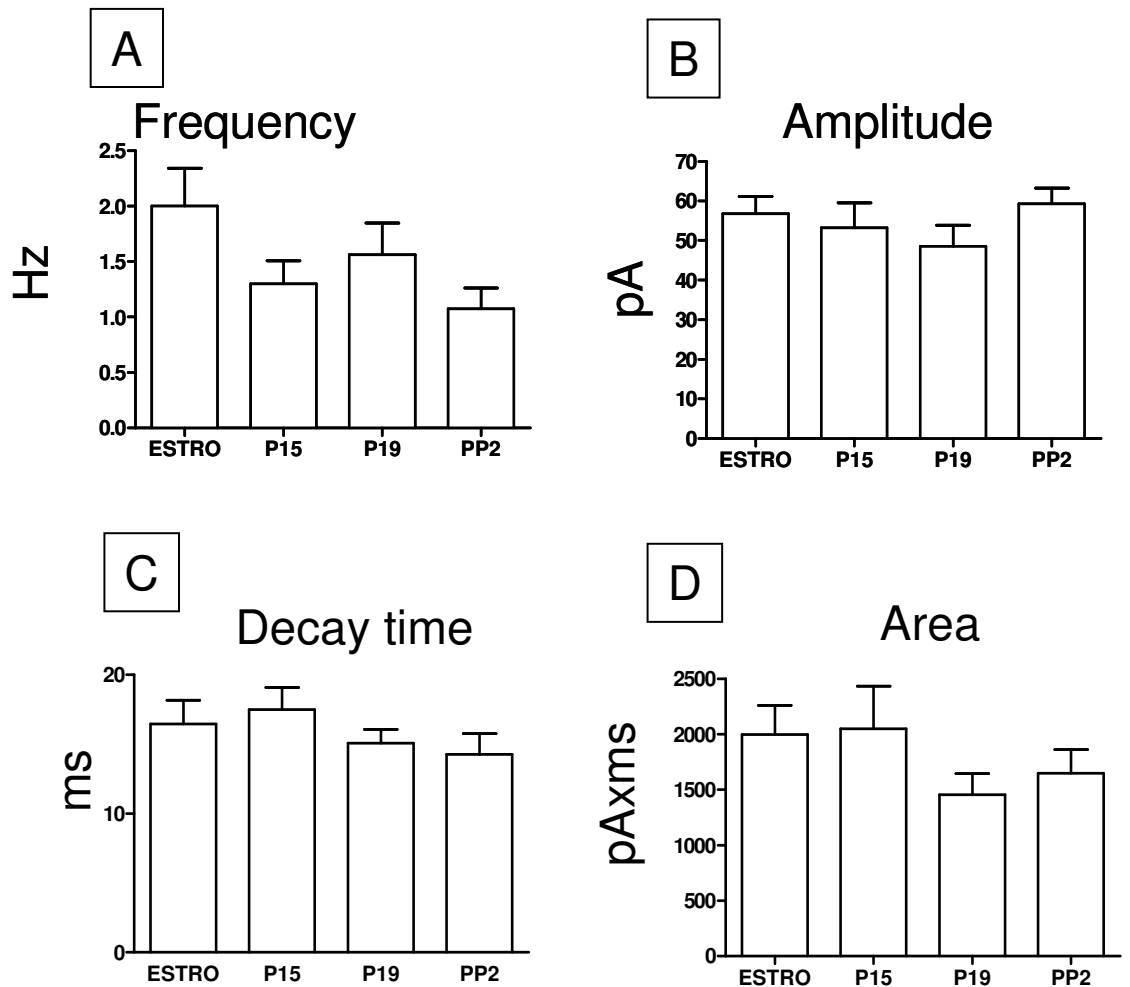


Figura 24

Correnti fasiche GABAergiche nelle cellule piramidali dell'area CA1 dell'ippocampo di ratto durante la gravidanza e dopo il parto

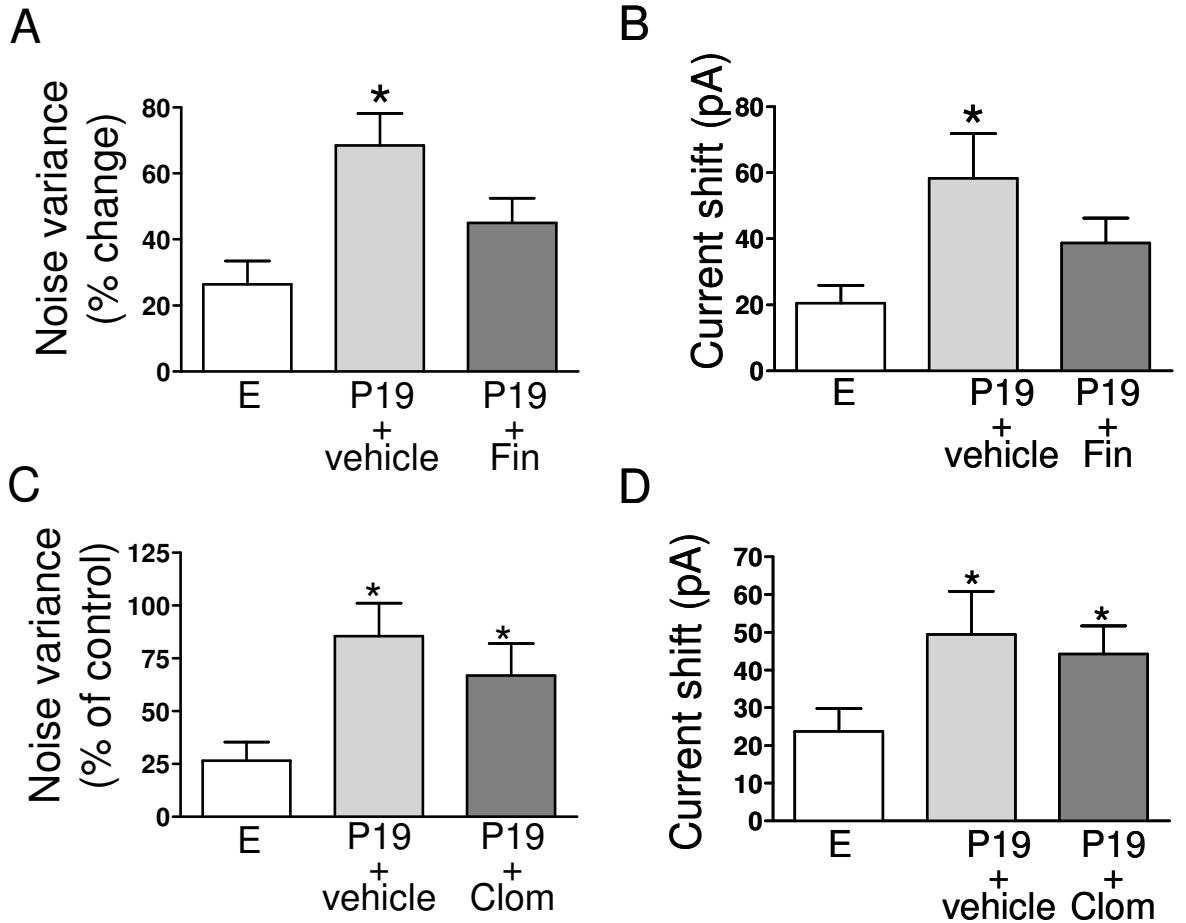


E

Group (n)	Amplitude (pA)	Decay time (ms)	Area (pA × ms)	Frequency (Hz)
E (27)	56.7 ± 4.4	16.4 ± 1.7	1994 ± 263	2.0 ± 0.3
P15 (11)	53.3 ± 6.2	17.5 ± 1.6	2048 ± 192	1.3 ± 0.2
P19 (13)	48.5 ± 5.2	15.1 ± 0.9	1453 ± 192	1.5 ± 0.3
pp2 (9)	59.1 ± 3.9	14.3 ± 1.5	1648 ± 210	1.0 ± 0.1

Figura 25

Effetto del trattamento con finasteride o clomifene sulle corrente tonica GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza



* $P < 0.05$ VS estrus

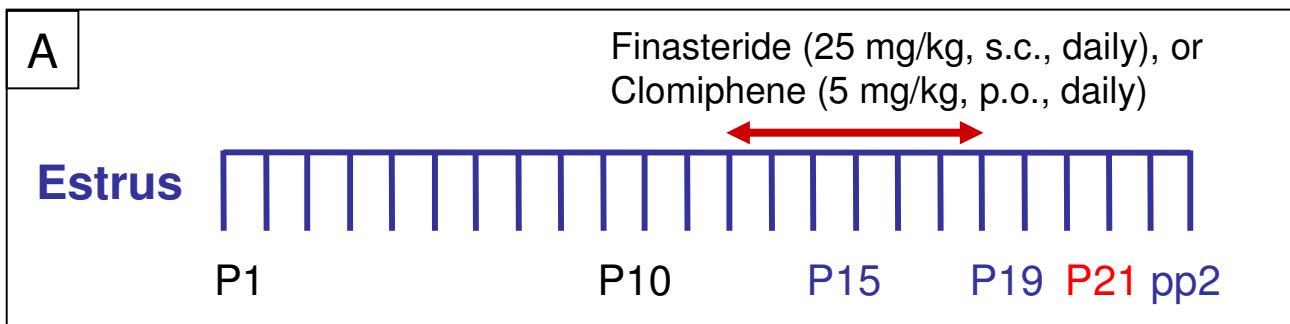


Figura 26

Registrazioni extracellulari nel giro dentato dell'ippocampo di ratto.

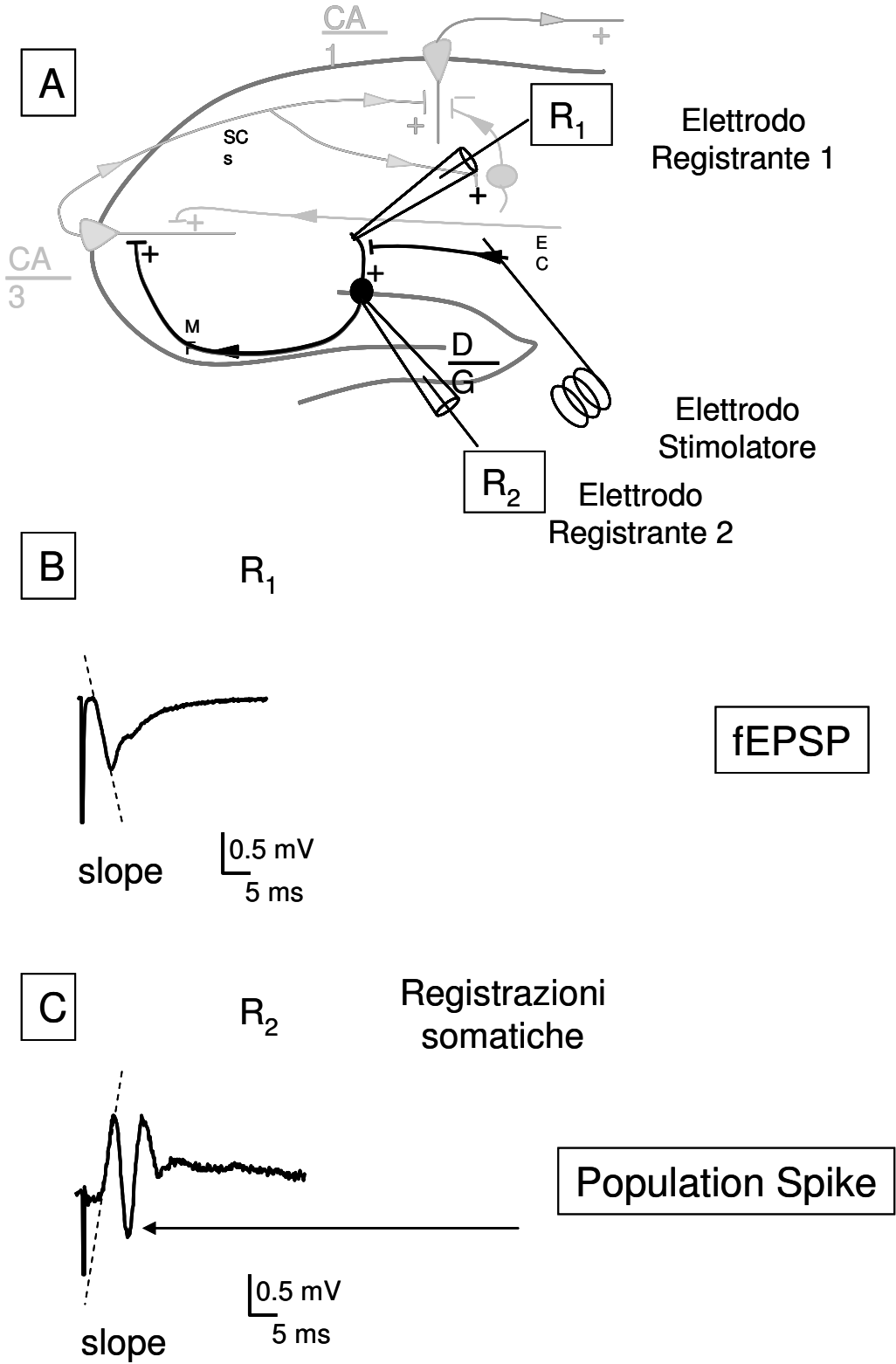


Figura 27

Slope e area del fEPSP aumentano in proporzione all'intensità di stimolazione

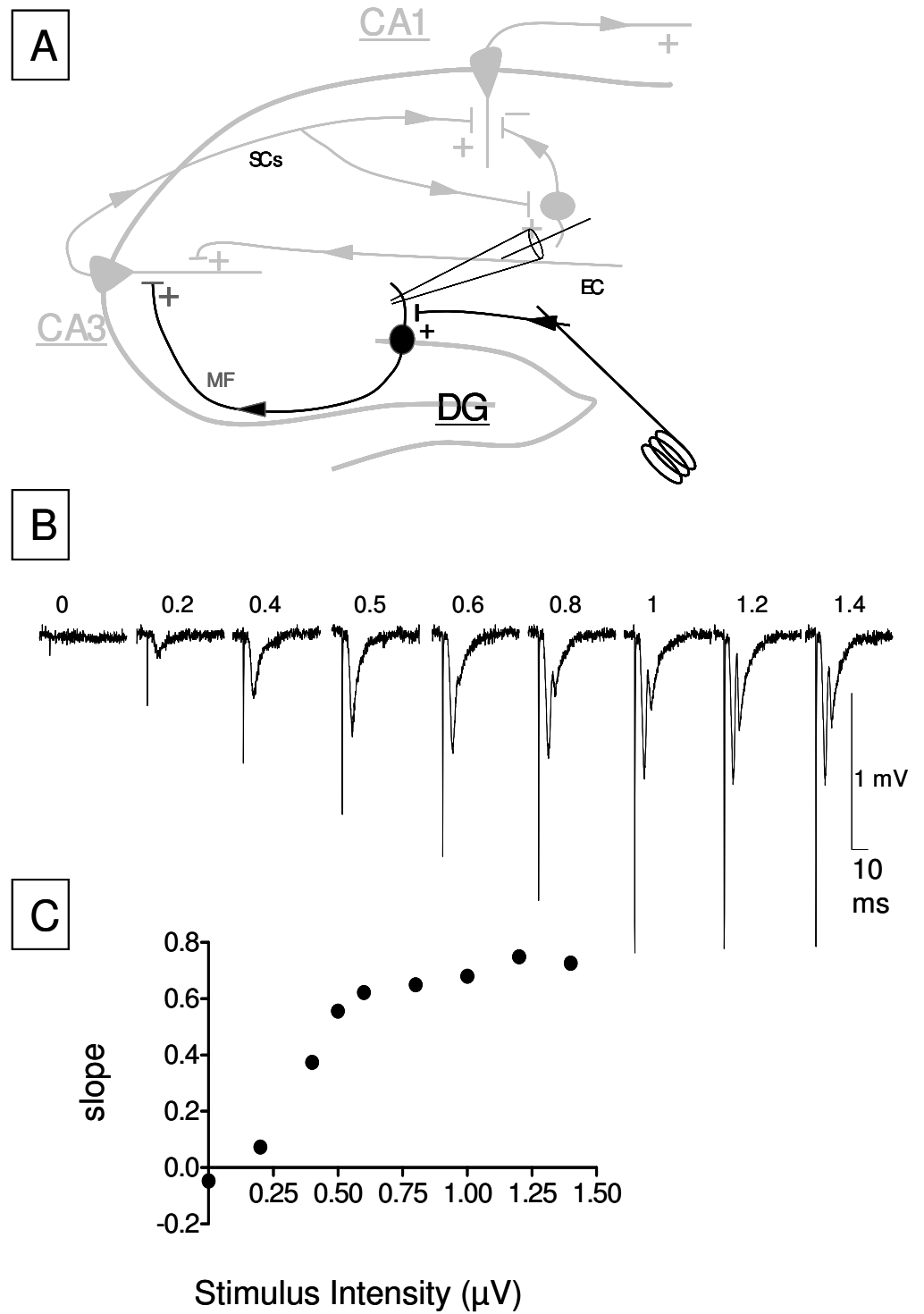


Figura 28

I fEPSP aumentano all'aumentare dell'intensità di stimolazione e sono sotto il controllo della trasmissione GABAergica

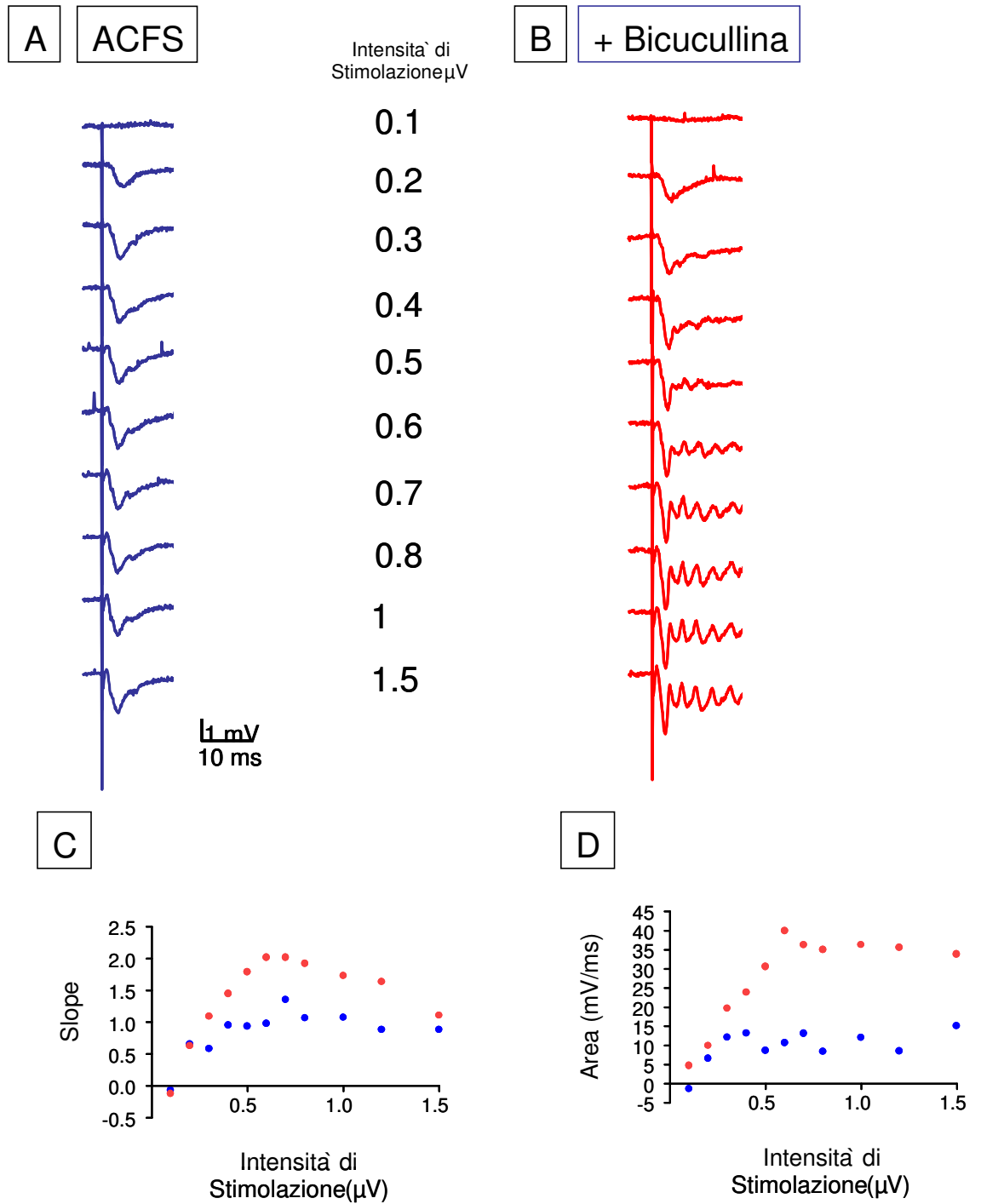


Figura 29

Nel giro dentato non è possibile indurre la long term potentiation senza la somministrazione di bicucullina, antagonista competitivo dei recettori GABAA.

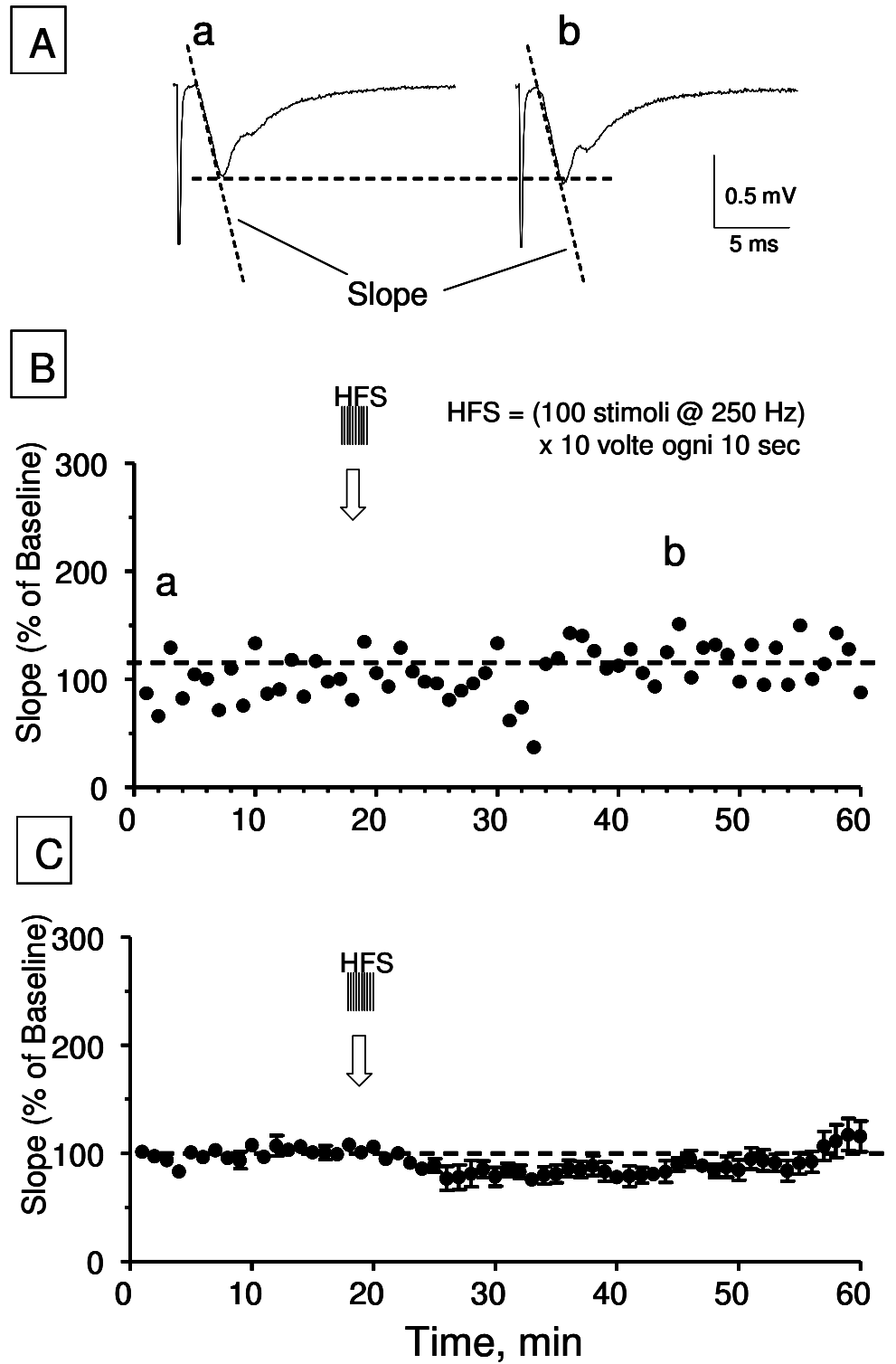


Figura 30

Nel giro dentato è possibile indurre la long term potentiation
Somministrando la bicucullina,
antagonista competitivo dei recettori GABAA.

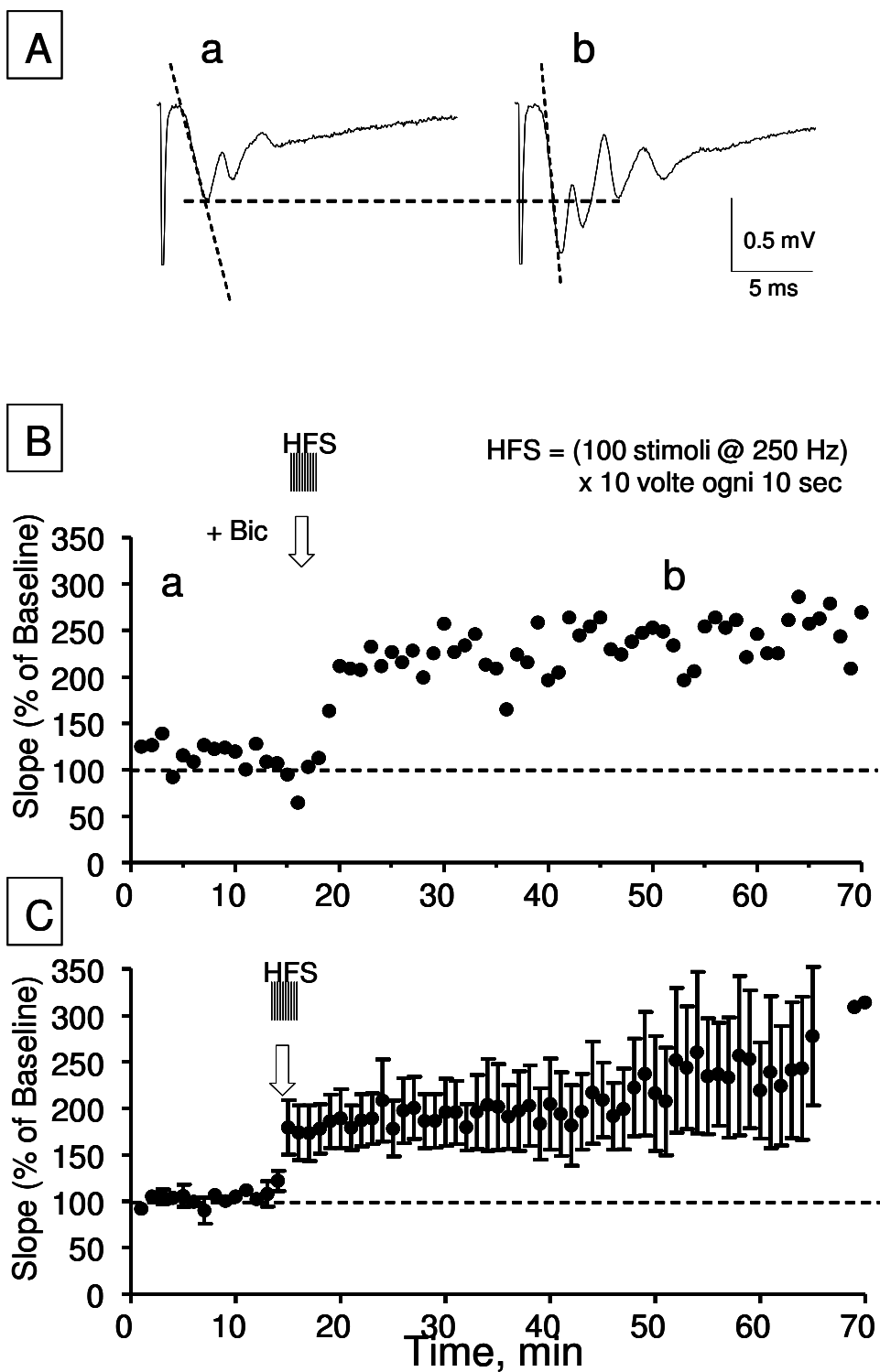


Figura 31

Induzione del LTP nel giro dentato di ratto in gravidanza

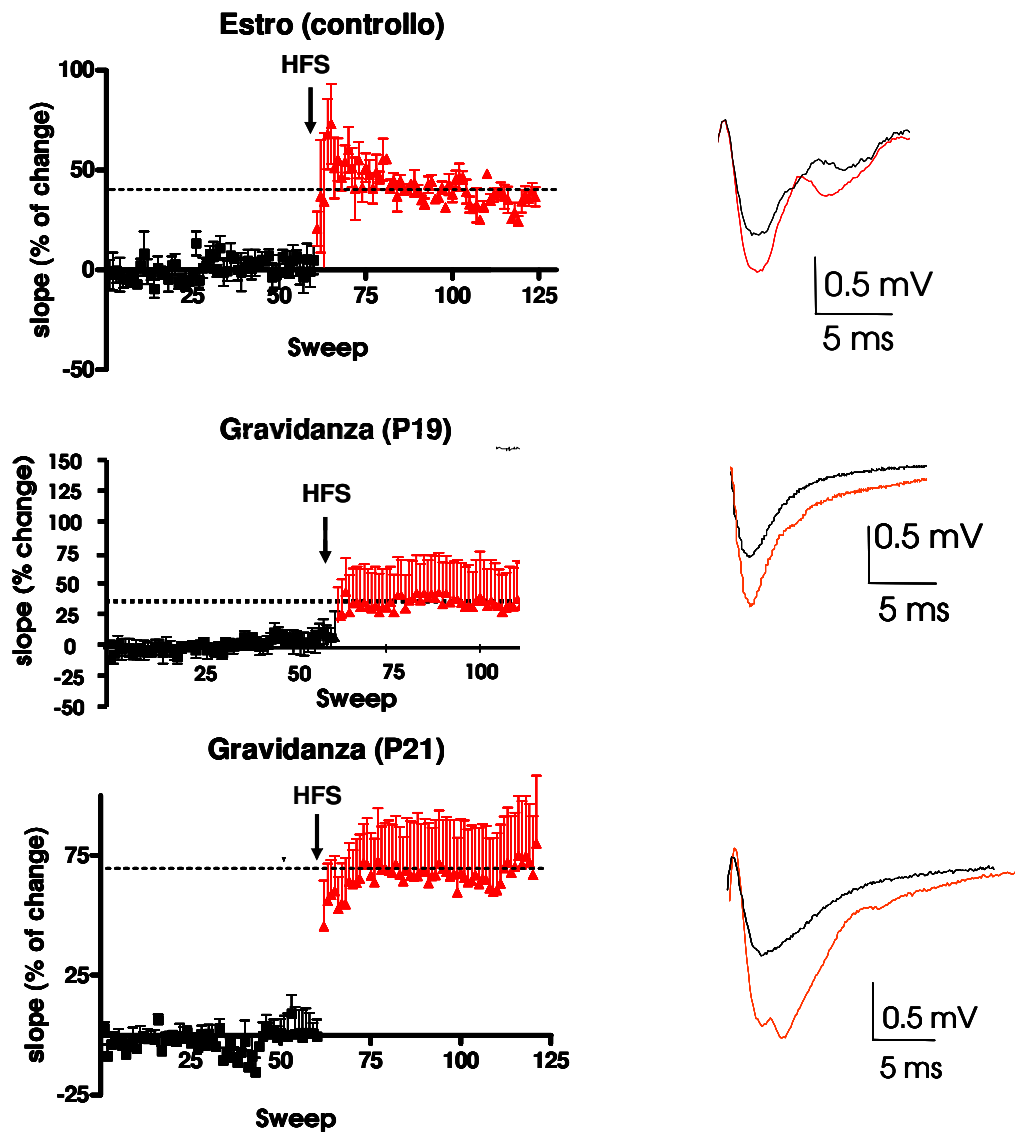


Figura 32

Induzione del LTP nel giro dentato di ratto dopo il parto

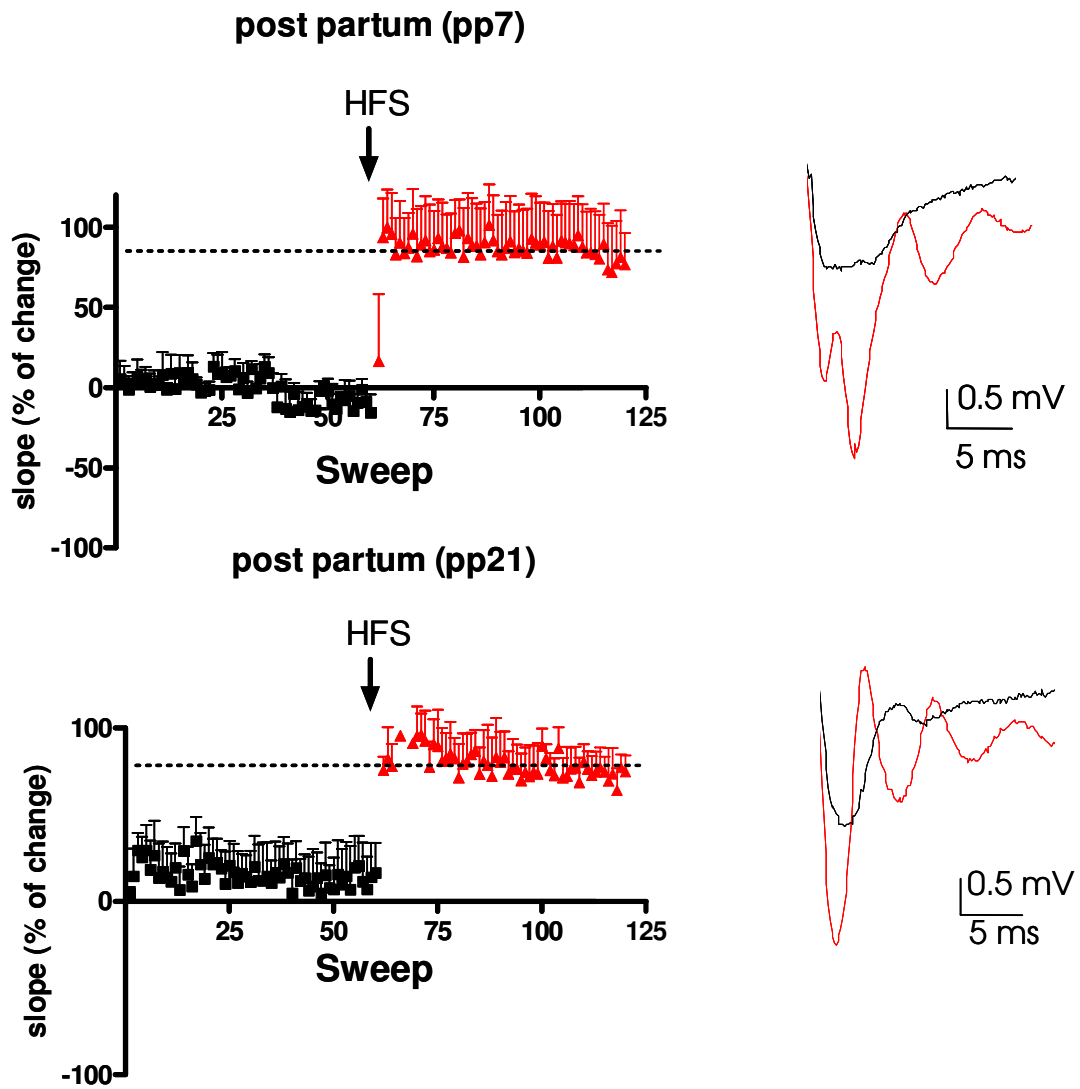
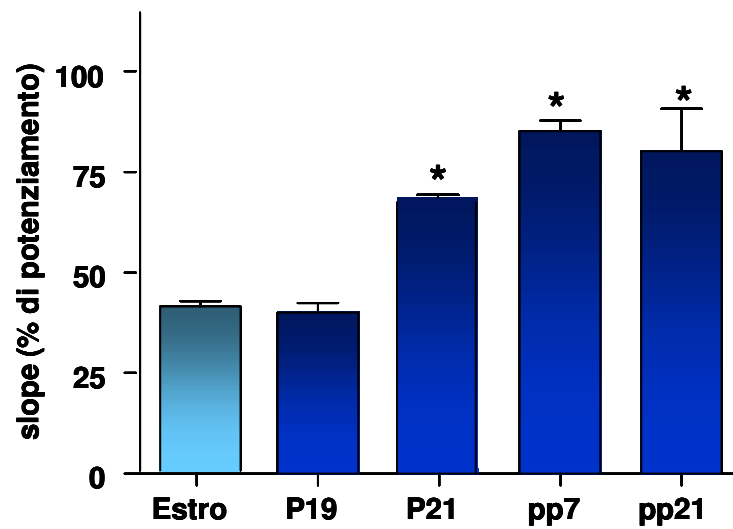


Figura 33

Variazioni nella plasticità sinaptica nel giro dentato di ratto in gravidanza e dopo il parto



$P < 0,05$

LEGENDE DELLE FIGURE

Figura 16

La trasmissione GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo di ratto è mediata da 2 tipi di recettori.

A. Circuito dell'ippocampo di ratto con in evidenza le varie popolazioni neuronali e le relative connessioni.

B. Schema di una sinapsi GABAergica con distinzione dei recettori in sinaptici ed extrasinaptici.

C. Tracciato esplicativo delle correnti fasiche.

D. Tracciato esplicativo delle correnti toniche con relativo blocco da parte dell'antagonista competitivo bicucullina.

Figura 17

Esempio di tracciato di una registrazione da cellule granulari del giro dentato (DGGC) dell'ippocampo di ratto in estro (E), giorno 15 e 19 di gravidanza (P15-P19) e 2 giorni dopo il parto (pp2) in presenza di acido kinurenico, GABA e bicucullina (la durata dell'applicazione è evidenziata dalle barre poste sopra la traccia). Accanto ad ogni traccia è presente il grafico che indica come varia la corrente tonica in seguito alla somministrazione di GABA esogeno e bicucullina.

Figura 18

A. Istogramma rappresentante la variazione del noise nei 4 gruppi sperimentali, espressa come percentuale di variazione rispetto al controllo (estro).

B. Istogramma rappresentante la variazione del current shift nei 4 gruppi sperimentali, espressa come percentuale di variazione rispetto al controllo (estro).

Figura 19

A. Istogramma rappresentante la variazione della frequenza nei 4 gruppi sperimentali, espressa come numero di eventi per secondo (Hz).

B. Istogramma rappresentante la variazione dell'ampiezza nei 4 gruppi sperimentali, espressa come variazione di corrente (pA).

C. Istogramma rappresentante la variazione del decay time nei 4 gruppi sperimentali, espressa in (ms).

D. Istogramma rappresentante la variazione dell'area nei 4 gruppi sperimentali, espressa come ampiezza per decay time (pAxms).

Figura 20

A. Esempio di tracciato di una registrazione da cellule granulari del giro dentato (DGGC) dell'ippocampo di ratto in estro (E) e al giorno 19 di gravidanza (P19) in presenza di acido kinurenico, AP e bicucullina (la durata dell'applicazione è evidenziata dalle barre poste sopra la traccia).

B. Istogrammi raffiguranti le variazioni del noise e della holding current dei 2 gruppi sperimentali (E e P19) espressi come percentuale di cambiamento rispetto al controllo e relativa significatività statistica.

Figura 21

A. Tracciati esplicativi dell'effetto dell' AP sulla corrente fasica GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato di ratto in estro e al giorno 19 di gravidanza (P19)

B. Istogramma rappresentante la variazione dell'ampiezza, del decay-time, dell'area e della frequenza nei 4 gruppi sperimentali, espressa come variazione percentuale rispetto al controllo(estro).

Figura 22

A. Effetto del lorazepam sulle sIPSCs delle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza

B. Effetto del RO 1545-13 sulle sIPSCs delle cellule granulari del giro dentato durante la gravidanza e dopo il parto.

Figura 23

A. Esempio di tracciato di una registrazione di corrente tonica GABAergica da cellule piramidali della regione CA1 dell'ippocampo di ratto in E e al giorno 19 di gravidanza (P19) in presenza di acido kinurenico, GABA e bicucullina (la durata dell'applicazione è evidenziata dalle barre poste sopra la traccia).

B. Istogrammi raffiguranti le variazioni sul noise e sulla holding current dei 4 gruppi sperimentali (E, P15, P19, pp2) espressi come percentuale di cambiamento rispetto al controllo.

Figura 24

A. Istogramma rappresentante la variazione della frequenza nei 4 gruppi sperimentali, espressa come numero di eventi per secondo (Hz).

B. Istogramma rappresentante la variazione dell'ampiezza nei 4 gruppi sperimentali, espressa come variazione di corrente (pA).

C. Istogramma rappresentante la variazione del decay time nei 4 gruppi sperimentali, espressa in ms.

D. Istogramma rappresentante la variazione dell'area nei 4 gruppi sperimentali, espressa come ampiezza per decay time (pAxms).

E. Tabella rappresentante le proprietà cinetiche delle correnti fasiche GABAergiche nei 4 gruppi sperimentali.

Figura 25

A. Istogramma raffigurante la variazione del noise nelle cellule granulari del giro dentato di ratto durante la gravidanza in seguito a trattamento cronico con finasteride

B. Istogramma raffigurante la variazione del current shift nelle cellule granulari del giro dentato di ratto durante la gravidanza in seguito a trattamento cronico con finasteride

C. Istogramma raffigurante la variazione del noise nelle cellule granulari del giro dentato di ratto durante la gravidanza in seguito a trattamento cronico con clomifene

D. Istogramma raffigurante la variazione del current shift nelle cellule granulari del giro dentato di ratto durante la gravidanza in seguito a trattamento cronico con clomifene

E. Rappresentazione schematica del trattamento con finasteride e clomifene

Figura 26

A. Circuito dell'ippocampo di ratto con in evidenza le varie popolazioni neuronali e le relative connessioni. R1 ed R2 rappresentano rispettivamente gli elettrodi registranti nella regione dendritica e nella regione somatica nel giro dentato dell'ippocampo di ratto.

B. Registrazioni dendritiche mostrano un field potential

C. Registrazioni somatiche con annesso population spike.

Figura 27

A. Circuito dell'ippocampo di ratto con in evidenza le varie popolazioni neuronali e le relative connessioni. L'elettrodo registrante è posizionato nella regione dendritica.

B. Sia l'ampiezza che lo slope della risposta aumentano marcatamente all'aumentare dell'intensità di stimolazione. L'aumento del valore della slope raggiunge un plateau a circa $1 \mu\text{V}$. In seguito a stimolazioni con intensità superiore a $0.8 \mu\text{V}$ vi è l'insorgenza di rapidi e transienti potenziali d'azione sincronizzati

C. L'aumentata intensità di stimolazione aumenta la pendenza dello slope fino al raggiungimento di un plateau.

Figura 28

A. La risposta alla stimolazione è costituita da un fEPSP, causato dalla depolarizzazione sincronizzata della popolazione neuronale che si trova in prossimità dell'elettrodo registrante. Lo slope, vale a dire la pendenza della risposta, è il parametro maggiormente considerato in questo tipo di registrazioni. Come si può vedere dai tracciati e dai grafici riassuntivi lo slope e l'ampiezza della risposta aumentano marcatamente all'aumentare dell'intensità di stimolazione.

B. In presenza dell'antagonista dei recettori GABA_A bicucullina, stimoli di crescente intensità come quelli applicati in A hanno indotto risposte con slope e ampiezza maggiore rispetto a quelli ottenuti in condizione di controllo.

C e D. Sommario degli effetti indotti da stimolazioni a intensità crescente in condizione di controllo e in presenza di bicucullina. Si può notare che l'aumento di questi valori raggiungono un plateau a circa 0.7 μ V e stimolazioni con intensità superiori non portano a risposte con slope maggiore.

Figura 29

A. Il parametro valutato nel LTP è la pendenza dello slope. Una pendenza uguale non indica alcun cambiamento nella risposta neuronale.

B. L'elevata frequenza di stimolazione non induce in questo caso la comparsa del LTP. HSF sta per high frequency stimulation ad indicare la somministrazione di stimoli ad elevata frequenza. Nel grafico a sta ad indicare il periodo di controllo, mentre b il periodo di stimolazione ad elevata frequenza.

C. Grafico rappresentante la media delle risposte agli stimoli ad elevata frequenza in diversi animali. Non si vede alcun potenziamento in seguito alla stimolazione ad elevata frequenza (n=6).

Figura 30

A. Il parametro valutato nel LTP è la pendenza dello slope. Una maggiore pendenza del fEPSP indica la comparsa del potenziamento a seguito degli stimoli ad elevata frequenza.

B. L'elevata frequenza di stimolazione porta ad un potenziamento della trasmissione neuronale in presenza di bicucullina, antagonista competitivo dei recettori GABAA. HSF sta per high frequency stimulation ad indicare la somministrazione di stimoli ad elevata frequenza. Nel grafico a sta ad indicare il periodo di controllo, mentre b il periodo di stimolazione ad elevata frequenza.

C. Risultati simili sono stati ottenuti anche in altre 6 registrazioni.

Figura 31

I grafici riportano le percentuali di variazione dello slope degli fEPSP per ciascuna risposta (sweep) dopo la stimolazione ad alta frequenza (HFS) rispetto al valore registrato prima della stimolazione, nei ratti di controllo (in estro), al giorno 19 e 21 di gravidanza. I valori rappresentano le medie \pm ES (n, 4 – 8). I tracciati accanto ai grafici sono esempi di registrazioni extracellulari di fEPSP in condizioni basali e dopo HFS.

Figura 32

I grafici riportano le percentuali di variazione dello slope degli fEPSP per ciascuna risposta (sweep) dopo la stimolazione ad alta frequenza (HFS) rispetto al valore registrato prima della stimolazione, nei ratti che hanno partorito rispettivamente da 7 e 21 giorni (pp7 e pp21). I valori rappresentano le medie \pm ES (n, 4 – 8). I tracciati accanto ai grafici sono esempi di registrazioni extracellulari di fEPSP in condizioni basali e dopo HFS.

Figura 33

Il grafico riporta le percentuali di aumento medio dello slope degli fEPSP dopo la stimolazione ad alta frequenza (HFS) rispetto al valore registrato prima della stimolazione, nei diversi gruppi sperimentali. I valori rappresentano le medie \pm ES (n, 4 – 8). * $P < 0.05$ rispetto al valore di controllo.

BIBLIOGRAFIA

- ❖ Adams, M.M. et al. (2004) Estrogen modulates synaptic N-methyl-Daspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 474, 419–426
- ❖ Adkins CE, Pillai GV, Kerby J, Bonnert TP, Haldon C, McKernan RM, Gonzalez JE, Oades K, Whiting PJ, Simpson PB (2001) $\alpha 4\beta 3\delta$ GABAA receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J Biol Chem* 276:38934-38939.
- ❖ Anderson et al. (1975) *The Hippocampus*, Vol 1, pp. 155-76
- ❖ Azzolina B, Ellsworth K, Andersson S, Geissler W, Bull HG, Harris GS (1997) Inhibition of rat α -reductases by finasteride: evidence for isozyme differences in the mechanism of inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:55-64.
- ❖ Barnard E.A. et al., International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 1998 ;50, 291-313.
- ❖ Barnard, A.E., Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem Sci.* 1992 Oct;17(10):368-74. Review.
- ❖ Baulieu EE. Studies on dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate during aging. *C. R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie/Life science* 1995;318:7.
- ❖ Bekkers JM, Stevens CF. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature.* 1989 Sep 21;341(6239):230-3.
- ❖ 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 GABAA receptor. *Nat Rev Neurosci* 6:565-575.
- ❖ Berchtold, N.C. et al. (2001) Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1992–2002

- ❖ Bertrand and Changeux, 1995. Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intercellular communication. *Seminars Neurosci.* 7, 75-90.
- ❖ Biggio F, Gorini G, Caria S, Murru L, Mostallino MC, Sanna E, Follesa P (2006) Plastic neuronal changes in GABAA receptor gene expression induced by progesterone metabolites: in vitro molecular and functional studies. *Pharmacol Biochem Behav* 84:545-554.
- ❖ Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973 Jul;232(2):331-56.
- ❖ Bowery et al. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1987 Feb;20(2):365-83.
- ❖ Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA (2002) Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha 4\beta 3\delta$ GABAA receptors. *Br J Pharmacol* 136:965-974.
- ❖ Brussard et al. Long-term plasticity of postsynaptic GABAA-receptor function in the adult brain: insights from the oxytocin neurone. *Trends Neurosci.* 2000 May;23(5):190-5. Review.
- ❖ Burt e Kamatchi, 1991. GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* 1991 Nov;5(14):2916-23
- ❖ Cameron OG, Kuttesch D, McPhee K, Curtis GC. Menstrual fluctuation in the symptoms of panic anxiety *J Affect Disord.* 1988; 15:169-174
- ❖ Cao, X., Cui, Z., Feng, R., Tang, Y. P., Qin, Z., Mei, B. and Tsien, J. Z., 2007. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci.* 25, 1815-1822.
- ❖ Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA, Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004

- ❖ Carter CS, Altemus M, Chrousos GP. Neuroendocrine and emotional changes in the post-partum period. *Prog Brain Res.* 2001; 133:241-249
- ❖ Cohen LS, Sichel DA, Dimmock JA, et al. Impact of pregnancy on panic disorder: a case series. *J Clin Psychiatry.* 1994a; 55:284-288.//
- ❖ 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 USA* 95:13284–13289.
- ❖ 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.
- ❖ Cummings, J. A., Mulkey, R. M., Nicoll, R. A. and Malenka, R. C., 1996. Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron.* 16, 825-833.
- ❖ de Brito Faturi C, Teixeira-Silva F, Leite JR (2006) The anxiolytic effect of pregnancy in rats is reversed by finasteride. *Pharmacol Biochem Behav* 85:569-574.
- ❖ Delorey and Olsen, 1992 *J. Biol. Chem.* 267, 16747-16750.
- ❖ Dickson, R.B. et al. (1986) Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth. *Science* 232,1540–1543
- ❖ Doble A and Martin I.L. 1992 *TIPS* 13, 76-81.
- ❖ Dou, Y., Yan, J., Wu, Y. Y., Cui, R. Y. and Lu, C. L., 2001. [Calcium dependent synaptic plasticity]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.* 32, 35-38.
- ❖ Dudek, S. M. and Bear, M. F., 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 4363-4367.

- ❖ Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gililand KR, Gorin-Meyer RE, Wiren KM (2006) A new look at the 5 α -reductase inhibitor finasteride. *CNS Drug Rev* 12:53-76.
- ❖ Forti L., Bossi M., Bergamaschi A., Villa A., Malgaroli A., (1997). *Nature*, 388: 874-878.
- ❖ Fritschy J.M. et al., 1999. GABAergic neurons and GABA_A-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem. Inter.* 34, 435-445.
- ❖ Gage P.W. Activation and modulation of neuronal K⁺ channels by GABA. *Trends Neurosci.* 1992 Feb;15(2):46-51. Review.
- ❖ Genazzani AR, Palumbo MA, de Micheroux AA, Artini PG, Criscuolo M, Ficarra G, Guo A-L, Benelli A, Petraglia F, Purdy RH. Evidence for a role for the neurosteroid allopregnanolone in the modulation of reproductive function in female rats. *Eur J Endocrinol* 1995;133:375.
- ❖ Glykys J, Peng Z, Chandra D, Homanics GE, Houser CR, Mody I (2007) A new naturally occurring GABA_A receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat Neurosci* 10:40-48.
- ❖ Griffiths JL, Lovick TA (2005) GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express α 4, β 1 and δ GABA_A receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience* 136:457-466.
- ❖ 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.
- ❖ Hebb, D. O., 1950. Animal and physiological psychology. *Annu Rev Psychol.* 1, 173-188.
- ❖ 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.
- ❖ Heynen AJ, Abraham WC, Bear MF. Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo. *Nature.* 1996 May 9;381(6578):163-6.
- ❖ Homburg R (2005) Clomiphene citrate—end of an era? A mini-review. *Hum Reprod* 20:2043-2051.

- ❖ Ikeda, T. et al. (1982) Identification of estrogen-inducible growth factors (estromedins) for rat and human mammary tumor cells in culture. *In Vitro* 18, 961–979
- ❖ Izquierdo I. and Medina J.H., 1991. GABA_A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *TIPS* 12, 260-265.
- ❖ Kang, H., Welcher, A. A., Shelton, D., and Schuman, E. M., 1997. Neurotrophins and time: Different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation, *Neuron*, 19, 653-664
- ❖ Kendrick KM, Keverne EB, Hinton MR, Goode JA. Oxytocin, amino acid and monoamine release in the region of the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of the sheep during parturition and suckling. *Brain Res.* 1992; 569:199-209
- ❖ Knoflach F, Benke D, Wang Y, Scheurer L, Luddens H, Hamilton BJ, Carter DB, Mohler H, JA (1996) Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors alpha 4 beta 2 gamma 2 and alpha6 beta 2 gamma 2. *Mol Pharmacol* 50:1253-1261.
- ❖ Korte, M., et al., 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 8856-8860.
- ❖ Kufuji et al., 1991 *J. Neurochem.* 56, 713-715.
- ❖ Lambert J.J. et al., 2003. Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Progress in Neurobiol.* 71: 67-80.
- ❖ Levine RE, Oandasan AP, Primeau LA, Berenso AB. Anxiety disorders during pregnancy and postpartum. *Am J Perinatol.* 2003;20:239-248.
- ❖ Lisman, J., 1989. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 9574-9578.
- ❖ Lovick TA, Griffiths JL, Dunn SM, Martin IL (2005) Changes in GABA_A receptor subunit expression in the midbrain during the oestrous cycle in Wistar rats. *Neuroscience* 131:397-405.
- ❖ Luddens H. and Wisden W. 1991 *TIPS* 12, 49-51.

- ❖ Luddens H. et al., 1991 More than one alpha variant may exist in a GABA_A/benzodiazepine receptor complex. *J. Receptor Res.* 11: 535-551.
- ❖ MacDonald R.L. and Olsen R.W. 1994. GABA_A receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 569-602.
- ❖ Maguire Jamie L, Stell Brandon M, Mahsan Rafizadeh, Mody Istvan, Ovarian cycle-linked changes in GABA_A receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nature*, 2005
- ❖ Maguire J, Mody I (2008) GABA_A plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression. *Neuron* 59:207-213.
- ❖ Maguire J, Mody I (2007) Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA_A receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J Neurosci* 27:2155-2162.
- ❖ 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- 1007.
- ❖ Maina G, Albert U, Bogetto F, Vaschetto P, Ravizza L. Recent life events and obsessive-compulsive disorder (OCD): the role of pregnancy/delivery. *Psychiatry Res.* 1999; 89:49-58
- ❖ Malinow R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Apr 29;358(1432):707-14. Review.
- ❖ Manahan-Vaughan D. Group 1 and 2 metabotropic glutamate receptors play differential roles in hippocampal long-term depression and long-term potentiation in freely moving rats. *J Neurosci.* 1997 May 1;17(9):3303-11
- ❖ McKernan RM. and Whiting PJ. (1996). Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *TINS* 19: 139-143.
- ❖ McLeod DR, Hoehn-Saric R, Foster GV, Hipsley PA. The influence of premenstrual syndrome on ratings of anxiety in women with generalized anxiety disorder *Acta Psychiatr Scand.* 1993; 88:248-251.

- ❖ Mehta A.K. and Ticku M.K., 1999. An update on GABA_A receptors. *Brain Res. Rev.* 29, 196–217.
- ❖ Mellon SH. Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1003.
- ❖ Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9:295
- ❖ Morrisett RA, Swartzwelder HS 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.
- ❖ Mostallino MC, Mura ML, Maciocco E, Murru L, Sanna E, Biggio G (2006) Changes in expression of the δ subunit of the GABA_A receptor and in receptor function induced by progesterone exposure and withdrawal. *J Neurochem* 99:321-332.
- ❖ Mott D.D. and Lewis D.V. The pharmacology and function of central GABA_B receptors. *Int Rev Neurobiol.* 1994;36:97-223. Review
- ❖ Mulkey RM, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron.* 1992 Nov;9(5):967-75.
- ❖ Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S. and Malenka, R. C., 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature.* 369, 486-488.
- ❖ Nairn, A. C. and Shenolikar, S., 1992. The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. *Curr Opin Neurobiol.* 2, 296-301.
- ❖ Nusser Z, Mody I (2002) Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 87:2624-2628.
- ❖ Nutt D.J. et al., 1990. The neurochemistry of anxiety: an update. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 14, 737-752.
- ❖ Olsen R.W. and Avoli M., 1997. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 38, 399-407.
- ❖ Olsen R.W. and Tobin A.J., 1990 *FASEB J.* 4, 1469-1480.
- ❖ Owens D. F. and Kriegstein A. R., 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Publishing Group, Vol 3, September 2002.*

- ❖ Pang, P. T., & Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: Role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Research Reviews*, 3, 407–430.
- ❖ Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., et al. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal . plasticity. *Science*, 306, 487–491.
- ❖ Patterson, S. L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K. C., Scanlin, H., Drake, C., et al. (2001). Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*, 32, 123140.
- ❖ Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J* 1992;6:2311.
- ❖ Pigott TA. Anxiety disorders in women *Psychiatr Clin N Am.* 2003; 26:621-672
- ❖ Priker et al. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 2000;101(4):815-50.
- ❖ Rex, C. S., Lin, C. Y., Kramar, E. A., Chen, L. Y., Gall, C. M., and Lynch, G., 2007. Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 3017-3029.
- ❖ Scharfman HE, Maclusky NJ. Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends Neurosci.* 2005 Feb;28(2):79-85. Review.
- ❖ Schofield P.R. et al., 1987. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature* 328, 221-227.
- ❖ Schofield P.R. et al., 1990 *TINS* 13, 8-11.
- ❖ Seeburg P.H. et al., 1990 *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 29-40.
- ❖ Segal, M. and Murphy, D. (2001) Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm. Behav.* 40, 156–159
- ❖ Shen H, Gong QH, Yuan M, Smith SS (2005) Short-term steroid treatment increases δ GABAA receptor subunit expression in rat CA1

hippocampus: pharmacological and behavioral effects. *Neuropharmacology* 49:573-586.

- ❖ Shen, W., Wu, B., Zhang, Z., Dou, Y., Rao, Z. R., Chen, Y.R, et al. 2006. Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling. *Neuron*, 50, 401-414.
- ❖ Sholomskas DE, Wickamaratne PJ, Dogolo L, O'Brien DW, Leaf PJ, Woods SW. Postpartum onset of panic disorder: a coincidental event? *J Clin Psychiatry*. 1993;54:476-480
- ❖ Sichel DA, Cohen LS, Dimmock JA, Rosenbaum JF. Postpartum obsessive compulsive disorder: a case series. *J Clin Psychiatry*. 1993; 54:156-159.
- ❖ Sieghart W. and Sperk G., 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA_A 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.
- ❖ Sieghart W et al 1999. Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochem. Int.* 34: 379-385
- ❖ Skouteris H, Wertheim EH, Rallis S, Milgrom J, Paxton SJ (2008) Depression and anxiety through pregnancy and the early postpartum: An examination of prospective relationships. *J Affect Disord*.
- ❖ Smith G.B and Olsen R.W., 1995 Functional domains of GABA_A receptors. *TIPS* 16, 162-168.
- ❖ Smith SS, Gong QH, Hsu FC, Markowitz RS, French-Mullen JM, Li X (1998a) GABA_A receptor α 4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* 392:926-930.
- ❖ Smith SS, Gong QH, Li X, Moran MH, Bitran D, Frye CA, Hsu FC (1998b) Withdrawal from 3 α -OH-5 α -pregnan-20-one using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA_A-gated current and increases the GABA_A receptor α 4 subunit in association with increased anxiety. *J Neurosci* 18:5275-5284.
- ❖ Sohrabji, F. et al. (1995) Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11110–11114

- ❖ Solum, D.T. and Handa, R.J. (2002) Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 2650–2659
- ❖ Speroff L, Glass RH, Kase NG. Biosintesi ormonale, metabolismo e meccanismo d'azione. In: *Endocrinologia Ginecologica Clinica e Sterilità*. Torino: Centro Scientifico Internazionale 1997:31.
- ❖ Stell BM, Brickley SG, Tang CY, Farrant M, Mody I (2003) Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by δ subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14439-14444.
- ❖ Stell Brandon M. and Istvan Mody. Receptors with Different affinities mediate phasic and tonic GABAA Conductances in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 2002, Vol. 22 RC223, pp. 1-5
- ❖ Stephenson F.A. et al., 1991 *Curr. Asp. Neurosci.* 3, 177-193.
- ❖ Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K, Smith SS (2002) Hormonally regulated $\alpha 4\beta 2\delta$ GABAA receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* 5:721-722.
- ❖ Taya K, Greenwald GS (1981) In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the pregnant rat. *Biol Reprod* 25:683-691.
- ❖ Thiels, E., Norman, E. D., Barrionuevo, G. and Klann, E., 1998. Transient and persistent increases in protein phosphatase activity during long-term depression in the adult hippocampus in vivo. *Neuroscience.* 86, 1023-1029.
- ❖ Toran-Allerand, C.D. et al. (1988) Estrogen and insulin synergism in neurite growth enhancement in vitro: mediation of steroid effects by interactions with growth factors? *Brain Res.* 469, 87–100
- ❖ Tretter V. et al., 1997. Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA_A receptor subtype. *J. Neurosci.* 17, 2728-2737.
- ❖ Tsien, J. Z., Huerta, P. T. and Tonegawa, S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 87, 1327-1338.

- ❖ Turek F.W. and Van Reeth O., 1988. Altering the mammalian circadian clock with the short-acting benzodiazepine triazolam. *TINS*. 11, 535-541.
- ❖ Wafford KA, Thompson SA, Thomas D, Sikela J, Wilcox AS, Whiting PJ (1996) Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha4 subunit. *Mol Pharmacol* 50:670-678.
- ❖ Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I (2003) Perisynaptic localization of δ subunit-containing GABAA receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:10650-10661.
- ❖ 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, P.J.. The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem Int*. 1999 May;34(5):387-90. Review.
- ❖ Williams KE, Koran LM. Obsessive-compulsive disorder in pregnancy, the puerperium, and the premenstruum. *J Clin Psychiatry*. 1997; 58:330-334.
- ❖ Wisden W. and Seeburg P.H., 1992 *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 263-269.
- ❖ Wisner KL, Peindle KS, Hanusa BH. Effects of childbearing on the natural history of panic disorder with comorbid mood disorder. *J Affect Disord*. 1996; 41:173-180.
- ❖ Wittchen H-U, Becker E, Lieb R, Krause P. Prevalence, incidence and stability of premenstrual dysphoric disorder in the community. *Psychol Med*. 2002; 32:119-132
- ❖ Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL (2002) Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABAA receptors containing the δ subunit. *J Neurosci* 22:1541-1549.
- ❖ Wong et al., 1992 *Mol. Pharmacol.* 42, 996-1003.

- ❖ Yamada, K. and Nabeshima, T. (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J. Pharmacol. Sci.* 91, 267–270
- ❖ Yano, H., Ninan, I., Zhang, H., Milner, T. A., Arancio, O., and Chao, M. V., 2006. BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nature Neuroscience*, 9, 1009-1018.
- ❖ Zuluaga MJ, Agrati D, Pereira M, Uriarte N, Fernandez-Guasti A, Ferreira A (2005) Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. *Physiol Behav* 84:279-286.