

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA DI PROCREAZIONE E DELL'ETA' EVOLUTIVA
DIVISIONE DI GINECOLOGIA ED OSTETRICIA "P. FIORETTI"
DIRETTORE PROF A.R. GENAZZANI



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
IN FISIOPATOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE E SESSUOLOGIA

VARIAZIONI GIORNALIERE DEI LIVELLI PLASMATICI DEL BDNF E DEL
CORTISOLO IN DONNE FERTILI NORMOMESTRUATE, IN DONNE IN TERAPIA
CONTRACCETTIVA ORALE ED IN POSTMENOPAUSA

RELATORE

Chiar.mo Prof A.R. Genazzani

CANDIDATA

Dott.ssa Barbara Quirici

INDICE

SOMMARIO	4
INTRODUZIONE	7
Le neurotrofine	7
Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	8
Struttura, meccanismo d'azione e regolazione neurotrasmettitoriale	8
Localizzazione e ruolo nel sistema nervoso centrale	11
• Depressione	14
• Disturbi della condotta alimentare	16
• Malattie neurodegenerative	19
Altre localizzazioni	22
• Circolo periferico	22
• Liquido follicolare	24
BDNF ed estrogeni	26
SCOPO DELLO STUDIO	31
MATERIALI E METODI	32
• Soggetti	32
• Protocollo	33
• Dosaggio del BDNF	34
• Dosaggio di estradiolo, progesterone e cortisolo	36
• Parametri utilizzati ed analisi statistica	36
RISULTATI	37
• Livelli basali di BDNF ed Estradiolo	37
• Variazioni circadiane in fase follicolare	38
• Variazioni circadiane in fase luteale	38
• Variazioni circadiane in donne in terapia estroprogestinica	39
• Variazioni circadiane in donne in postmenopausa	39
DISCUSSIONE	40

CONCLUSIONI	45
BIBLIOGRAFIA	46
FIGURE	70
• Legenda	70
• Figure	71

SOMMARIO

Il brain derived neurotrophic factor (BDNF) fa parte della famiglia delle neurotrofine a cui appartengono anche il fattore di crescita neuronale (GNF), la neurotrofina-3 (NT-3) e la neurotrofina-4/5 (NT 4-5). E' una proteina omodimerica di 25 KDa abbondantemente presente nel sistema nervoso centrale e periferico, soprattutto al livello dell'ipotalamo, dell'ippocampo, della corteccia cerebrale (in particolare nel lobo temporale e occipitale, nell'insula e nella corteccia sensitiva e motoria) e dell'amigdala. Agisce mediante l'attivazione dei recettori $p75^{NGFR}$ e TrkB, e svolge una vasta gamma di funzioni. Durante lo sviluppo gioca un ruolo fondamentale nella sopravvivenza, migrazione, differenziazione fenotipica neuronale nonché nella crescita degli assoni e dei dendriti e nella formazione delle sinapsi. Nella vita adulta la sua funzione principale è quella di regolare la plasticità sinaptica ed è implicato nei processi di apprendimento, nella memoria e nel comportamento. Diversi studi hanno dimostrato un'alterata produzione e secrezione di questa neurotrofina in patologie correlate allo stress e nelle malattie neurodegenerative. Infatti nella sindrome di Alzheimer e in quella di Parkinson sono stati riscontrati ridotti livelli di BDNF; lo stesso dicasi per patologie psichiatriche quali la depressione maggiore, la schizofrenia e i disturbi dell'alimentazione.

Sebbene il BDNF sia presente prevalentemente nel sistema nervoso centrale e periferico, è stato riscontrato anche nel siero con

concentrazioni dieci volte più alte di quelle plasmatiche, nelle cellule endoteliali e muscolari lisce e nel liquido follicolare.

Recentemente si è visto che esiste una stretta correlazione tra livelli di estrogeni e di BDNF: infatti i livelli di neurotrofina seguono l'andamento estrogenico nelle varie fasi del ciclo ovarico e si riducono in menopausa. Anche i glucocorticoidi sembrano coinvolti nella regolazione del BDNF. Inoltre diversi studi hanno indicato variazioni cicliche nell'espressione del rec trkB e nel BDNF durante le 24 h. Recentemente è stato ipotizzato che il BDNF possa essere coinvolto nella regolazione dell'attività del nucleo soprachiasmatico. Il NSC rappresenta l'oscillatore endogeno e il primordiale orologio biologico nei mammiferi. Più specificatamente il NSC è il pacemaker centrale che genera e controlla le oscillazioni circadiane endogene di ormoni come il cortisolo e le gonadotropine. In un precedente studio è stata evidenziata una correlazione tra il BDNF e le variazioni circadiane del cortisolo negli uomini avendo dimostrato un profilo di secrezione del BDNF simile a quello del cortisolo.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare:

- se il BDNF nelle donne possiede oppure no un ritmo circadiano
- se questo sia correlato con quello del cortisolo.
- se lo stato ormonale influenzi le variazioni diurne del BDNF

Hanno partecipato allo studio 30 donne afferite all' ambulatorio ginecologico della nostra clinica che sono state suddivise in 3 gruppi: 1° gruppo (N°10 donne fertili) , 2° gruppo (N°10 donne in terapia con EP) e 3° gruppo (N°10 donne in postmenopausa). Abbiamo valutato i livelli basali di BDNF e cortisolo dopo digiuno notturno in tutti i

soggetti ad intervalli regolari di 4 ore (8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00). BDNF e estradiolo sono stati campionati durante la fase follicolare e luteale nelle donne fertili ed una volta al mese nelle donne in terapia con EP ed in postmenopausa. I valori plasmatici di BDNF sono stati valutati con metodo ELISA mentre quelli di E2 e di cortisolo, sono stati valutati con metodo RIA.

Per quello che riguarda i risultati i livelli di BDNF in fase luteale sono risultati significativamente più elevati rispetto a quelli in fase follicolare nelle donne fertili ($p < 0.001$). Nelle donne in terapia con EP, i livelli basali di BDNF erano simili ai livelli di BDNF in fase follicolare, mentre nelle donne in postmenopausa, erano significativamente più bassi ($p < 0.001$).

Il BDNF ha mostrato un ritmo diurno nelle donne fertili in fase follicolare e nelle donne in terapia con EP, così come in postmenopausa mentre tale ritmo non è presente in fase luteale. L'andamento dei livelli giornalieri del BDNF ricalca il ritmo circadiano del cortisolo con valori significativamente più alti alle 8 del mattino che decrescono in maniera significativa durante il giorno.

In conclusione il BDNF subisce delle variazioni diurne nelle donne in modo analogo a quanto osservato per il cortisolo. L'ampiezza della variazione dei livelli plasmatici di BDNF sembra essere influenzata dalla funzione ovarica. Interazioni tra il BDNF, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e gli steroidi sessuali sembrano giocare un ruolo critico nella biologia dell'omeostasi e dell'adattamento nell'uomo.

INTRODUZIONE

LE NEUROTROFINE

Le neurotrofine sono un gruppo di piccole proteine implicate nello sviluppo e nel mantenimento del sistema nervoso centrale. Di esse fanno parte: il fattore di crescita neuronale (NGF), il brain-derived neurotrophic factor (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) e la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (1).

Queste sostanze sono sintetizzate nel sistema nervoso centrale e periferico come pro-neurotrofine del peso di 30-35 kDa e poi convertite ad opera della pro-convertasi intracellulare in proteine di circa 28 kDa (2).

Le quattro neurotrofine oltre allo stesso peso molecolare hanno lo stesso numero di amminoacidi (118-120), simile punto isoelettrico (9-10) e uguale struttura primaria (per il 50%): sono dimeri stabili e non covalenti con sei residui di cisteina e tre legami solfuro intracatena conservati nella stessa posizione (3,4). I domini amminoacidici che le differenziano invece determinano il loro legame e la loro specifica affinità per un recettore piuttosto che per un altro condizionandone di conseguenza la loro attività biologica (5).

Sono due le classi recettoriali a cui le neurotrofine si legano:

- I Trks: recettori transmembrana con attività tirosin chinasi. Ogni neurotrofina ha affinità verso uno specifico recettore di questa famiglia; in particolare il fattore di crescita neuronale (NGF) si lega al recettore TrkA, il BDNF e la neurotrofina-4 (NT-4) si legano al recettore TrkB e la neurotrofina-3 ha bassa affinità per il recettore

TrkB e alta affinità per il TrkC (6). L'attività biologica che questi recettori esplicano è legata alla modulazione della crescita e della sopravvivenza neuronale.

- Il p75^{NGFR}: è un membro della superfamiglia del tumor necrosis factor (TNF) e ogni neurotrofina ha la stessa affinità per questo recettore; non ha attività catalitica intrinseca per cui il segnale apoptotico viene trasmesso da interazioni proteina-proteina (7,8), però quando si ha coespressione con recettori Trk aumenta l'affinità delle neurotrofine per questi ultimi e ciò contribuisce a modulare la sopravvivenza e la crescita neuronale, la trasmissione sinaptica, la plasticità corticale e la migrazione cellulare (9).

BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR

Struttura, meccanismo d'azione e regolazione neurotrasmettitoriale

Il gene del BDNF è localizzato sul cromosoma 11 ed è formato da 5 esoni ma la proteina matura è codificata dall'esone 5 (1). La struttura della proteina finale è tridimensionale allungata come quella di altri fattori di crescita (VEGF, TG- β 2, PDGF-BB) e ciò avvalorava l'ipotesi di un'evoluzione comune (10).

Il BDNF è sintetizzato come propeptide ad alta affinità per il recettore p75^{NGFR}, e poi trasformato in proteina matura di 25 KDa ad opera delle pro-convertasi (PCs). Le pro-convertasi appartengono alla famiglia delle endoproteasi di cui fanno parte la furina, la PC1/3, la PC2, la PACE4 ed altre ancora. Mentre la furina ed altre PCs

elaborano le pro-proteine all'interno dell'apparato del Golgi, la PC1 e 2 sembrano clivare le forme non ancora mature dopo che queste sono state "processate" dal Golgi, determinando così un rilascio stimolo-indotto della proteina matura. Una volta sintetizzato, il BDNF viene immagazzinato in due diversi tipi di vescicole: un tipo è secreto continuamente mentre l'altro tipo si accumula in prossimità della membrana plasmatica e la liberazione avviene per esocitosi generalmente in seguito a uno stimolo (10).

Come già detto, questa neurotrofina ha affinità per due tipi di recettori: il TrkB e il p75^{NGFR}.

Il legame con il TrkB induce dimerizzazione e fosforilazione del recettore con attivazione del dominio tirosin kinasico intracellulare che interagisce con diversi target intracellulari come le MAP kinasi, il fosfatidil inositolo 3 kinasi e a secondo della via attivata avremo una differente attività biologica (6).

Lee et al. (6) hanno dimostrato che il propeptide ha bassa affinità per il recettore TrkB e alta affinità per il recettore p75^{NGFR} e il legame con quest'ultimo induce apoptosi dei neuroni in coltura. In seguito a questi studi pare che la sopravvivenza o la morte cellulare sia regolata da un equilibrio tra la forma matura e immatura del BDNF e dall'espressione dei due tipi di recettori.

L'attività biologica del BDNF si esplica tramite un segnale di trasporto retrogrado. Il recettore TrkB attivato, insieme al suo ligando, è trasportato dal terminale assonico al corpo cellulare all'interno di vescicole (endosomi) che si spostano grazie ad un meccanismo attivo microtubulare che sembra essere mediato dalla dineina; una volta

giunto al corpo si possono attivare determinati segnali (11,12). Tale meccanismo retrogrado è molto importante perchè in questo modo la cellula neuronale riceve informazioni dall'esterno e può adeguatamente rispondere ai numerosi stimoli extracellulari (6).

Recentemente è stato riportato anche un meccanismo di trasporto anterogrado; infatti grazie a studi morfologici è stato evidenziato che il BDNF è presente nelle aree dello striato del ratto adulto che ricevono afferenze dalla corteccia; inoltre nell'ippocampo la neurotrofina è localizzata nel corpo di neuroni granulari e trasportata anterogradamente alle cellule piramidali della corteccia CA3 (13). Questo tipo di trasporto può essere un importante meccanismo di supporto neurotrofico e una rapida risposta agli stimoli confermando il ruolo simil-neurotrasmettitoriale del BDNF che implica:

- sintesi nel terminale presinaptico;
- endocitosi in vescicole;
- rilascio dopo depolarizzazione di membrana;
- legame al suo recettore sul terminale postsinaptico;
- trasduzione del segnale;
- inattivazione e re-uptake della neurotrofina (14).

Studi in vitro e in vivo su ippocampo, ipotalamo e corteccia cerebrale di ratto hanno dimostrato che i neurotrasmettitori giocano un ruolo indispensabile nella regolazione del BDNF.

In particolare vi è una down-regulation del BDNF mRNA da parte del GABA ed un up-regulation da parte del glutammato, dell'acetilcolina e della serotonina (6).

Localizzazione e ruolo nel Sistema Nervoso Centrale

Nel sistema nervoso centrale le aree con più alti livelli di BDNF sono l'ipotalamo, l'ippocampo, la corteccia cerebrale (soprattutto il lobo frontale e occipitale, l'insula, la corteccia motoria e sensitiva) e l'amigdala (15,16,17); proprio queste aree sono ad elevata plasticità e sono elementi chiave nella risposta neuroendocrina. In particolare nell'ipotalamo un' alta concentrazione del BDNF si ritrova nei neuroni dei nuclei supraottico e paraventricolare mentre una più bassa concentrazione nei nuclei dorsomediale, ventromediale e arcuato (18). Inoltre come dimostrano studi su tessuto cerebrale di ratto e umano (post-mortem) anche le cellule gliali contengono BDNF ma non è chiaro se si tratta di sintesi o di internalizzazione (19,20).

Ricerche immunocitochimiche hanno dimostrato che i recettori TrkB sono localizzati sia sui corpi cellulari, sia sugli assoni, sia sui dendriti delle cellule della corteccia cerebrale, del bulbo olfattorio, dell'ippocampo, del talamo, dell'ipotalamo, del giro dentato, dello striato, del setto, dei nuclei della base della sostanza nigra, del cervelletto, dei motoneuroni spinali e dei neuroni sensoriali (21-22). Per cui la coespressione del BDNF e dei suoi recettori nelle stesse aree ha fatto ipotizzare anche un meccanismo secretorio paracrino o autocrino di questa neurotrofina (6).

Inizialmente si pensava che le neurotrofine avessero un ruolo di crescita, mantenimento, e differenziazione del tessuto nervoso solo nella fase dello sviluppo ma si è evidenziato che anche nei ratti adulti sono presenti elevati livelli di queste proteine in diverse aree cerebrali, per cui si è ipotizzato che svolgano una funzione fisiologica anche

negli adulti. Tale ipotesi è avvalorata ancor più dalla presenza di recettori nelle stesse aree (6).

Infatti durante la vita adulta tutte le neurotrofine e in particolar modo il BDNF hanno un ruolo attivo nella modulazione della plasticità sinaptica.

Sono stati studiati due modelli di plasticità neuronale: il potenziamento a lungo termine (LTP) e la depressione a lungo termine (DTP). Bliss e Lomo (23) in seguito a studi sull'ippocampo di ratto hanno notato che scariche di stimoli ad alta frequenza potenziano la trasmissione sinaptica mentre stimoli a bassa frequenza la deprimono (23). I livelli di BDNF mRNA aumentano nell'ippocampo dopo induzione della LTP, mentre la LTP è ridotta dalla mancanza del gene del BDNF (24,25).

Trattando con BDNF tessuto ippocampale di un topo knock-out per il gene del BDNF, si è subito avuto un potenziamento della LTP e un miglioramento della trasmissione sinaptica (26).

Ancora, i meccanismi di apprendimento e la formazione della memoria a lungo e a breve termine aumentano i livelli di BDNF mRNA nell'ippocampo mentre la deprivazione di BDNF endogeno ostacola queste funzioni nel ratto adulto (27).

Inoltre nel ratto l'interruzione della trasmissione degli stimoli visivi alla corteccia visiva determina una riduzione dei livelli di BDNF mRNA; di contro l'esposizione di ratti alla luce dopo un periodo in oscurità inverte questo fenomeno (28) Al contrario l'induzione dell'LTD nella corteccia visiva dei ratti è prevenuta dalla somministrazione di BDNF (29).

Esperimenti sono stati condotti anche sulle scimmie e hanno dimostrato che vi è un up-regulation del BDNF mRNA durante la formazione della memoria nella corteccia temporale (30).

Tutti questi dati indicano che il BDNF e i suoi recettori giocano un ruolo importante nell'apprendimento e nella plasticità neuronale della corteccia visiva e temporale negli adulti.

Contrariamente a quanto si è ritenuto fin ora è stata dimostrata la presenza di cellule staminali anche nel SNC di mammiferi adulti. Queste possono andare incontro a differenziazione sostituendo cellule mature in particolar modo nel giro dentato e nella zona subventricolare; in questo processo pare che sia implicato anche il BDNF (31,32,33).

Vari studi condotti su ratti adulti hanno dimostrato che condizioni ambientali favorevoli e corretti stili di vita come l'esercizio fisico favoriscono la replicazione di cellule nervose nell'ippocampo insieme ad un'aumentata espressione di BDNF mRNA (34,35).

Lo stress induce una diminuzione del numero di neuroni nel giro dentato come anche del BDNF mRNA in questa regione (36,37,38,39). L'apprendimento negli adulti aumenta la neurogenesi consensualmente al BDNF mRNA nell'ippocampo (6). Anche l'esercizio fisico (la corsa) favorisce la proliferazione cellulare e l'aumento di BDNF mRNA nel giro dentato (6). Ancora, elevati livelli di BDNF si riscontrano nel giro dentato in seguito a restrizioni dietetiche (40,41).

Inoltre l'infusione di BDNF nei ventricoli laterali di ratti adulti favorisce la proliferazione cellulare nello striato, nel setto, nel talamo e

nell'ipotalamo (42). Questi elementi suggeriscono che la somministrazione di BDNF in alcune patologie degenerative potrebbe potenzialmente favorire la rigenerazione cellulare.

Inoltre, insulti cerebrali come i traumi, lo stress, il coma ipoglicemico, le convulsioni, l'ischemia stimolano l'espressione del BDNF nel SNC dei ratti mediante un aumento della trasmissione glutammatergica e un aumento del flusso di calcio nelle cellule dell'ippocampo, amigdala, corteccia cerebrale, corteccia piriforme e neocorteccia. Questo fa ipotizzare che il BDNF abbia un ruolo protettivo nei confronti degli insulti cerebrali stimolando la riorganizzazione sinaptica (43).

Di contro vi è un decremento del BDNF mRNA e della proteina in aree di atrofia o morte cellulare e in patologie quali l'Alzheimer e il Parkinson (44,45).

Implicazioni cliniche

Depressione

I disturbi dell'umore sono caratterizzati da un'alterazione della regolazione dell'umore, del comportamento e della affettività.

Numerosi studi suggeriscono che il BDNF esercita un ruolo chiave nella genesi dei disturbi dell'umore ed, in particolare, esso sembra essere implicato nella fisiopatologia della depressione. Studi pre-clinici e clinici hanno ampiamente dimostrato la presenza di livelli sierici di tale neurotrofina significativamente ridotti nei soggetti depressi (46).

Nonostante il BDNF sia stato studiato soprattutto a livello cerebrale, elevate concentrazioni di questa proteina sono state rilevate anche a livello periferico, in particolare nelle piastrine umane .

E' stato dimostrato che il BDNF di origine piastrinica è massivamente rilasciato nel siero in seguito all'attivazione cellulare e che esso ha la capacità di attraversare indenne la barriera emato-encefalica in entrambi i sensi grazie ad un sistema di trasporto saturabile (47). Da qui l'ipotesi che la riduzione dei livelli di BDNF piastrinico possa essere considerata come marker periferico della depressione al pari della serotonina (5HT)(46). Il riscontro di una correlazione positiva tra punteggi ottenuti nelle scale valutative della depressione e BDNF sierico effettivamente conferma l'ipotesi suddetta.

Una spiegazione a questi ridotti valori potrebbe essere la diminuita liberazione di BDNF dalle piastrine che riflette una potenziale anomalia nel sistema di rilascio neurotrasmettitoriale.

La riduzione dei livelli di BDNF potrebbe anche riflettere, in soggetti depressi, una vulnerabilità genetica la cui espressione sarebbe accentuata da eventi stressogeni. Gli stessi causano infatti a livello cerebrale, in particolare nell'ippocampo, atrofia e morte neuronale e la collocazione del BDNF e del suo recettore TrkB nell'ippocampo suggerisce che la neurotrofina possa esercitare a questo livello un effetto trofico protettivo tramite un meccanismo autocrino (46,47). A supporto di questa teoria vi è il fatto che un trattamento cronico con antidepressivi incrementa non solo l'espressione del BDNF ma anche la neurogenesi nell'ippocampo di

ratto adulto (48). Un'ulteriore conferma del ruolo di tale molecola nella patogenesi della depressione deriva da studi animali che hanno dimostrato un effetto antidepressivo del BDNF somministrato per via cerebrale, probabilmente correlato ad un'azione sulla via serotoninergica (49).

Infine, studi effettuati sui livelli sierici di BDNF in pazienti depressi in seguito al trattamento con farmaci antidepressivi hanno dimostrato che la concentrazione della neurotrofina in soggetti trattati con placebo è significativamente più bassa rispetto a quelli trattati con farmaci antidepressivi e che, in quest'ultimo gruppo di pazienti, i livelli di BDNF non si discostano molto da quelli del gruppo di controllo (46)

Da tutti questi dati emerge che, la presenza di bassi livelli sierici di BDNF giochi un ruolo fondamentale nella fisiopatologia della depressione.

Disturbi della condotta alimentare

I disturbi della condotta alimentare sono un insieme di patologie caratterizzate da un rapporto problematico con il cibo e dall'eccessivo condizionamento che il peso e la forma del corpo esercitano sul comportamento. Insorgono prevalentemente nell'età adolescenziale o nella prima età adulta e sono più frequenti nel sesso femminile. Il Manuale Diagnostico e Statistico dei Disordini Mentali (DSM IV) include in questa categoria l'anoressia nervosa, la bulimia nervosa e i disturbi alimentari non altrimenti specificati.

Le aree cerebrali implicate nel controllo del comportamento alimentare sono localizzate soprattutto a livello ipotalamico ed

includono i nuclei paraventricolare, arcuato, dorsomediale, e ventromediale.

Molte evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che il BDNF svolga un ruolo critico nella regolazione del comportamento alimentare degli animali. Infatti topi knockout eterozigoti per il gene del BDNF mostrano un atteggiamento aggressivo ed una notevole iperfagia accompagnati da un significativo incremento di peso nella vita adulta; queste alterazioni sono state correlate con una disfunzione del sistema serotoninergico nel cervello poiché la somministrazione cronica di inibitori selettivi del reuptake della serotonina come la fluoxetina erano in grado di indurre un miglioramento delle suddette alterazioni (50). Anche l'infusione di BDNF nel terzo ventricolo di questi animali comporta una riduzione del peso, determinando uno specifico incremento dose-dipendente della 5-HT, indicando così un effetto diretto del BDNF (50,51).

Studi di ibridazione in situ mostrano che questi animali hanno una diminuzione del segnale di BDNF nei nuclei ipotalamici implicati nel comportamento alimentare, senza alcuna modifica del segnale per il TrkB. Questo studio ha anche dimostrato che l'espressione del BDNF è regolata dallo stato nutrizionale e dal recettore della melanocortina, proteina coinvolta nella regolazione del bilancio energetico la cui mutazione induce obesità (52).

Oltre a questi studi su modelli animali sono state condotte ricerche anche in donne affette da disturbi della condotta alimentare, in particolare anoressia e bulimia nervosa per valutare i livelli sierici di BDNF. In queste pazienti i livelli della neurotrofina sono

significativamente ridotti rispetto a quelli di soggetti di pari età appartenenti a gruppi controllo. Inoltre le concentrazioni sieriche di BDNF sono notevolmente più basse nelle donne affette da anoressia nervosa rispetto alle donne bulimiche (53).

Anche studi genetici hanno confermato un ruolo del BDNF nella patogenesi dei disturbi alimentari (54-56). Il gene del BDNF è localizzato nel cromosoma 11 ed è costituito da 5 esoni. Il polimorfismo genico 196 G/A, consistente nella conversione di una valina in metionina nel codone 66, è fortemente associato all'anoressia suggerendo che il met-allele può essere un fattore di predisposizione per i disturbi alimentari. Questa alterazione non cambia la funzione del BDNF ma compromette il trasporto intracellulare del pro-BDNF e di conseguenza la secrezione della proteina matura (57).

Tuttavia, dati contrastanti sono riportati riguardo il coinvolgimento del polimorfismo 196G/A nella genesi dei disturbi alimentari nei diversi continenti, suggerendo anche una probabile differenza etnica di tale alterazione (46).

Malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una perdita neuronale della sostanza grigia associata in un secondo tempo a modificazioni secondarie di tratti di sostanza bianca. Tra queste, alcune presentano un preminente interessamento della corticale encefalica come la malattia di Alzheimer, altre invece sono maggiormente circoscritte ad aree subcorticali come la malattia di Parkinson (58). La funzione svolta dal BDNF nel promuovere la

sopravvivenza e la crescita di neuroni ippocampali, neocorticali, colinergici settali e dopaminergici del corpo nigro, pone le basi per un suo possibile ruolo nella patogenesi delle suddette patologie

Malattia di Alzheimer

Nel 1991 Philips e colleghi riportavano una selettiva riduzione nell'espressione di mRNA BDNF nell'ippocampo di individui affetti da malattia di Alzheimer. Tramite la tecnica dell'ibridazione in situ questi autori studiarono il segnale del BDNF, NGF, NT-3 mRNA nelle sezioni di tessuto ippocampale di 9 pazienti con M.A e di 6 individui di controllo e rilevarono importanti riduzioni del mRNA BDNF nello strato piramidale dell'ippocampo e nelle cellule granulari del giro dentato mentre non riportarono alterazioni nei livelli di mRNA NGF e NT-3 (59).

Successivamente grazie all'uso di anticorpi diretti contro peptidi di BDNF è stato effettuato uno studio su campioni di tessuto cerebrale di soggetti colpiti da questa malattia. Narisawa e Saito nel 1996 osservarono che il contenuto di BDNF non era significativamente ridotto nel giro dentato e neppure nella corteccia motoria sebbene una riduzione significativa fosse presente nella corteccia entorinale(60).

Un altro studio effettuato con l'uso di anticorpi anti BDNF rilevava una diminuzione del segnale "western-blot" nella corteccia frontale dei pazienti (61).

Studi più recenti hanno dimostrato inoltre una correlazione tra il BDNF e la presenilina-1 la cui mutazione causa una forma precoce di Alzheimer a trasmissione autosomica dominante. La presinilina-1 influenza la sintesi intracellulare del precursore della proteina β -

amiloide determinando un'aumentata produzione di peptidi A β . Colture corticali di neuroni di topi privi del gene della presenilina-1 caratterizzate da un accumulo di precursori β amiloidei, mostrano un alterata maturazione di TrkB e un severo deficit nell'autofosforilazione del recettore in risposta al BDNF (62). La probabile risorsa endogena del BDNF nei neuroni ippocampali include il rilascio di BDNF dai propri dendriti (loops autocrini/paracrini), dai terminali assonici di neuroni ippocampali e extra ippocampali afferenti (trasporto anterogrado) e in maniera retrograda dai terminali assonici al corpo cellulare di neuroni piramidali corticali (63).

La perdita di contatti sinaptici nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale è uno dei piu' importanti meccanismi neuropatologici implicati nella malattia di Alzheimer. Di conseguenza sembra possibile che un'alterata plasticita' sinaptica derivante da un ridotto contenuto endogeno di BDNF contribuisca al danneggiamento cognitivo tipico della patologia(64).

E' stato proposto che il danno primario della malattia di Alzheimer sia una perturbazione della plasticita' neuronale che conduce in ultima analisi alle manifestazioni cliniche di deterioramento cognitivo e ai reperti anatomopatologici di morte neuronale (65).

Morbo di Parkinson

Un grande numero di neuroni dopaminergici mesencefalici esprimono sia BDNF che TrkB suggerendo l'esistenza di loops trofici autocrini e paracrini che supportano la sopravvivenza e la funzione del sistema mesotelencefalico (63). Nel 1999 Parain e collaboratori

hanno dimostrato una ridotta espressione del BDNF nella sostanza nera di individui con malattia di Parkinson riportando che nei soggetti di controllo circa il 65% dei neuroni pigmentati erano immunoreattivi per il BDNF mentre nei pazienti solo il 10% dei neuroni erano positivi al BDNF. Tra le strutture studiate la riduzione dell'espressione del BDNF riguardava specificatamente la pars compacta della sostanza nigra mentre i neuroni pigmentati della regione A8 non mostravano alterazioni (66). Studi più recenti effettuati con metodiche immunoenzimatiche volte a misurare la concentrazione di BDNF in diverse regioni cerebrali hanno rilevato un'importante riduzione di livelli di BDNF nel nucleo caudato (24% rispetto al controllo), nel putamen (18% del controllo) e nella sostanza nigra (55% del controllo) e una diminuzione non significativa in altre due aree, la corteccia centrale e il cervelletto (67). Per quanto riguarda l'espressione del recettore TrkB nel cervello di persone con malattie di Parkinson, Benisty e collaboratori non hanno rilevato sostanziali differenze nell'espressione del mRNA nei neuroni della sostanza nigra e nell'area ventrale tegmentale tra malati di Parkinson e soggetti sani di controllo (68).

Numerosi meccanismi possono essere chiamati in causa per spiegare come l'alterata espressione di BDNF possa essere coinvolta nella patogenesi della malattia di Parkinson.

La degenerazione dei neuroni del locus coeruleus caratteristico della malattia può privare i neuroni dopaminergici mesencefalici del trasporto anterogrado del BDNF e incrementare così la morte cellulare (69). Questa possibilità è suggerita dallo studio che

dimostra un' aumentata vulnerabilità' al danno tossico indotto dopo lesione del locus coeruleus (70,71).

Inoltre anche cambiamenti post sinaptici osservati a livello dello striato possono essere ricondotti alla mancanza del trasporto anterogrado del BDNF (63).

Il fatto che l'espressione di TrkB mRNA nei neuroni mesencefalici di pazienti Parkinsoniani sia normale mentre l'espressione di BDNF sia ridotta suggerisce che in futuro questi pazienti potranno trarre beneficio dalla somministrazione di BDNF (63).

Altre localizzazioni

Risale a circa dieci anni fa l'identificazione del BDNF nel plasma e nel siero (72), con valori sierici dieci volte più alti di quelli plasmatici (73). Questa differenza è dovuta al meccanismo di degranulazione piastrinica che si ha durante la coagulazione. Infatti le piastrine contengono quantità elevate di BDNF (74-76); sembra che quest'ultimo non derivi dai precursori megacariocitici ma che sia acquisito dal plasma o da altri compartimenti mediante internalizzazione anche se non si conosce il sito di legame che permette questo processo (74). Quindi le piastrine avrebbero un ruolo di riserva del BDNF.

Nakahashi et al. (77) hanno condotto studi su colture di cellule endoteliali di vena ombelicale umana e hanno dimostrato non solo un

aumento del rilascio nel mezzo di coltura di BDNF ma anche una sintesi ex novo della neurotrofina. Inoltre è stato dimostrato che stimolando l'incremento di cAMP intracellulare si ottiene un aumentato rilascio della proteina probabilmente perché, come già dimostrato nei neuroni della corteccia frontale e dell'ippocampo dei ratti (78), nel DNA c'è una sequenza responsiva al cAMP; al contrario un aumento dello ione calcio intracellulare e un aumento dello shear stress riducono la produzione di BDNF in queste cellule (77). Infatti per quanto riguarda lo shear stress è stata identificata nel DNA della cellula endoteliale una sequenza responsiva sul promotore e sul primo introne del gene del BDNF. Comunque il significato fisiologico di questa down-regulation non è stato ancora del tutto chiarito ma sembra correlare probabilmente con l'aterosclerosi. Infatti recettori TrkB sono espressi in colture di tessuto muscolare liscio vascolare umano e murino, e sono state identificate in coronarie aterosclerotiche nel ratto (79,80). Comunque il BDNF sintetizzato o rilasciato dall'endotelio può legarsi ai suoi recettori sulle cellule muscolari lisce e sulle cellule endoteliali stesse ma la sua funzione biologica deve ancora essere chiarita.

Recentemente è stato documentato che anche i macrofagi attivati e i linfociti T e B rilasciano in vitro BDNF (81).

Tra l'altro il BDNF riesce ad attraversare la membrana emato-encefalica in entrambe le direzioni per cui parte della neurotrofina circolante potrebbe derivare dai neuroni e dalle cellule gliali del sistema nervoso centrale (82).

Lommatzsch et al. (82) hanno invece studiato come i livelli sierici di BDNF variano in base all'età, al peso e al sesso. I risultati di questo studio dimostrano che i livelli sierici di BDNF, ma non la concentrazione piastrinica, si riducono significativamente con l'aumentare dell'età e del peso corporeo e che i livelli della neurotrofina sono più bassi nella donna rispetto all'uomo con variazioni nell'ambito delle diverse fasi del ciclo mestruale.

Studi su ovociti di ratto hanno dimostrato la presenza in essi di TrkB (recettore del BDNF); tale assunto ha portato ad intraprendere studi atti a valutare la presenza del BDNF nel liquido follicolare.

Precedenti dati immunoistochimici avevano già messo in evidenza la presenza di recettori tirosin kinasi A e C sulle cellule della granulosa, nel 2002 fu dimostrata la presenza del BDNF nel liquido follicolare di follicoli preovulatori ottenuti con tecniche di fecondazione in vitro. La produzione della neurotrofina è a carico delle cellule della granulosa come dimostra l'aumento della proteina dopo 48h di incubazione (83).

Diverse sembrano essere le funzioni del BDNF e delle neurotrofine in generale nel liquido follicolare:

- controllano l'ovulazione;
- favoriscono la sopravvivenza delle cellule germinali;
- regolano la steroidogenesi;
- controllano la formazione del corpo polare; (83-86).

Infatti studi condotti in vitro hanno dimostrato che dopo trattamento di ovociti bovini con BDNF si ha un aumento di cellule fecondate rispetto ai controlli (87) e studi su ovociti di ratti invece

hanno evidenziato un ruolo favorente la maturazione sia del nucleo sia del citoplasma cellulare (88). Queste osservazioni portano a ipotizzare un ruolo di rilievo del BDNF mRNA e della proteina nella follicologenesi e nello sviluppo del citoplasma degli ovociti.

Seifer et al. (89) hanno comparato i livelli di BDNF nel liquido follicolare in fase preovulatoria di donne con cicli ovulatori regolari e di donne sottoposte a stimolazione ovarica per eseguire una fecondazione medicalmente assistita. I livelli di BDNF dosati in donne sottoposte a stimolazione si sono mostrati 27 volte superiori ai valori delle donne del gruppo con cicli ovulatori regolari, questo dimostra un reale ruolo regolatorio fisiologico del BDNF sulla maturazione follicolare e un'importante influenza delle gonadotropine esogene nello stimolare le cellule della granulosa a produrre BDNF (89).

A dimostrazione di ciò Buyuk et al. (90) hanno condotto uno studio in donne sottoposte a fecondazione medicalmente assistita e hanno riscontrato dei livelli molto bassi di BDNF nel liquido follicolare in donne affette da endometriosi rispetto alle donne con altre cause di infertilità. Questo perché il BDNF ha effetto positivo sull'espressione della superossido dismutasi, della glutazione riduttasi e della glutazione perossidasi tutti enzimi che si riducono in caso di endometriosi a favore dell'aumento di NO e radicali liberi, i quali creano un ambiente peritoneale ed endometriale ostile all'ovulazione, alla fertilizzazione, all'impianto dell'embrione e al suo sviluppo (91,92). L'opposto succede invece per il NGF la cui concentrazione nel liquido follicolare aumenta in caso di endometriosi per cui si è ipotizzato un suo contributo alla patogenesi di questa malattia (90).

BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR ED ESTROGENI

Diversi studi sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di una certa analogia di azioni tra BDNF e estrogeni nonché la funzione regolatoria di questi ultimi nei confronti della neurotrofina.

Intanto è stato dimostrato che sia il BDNF che gli estrogeni attivano nelle cellule gli stessi meccanismi di trasduzione del segnale e cioè la cascata delle MAP-kinasi (MAP-K), la via del fosfatidilinositolo-3-fosfato (PI3-K), e quella della proteina kinasi calcio-calmodulina-dipendente (CaCKII). Ciò determinerebbe l'attivazione degli stessi effettori (93).

Nell'ippocampo le due sostanze mediano gli stessi effetti ossia l'incremento del numero di sinapsi, l'aumento del numero di spine dendritiche, il potenziamento della trasmissione glutammatergica nell'area CA1, tramite l'azione sui recettori NMDA (94), e gli effetti positivi sulla memoria (95,96).

Inoltre sia l'estradiolo che il BDNF riducono i meccanismi citotossici di cellule ippocampali confermando pertanto la loro funzione neuroprotettiva (93).

Quantunque gli effetti degli estrogeni sull'ippocampo siano rilevanti è difficile definire l'esatta localizzazione dei loro recettori perciò si è giunti alla conclusione che la localizzazione cambia in base allo stato ormonale; infatti nei ratti in proestro la distribuzione dei recettori ER α è apparsa differente rispetto alle altre fasi del ciclo (97,98).

Alcuni studi affermano che nell'ippocampo il recettore ER α è espresso in cellule principali e in neuroni che usano come mediatore il GABA ; la localizzazione intracellulare inoltre è sia a livello citoplasmatico che nucleare (97). Il recettore Er β è espresso nello stesso tipo di cellule (99,100). Altri studi hanno evidenziato che i recettori ER α sono espressi sulle cellule che coesprimono il GABA e il neuropeptide Y (101) mentre altri ancora sospettano la loro localizzazione su interneuroni immunoreattivi alla parvalbumina (proteina legante il calcio) (102).

Nel giro dentato i neuroni reattivi alla parvalbumina sono proprio i neuroni gabaergici disposti intorno alle cellule granulari e alcuni di questi esprimono anche il neuropeptide Y (93).

Comunque, in definitiva, la distribuzione recettoriale è condizionata dallo stress, dall'attività neuronale, da patologie, dall'età e dallo stato ormonale ed inoltre non è da scartare l'ipotesi dell'esistenza di varianti dei due tipi recettoriali già noti (93).

Per quanto riguarda gli effetti del BDNF e dell'estradiolo sull'ippocampo sono stati condotti numerosi studi: in maschi knock-out per il gene dell'aromatasi (enzima che converte gli androgeni in estrogeni) i ridotti livelli di estradiolo dimostravano una bassa capacità di apprendimento che regrediva dopo somministrazione di estradiolo esogeno (103).

Nei ratti femmina la capacità di apprendimento è maggiore durante la mattina del proestro rispetto alle altre fasi del ciclo e rispetto ai ratti ovariectomizzati (104). Questi effetti sono simili a quelli che media il BDNF. Invece ad alte dosi sia di BDNF che di estradiolo

si ha l'effetto opposto sulla capacità di apprendimento e ciò è dovuto ad una down-regulation dell'estradiolo sull'ER α , e del BDNF sul TrkB (105-107).

Studi recenti hanno dimostrato che come il BDNF anche l'estradiolo esogeno potenzia l'LTP nell'area CA1 dell'ippocampo in ratti adulti (108). Per cui si può concludere che il meccanismo d'azione delle due "sostanze" è simile.

In realtà sul gene del BDNF è stata identificata una sequenza responsiva agli estrogeni l'ERE che induce la sintesi di BDNF mRNA e della proteina (109); a dimostrazione di ciò la somministrazione di estradiolo in ratti ovariectomizzati ha determinato un aumento del BDNF mRNA (109). Lo stesso accade anche in ratti maschi sottoposti a gonadectomia (110). Questo perché la gonadectomia riduce i livelli circolanti di testosterone che viene convertito grazie all'aromatasi in estrogeni (111,112). Comunque questa correlazione è stata accertata sicuramente nel giro dentato, e nelle aree CA1 e CA3 dell'ippocampo di ratti adulti (110,113,114,115). Non si ha però la stessa risposta sull'ippocampo embrionale perché mentre l'aumento dell'estradiolo promuove la proliferazione dendritica i livelli di BDNF sono ridotti (116). Per cui nei giovani ratti il rapporto tra BDNF ed estradiolo è in pratica diverso.

Questo concetto è stato ulteriormente approfondito dagli studi di Solum e Handa (110): la gonadectomia di giovani ratti maschi porta ad una riduzione dei livelli di BDNF mRNA ma non ad una diminuzione dei livelli di proteina (110). Ne consegue da ciò che la regolazione estrogenica del BDNF è età dipendente.

Inoltre i livelli di BDNF mRNA non sempre correlano con i livelli di proteina; infatti durante il proestro si evidenziano bassi livelli di BDNF mRNA e alti livelli di proteina, al contrario della fase estrale dove si hanno alti livelli di BDNF mRNA e bassi livelli di BDNF proteina (114).

Il fatto che le cellule “granulari” in grado di esprimere alti livelli di BDNF durante il ciclo estrale non possiedano recettori ER porta a formulare l'ipotesi di un altro tipo di modulazione estrogenica sul BDNF. In realtà gli interneuroni gabaergici che circondano le cellule granulari esprimono recettori ER per cui una regolazione del BDNF può avvenire anche tramite queste cellule (102). Ovvero gli estrogeni iperpolarizzando le cellule gabaergiche ne inibiscono il rilascio di GABA così i neuroni granulari non sono a loro volta inibiti e sono liberi di produrre BDNF (93) suggerendo in questo modo un meccanismo di regolazione indiretta.

Recenti ricerche hanno dimostrato una stretta correlazione tra assetto ormonale e livelli plasmatici di BDNF.

Gli ormoni steroidei influenzano l'espressione del BDNF. I livelli circolanti delle neurotropine sono influenzati dalle varie fasi del ciclo mestruale, dalla menopausa e dalla somministrazione esogena di steroidi sessuali. Lo studio ha preso in esame donne fertili con cicli regolari, donne in amenorrea e donne in menopausa (117). I risultati ottenuti hanno dimostrato un più marcato aumento dei livelli plasmatici di BDNF in fase luteale rispetto alla fase follicolare (in donne con cicli mestruali regolari). In particolare il BDNF segue lo stesso andamento dell'estradiolo con bassi livelli nei primi giorni del

ciclo e con picco massimo preovulatorio di poco precedente al picco dell'LH (in fase follicolare). Al sedicesimo/diciassettesimo giorno invece entrambi subiscono un decremento per poi riaumentare in fase luteale al ventesimo/ventiquattresimo giorno. Anche se la precisa origine dell'incremento in fase luteale non è del tutto chiarita si può supporre una produzione locale da parte del corpo luteo (118,119) o dell'endometrio come già riportato nei ratti (120). Vi sono inoltre studi che riportano variazioni dei livelli di BDNF mRNA nell'ippocampo di ratto durante il ciclo estrale (121).

Invece in donne in amenorrea i livelli di BDNF sono risultati più bassi dei livelli sia delle donne in fase follicolare che delle donne in postmenopausa. Infine nel gruppo delle donne in postmenopausa i livelli della neurotrofina sono notevolmente ridotti ma subiscono un significativo aumento dopo sei mesi di assunzione di terapia ormonale sostitutiva; questo può spiegare la maggiore incidenza di patologie psichiatriche (depressione) e neurodegenerative (Alzheimer e Parkinson) in postmenopausa (122-124).

Anche i glucocorticoidi sono coinvolti nella regolazione del BDNF(125,126). Un recente studio ha mostrato che il cortisolo esercita funzioni regolatorie specifiche e differenti sull'ippocampo di ratto a seconda dei recettore sul quale agisce (127). Stimoli esogeni come l'esercizio fisico (128) e l'esposizione alla luce (129) possono influenzare la espressione del BDNF in particolare a livello della corteccia e dell'ippocampo nel ratto (130); inoltre diversi studi hanno indicato variazioni cicliche nell'espressione del rec trkB e nel BDNF durante le 24 h (130-132). Recentemente è stato ipotizzato che il

BDNF possa essere coinvolto nella regolazione dell'attività del nucleo soprachiasmatico. Il NSC rappresenta l'oscillatore endogeno e il primordiale orologio biologico nei mammiferi (133). Più specificatamente il NSC è il pacemaker centrale che genera e controlla le oscillazioni circadiane endogene di ormoni come il cortisolo e le gonadotropine (134) In un precedente studio è stata evidenziata una correlazione tra il BDNF e le variazioni circadiane del cortisolo negli uomini avendo dimostrato un profilo di secrezione del BDNF simile a quello del cortisolo (135)

SCOPO DELLO STUDIO

In conseguenza dell'importante ruolo che sembra esercitare il BDNF nei processi adattativi lo scopo dello studio è stato quello di verificare

- se il BDNF nelle donne presenti un ritmo circadiano simile a quello riscontrato nei maschi
- se esso eventualmente correli con quello del cortisolo e
- se lo stato ormonale influenzi le variazioni diurne del BDNF e del cortisolo.

A tale proposito sono state valutate le concentrazioni plasmatiche del cortisolo e del BDNF in differenti condizioni ormonali come nella fase follicolare e luteale del ciclo mestruale in donne normo mestruale, nella condizione di inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio come in donne in terapia contraccettiva orale ed in una condizione di ipoestrogenismo come la postmenopausa.

MATERIALI E METODI

Soggetti

Sono state arruolate nello studio 30 donne di età compresa tra 20 e 68 anni, normopeso (BMI compreso tra 20.2 e 24.8 Kg/mq) che afferivano all'ambulatorio della divisione di Ginecologia ed Ostetricia del nostro ospedale. Lo studio è stato disegnato in maniera tale che si creassero tre gruppi:

- gruppo 1: 10 donne in età fertile di età compresa tra i 20 ed i 33 anni (media \pm SD=25.6 \pm 3.2 anni) con indice di massa corporea (BMI) compreso tra 20.5 e 23.6 Kg/mq con cicli mestruali regolari e che non stavano eseguendo nessuna terapia ormonale;
- gruppo 2: 10 donne in età fertile di età compresa tra i 20 ed i 32 anni (media \pm SD=25.7 \pm 3.8 anni) con indice di massa corporea (BMI) compreso tra 20.2 e 24.1 Kg/mq che stavano eseguendo terapia ormonale combinata continua a base di 20 μ g di etinil estradiolo e 3 mg di Drospirenone
- gruppo 3: 10 donne in postmenopausa di età compresa 50 ed i 68 anni (media \pm SD=56.8 \pm 4.6 anni) con indice di massa corporea (BMI) compreso tra 21.3 e 24.8 Kg/mq che non stavano eseguendo nessuna terapia ormonale;

Tutte le pazienti hanno aderito spontaneamente al protocollo di studio dando il loro consenso informato, dopo che lo stesso era stato loro dettagliatamente spiegato. La ricerca è stata approvata dal Comitato Etico della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Pisa. Ogni donna, prima dell'arruolamento, è stata sottoposta ad accurata anamnesi (età, peso, altezza, assunzione regolare di farmaci), esame obiettivo ed esami ematochimici di routine. Criteri di esclusione dallo studio sono stati: malattie acute in atto, patologie croniche (diabete, BPCO, ipertensione arteriosa), allergie, assunzione abituale di farmaci (compresi farmaci attivi sul sistema nervoso centrale e antiinfiammatori), storia personale e/o familiare di endocrinopatie, così come di disturbi psichiatrici o neurologici.

Tutte le donne in età fertile incluse nello studio presentavano cicli mestruali di durata regolare (28 ± 2 giorni), e tutte avevano cicli ovulatori. Per accertare l'avvenuta ovulazione ci siamo avvalsi della misurazione dei livelli circolanti di progesterone in ventunesima giornata del ciclo, considerando come cut-off una concentrazione plasmatica ≥ 10.0 ng/ml.

Protocollo

Nel primo gruppo di pazienti (fertili normomestruate senza nessuna terapia) sono stati eseguiti due prelievi, uno in fase follicolare (6-8° giornata del ciclo) ed uno in fase luteale (20-24° giornata del ciclo) del ciclo mestruale; nel secondo (donne fertili in terapia EP) e nel terzo (donne in postmenopausa) gruppo le pazienti sono state studiate solo una volta in tutto il periodo di studio; in particolare nel

secondo gruppo (donne fertili sotto terapia EP) le pazienti sono state studiate tra il 6 e l'8 giorno di pillola.

Ogni donna è stata sottoposta a prelievo di sangue venoso dalla vena antecubitale, al mattino a digiuno. Il prelievo è stato effettuato sempre allo stesso orario (approssimativamente 8 del mattino) per la valutazione dei livelli di BDNF, estradiolo, progesterone e cortisolo. Inoltre tutte le pazienti arruolate nello studio sono state sottoposte a prelievi seriati ogni 4 ore per 24 ore per un totale di 5 prelievi (ore 8, 12, 16, 20, 24) per la determinazione dei livelli circolanti di BDNF e cortisolo.

I campioni sono stati raccolti in ghiaccio, utilizzando provette da 3 ml contenenti EDTA (Vacutest Kima s.r.l., Arzergrande, Italy). Immediatamente dopo il prelievo, si è proceduto alla centrifugazione dei campioni in centrifuga refrigerata (4°C), a 2500 giri per quindici minuti. Il plasma così ottenuto è stato suddiviso in aliquote di 1 ml e conservato in congelatore a -80°C fino al momento del dosaggio.

Dosaggio del BDNF

La determinazione dei livelli plasmatici di BDNF è stata effettuata tramite metodica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), avvalendoci di un kit disponibile in commercio (BDNF Emax Immunoassay System, Promega, USA). Il dosaggio è stato eseguito previa diluizione 1:4 dei campioni di plasma con tampone Block & Sample, così come prevede la metodica.

In breve, la metodica di dosaggio si articola nei seguenti passaggi:

1. Incubazione overnight a 4°C dell'anticorpo monoclonale (mAb) anti-BDNF, su apposita piastra per dosaggi immunologici a 96 pozzetti (Iwaki).
2. Bloccaggio aspecifico della piastra suddetta con tampone Block & Sample.
3. Aggiunta del BDNF standard e dei campioni ed incubazione in agitatore per due ore a temperatura ambiente.
4. Aggiunta dell'anticorpo policlonale (pAb) anti-BDNF umano, incubazione, in agitatore, per un'ora a temperatura ambiente.
5. Aggiunta dell' anti-IgY derivata da cavallo coniugata a perossidasi. Incubazione per un'ora a temperatura ambiente e successiva aggiunta di TMB One Solution (incubazione per 10 minuti) per consentire lo sviluppo del colore.
6. Aggiunta di HCl 1 N (stop solution).
7. Lettura dell'assorbanza a 450 nm. La concentrazione di BDNF dei campioni viene determinata automaticamente, tramite confronto dei suddetti con la curva standard (valori di BDNF compresi nel range 7.8-500 pg/ml).

Tra i passaggi 1-2, 2-3, 3-4, 4-5 sono stati effettuati lavaggi ripetuti della piastra con tampone di lavaggio TBST.

L'intera procedura è stata effettuata grazie ad uno strumento semi-automatico (Basic Radim Immunoassay Operator, "BRIO", Radim, Italia) collegato ad un lettore di densità ottica. I risultati sono stati infine analizzati tramite sistema computerizzato collegato al BRIO.

Dosaggio di estradiolo, progesterone, cortisolo

Le concentrazioni plasmatiche di E2, P e cortisolo sono state determinate con metodica radioimmunologica (RIA) utilizzando kits disponibili in commercio (Radim, Pomezia, Italia).

La sensibilità dei dosaggi era rispettivamente di 10 pg/ml per l'E2, 0.12 ng/ml per il P, 0.90 µg/L per il cortisolo.

I coefficienti di variazione intra- ed inter-assay erano, rispettivamente, 2.1% e 4.2% per l'E2, 4.2% e 7.8% per il progesterone, 2.6 % e 8% per il cortisolo.

Parametri utilizzati ed analisi statistica

Le concentrazioni plasmatiche di BDNF ed estradiolo sono state espresse in pg/ml, mentre del cortisolo sono state espresse in µg/L.. Tutti i dati, riportati come media \pm deviazione standard (SD), sono stati analizzati con analisi della varianza (one-way ANOVA), come appropriato. I confronti tra gruppi sono stati effettuati tramite il test di Bonferroni. Infine è stato calcolato un indice di correlazione (indice di Pearson) tra i livelli plasmatici di BDNF e quelli degli steroidi sessuali (E2, P) nelle varie fasi del ciclo mestruale.

RISULTATI

Livelli basali di BDNF ed estradiolo

Nelle donne con cicli mestruali regolari (1° gruppo) i livelli circolanti di BDNF ed estradiolo risultano essere significativamente più elevati in fase luteale rispetto alla fase follicolare ($p < 0.001$). Le donne in terapia estroprogestinica (2° gruppo) mostrano livelli plasmatici di estradiolo significativamente inferiori rispetto alle donne fertili durante la fase follicolare del ciclo mestruale ($p < 0.01$), mentre nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per quello che riguarda i livelli plasmatici di BDNF tra le donne in terapia EP e le fertili in fase follicolare. Nelle donne in postmenopausa (3° gruppo) i livelli plasmatici di BDNF ed estradiolo sono risultati statisticamente inferiori rispetto ai livelli della fase follicolare nelle donne fertili ($p < 0.001$) (fig.1).

Nelle donne fertili (1° gruppo) è stata riscontrata una correlazione positiva tra i livelli di BDNF ed estradiolo ($r = 0.883$, $p < 0.0001$) (fig.6) mentre questa correlazione non risulta statisticamente significativa se consideriamo le donne in terapia EP (2° gruppo) ed in postmenopausa (3° gruppo) ($r = 0.3092$ e $r = -0.4778$, rispettivamente fig 7-8).

Variazioni circadiane in fase follicolare

I livelli plasmatici di BDNF così come quelli di cortisolo decrescono durante la giornata, con i valori più alti osservati alle 8:00 (438.6 ± 21.45 per il BDNF e 177.7 ± 13.21 per il cortisolo) mentre valori più bassi osservati a mezzanotte (292.6 ± 12.73 per il BDNF e 108.2 ± 3.58 per il cortisolo)

In particolare, i livelli di BDNF misurati alle 20.00 erano significativamente più bassi rispetto a quelli misurati al mattino ($p < 0.001$ versus 8:00). La tendenza del decremento dei valori di cortisolo, acquista valore statistico, se comparati con i livelli alle 8.00, a partire dalle ore 16.0 ($p < 0.01$ VERSUS 8:00) (FIG 2A e 2B).

Variazioni circadiane durante la fase luteale

Non si sono osservate variazioni significative dei livelli di BDNF durante la fase luteale di donne regolarmente mestruale (fig. 3A). Al contrario, i livelli di cortisolo hanno mostrato una tendenza a diminuire in fase luteale così come in fase follicolare, mantenendo lo stesso trend che raggiunge una significatività statistica a partire dalle 16.00 ($p < 0.001$ versus 8:00) (Fig. 3B).

Variazioni circadiane in donne in terapia con estroprogestinici

Nelle donne in terapia con estroprogestinici, i valori di BDNF hanno dimostrato una lieve tendenza a diminuire durante il giorno, raggiungendo un significato statistico alle 16.00 ($p < 0.01$), similmente alla fase follicolare di donne non in terapia.

I livelli di cortisolo hanno dimostrato una tendenza a diminuire, raggiungendo un significato statistico alle 24.00 rispetto ai valori misurati al mattino ($p < 0.01$ alle 24.00 versus 8.00) (Fig. 4A e 4B).

Variazioni circadiane in donne in epoca postmenopausale.

Durante la menopausa, sia i livelli di BDNF che quelli di cortisolo, hanno dimostrato livelli statisticamente significativi più bassi durante il giorno.

In particolare, questa tendenza, raggiunge la massima significatività alle 20.00 ($p < 0.01$ versus 8.00., quando anche i livelli di cortisolo erano notevolmente ridotti rispetto a quelli del mattino ($p < 0.01$ alle 12.00, $p < 0.001$ alle 16.00 alle 20.00, alle 24.00 versus 8.00 (Fig. 5A e 5B).

DISCUSSIONE

Per quello che concerne la valutazione dei livelli basali di BDNF il presente studio conferma i nostri precedenti risultati che indicavano che i valori plasmatici di BDNF variano durante il ciclo mestruale nelle donne fertili raggiungendo valori significativamente ($p < 0.001$) più alti in fase luteale rispetto alla fase follicolare e decrescono in postmenopausa ($p < 0.001$), con un significativo indice di correlazione con i livelli circolanti di estradiolo e progesterone (117).

Le donne in terapia EP mostrano livelli di BDNF nel solito range delle donne fertili in fase follicolare nonostante la terapia EP riduca significativamente ($p < 0.01$) i livelli di estradiolo rispetto a quelli riscontrati in fase follicolare delle donne fertili.

Questi risultati sono in linea con dati di precedenti lavori dove avevamo riscontrato che

- a) nelle pazienti con amenorrea ipotalamica i livelli plasmatici di BDNF ed estradiolo risultano significativamente ($p < 0.001$) inferiori rispetto alle donne fertili in fase follicolare
- b) nelle donne in terapia EP (20microgrammi di EE2 e 3 mg di drospirenone) l'etinilestradiolo era in grado di mantenere livelli plasmatici di BDNF nel range delle donne fertili e
- c) la terapia EP era capace perfino di ripristinare i valori plasmatici di BDNF intorno a valori fisiologici nelle donne affette da ipoestrogenismo.

Il presente studio dimostra che i livelli plasmatici di BDNF presentano variazioni circadiane nelle donne, con un'ampiezza che varia a seconda dello stato ormonale, con pattern analogo al ritmo circadiano del cortisolo così come già dimostrato per gli uomini (135). In particolare durante la fase follicolare ed in postmenopausa le donne mostrano livelli plasmatici di BDNF maggiori alle 8 della mattina, a cui fa seguito un sostanziale decremento durante il giorno con valori significativamente più bassi ($p < 0.001$ e $p < 0.01$ rispettivamente) a partire dalle ore 20:00 e minimi riscontrati a mezzanotte .

Le donne in trattamento EP mostrano anch'esse variazioni diurne dei livelli di BDNF simili a quelle osservate negli altri gruppi con un picco alle ore 8:00 ed una progressiva riduzione dei livelli di BDNF che risulta statisticamente significativa ($p < 0.01$) a partire dalle 16:00 in avanti.

Questi risultati ci fanno concludere che esistono fisiologiche variazioni diurne di questa neurotropina che possono essere ricondotte ad un modello di secrezione circadiana della stessa. E' stato infatti dimostrato che il BDNF ha una corta emivita plasmatica ($t_{1/2} = 0.92$ min) (145) per cui sarebbe ipotizzabile che venga secreto con un ritmo pulsatorio che è caratterizzato da una progressiva diminuzione dell'ampiezza dei pulses durante il giorno.

Benché i livelli plasmatici assoluti di BDNF varino nei 3 gruppi di studio il ritmo circadiano rimane conservato indipendente dalla quota estrogenica endogena e dal trattamento estroprogestinico esogeno.

Questi risultati suggeriscono perciò che il processo d'invecchiamento ed il milieu ormonale estrogenico possano influenzare la produzione e la secrezione del BDNF, determinando la differenza tra le quote assolute riscontrate, senza modificare però il meccanismo responsabile della generazione del ritmo circadiano.

Le donne fertili valutate in fase luteale non mostrano alcuna variazione diurna nella secrezione di BDNF come indicato dagli alti valori riscontrati durante tutto il giorno. Come da noi precedentemente dimostrato infatti, nella media fase luteale si assiste ad un significativo ($p < 0.001$) aumento dei livelli di BDNF con una correlazione positiva con i valori di progesterone (117). Benché il meccanismo preciso con cui accada ciò non sia completamente chiarito, si può suggerire che gli alti valori di BDNF riscontrati in fase luteale possano essere dovuti ad una specifica produzione locale da parte del corpo luteo e dell'endometrio secretivo (136). Questa addizionale quota di derivazione periferica, correlata alla produzione del progesterone, sarebbe responsabile del raddoppiamento dei livelli di BDNF rispetto alla fase follicolare.

Potremmo supporre che i livelli basali di BDNF e le variazioni diurne dello stesso osservate durante la fase follicolare, riflettano il ritmo di produzione e secrezione della neurotropina da parte del SNC, mentre durante la fase luteale queste fluttuazioni potrebbero venire nascoste da una maggiore produzione periferica di BDNF, da parte del corpo luteo e dell'endometrio. A conferma di ciò, infatti, nelle donne in terapia estroprogestinica, dove chiaramente non si ha lo sviluppo di

corpo luteo e la conseguente trasformazione secretiva endometriale, sono conservate le variazioni circadiane di BDNF.

Recenti osservazioni sulla presenza di recettori per gli estrogeni ed il progesterone sul nucleo soprachiasmatico (NSC) associato alla capacità da parte degli steroidi sessuali di modulare l'espressione di uno dei Period geni (Per2) sul NSC suggeriscono però anche l'interessante possibilità che il progesterone di per sé possa influenzare direttamente le fluttuazioni circadiane del BDNF. Infatti funzioni come il sonno, la temperatura corporea e la risposta allo stress, che sono tutte sotto il controllo del NSC, mostrano un ritmo circadiano nella fase follicolare del ciclo mestruale che non è più presente in fase luteale (137). E' stata perciò ipotizzata un'influenza diretta del progesterone sul generatore centrale del ritmo circadiano del BDNF. E' stato inoltre dimostrato che l'allopregnanolone (metabolita neuroattivo del progesterone) aumenta il contenuto di BDNF nell'ipotalamo, nell'amigdala e nell'ippocampo, con concomitante rilascio di CRH e dell'elevazione della produzione di ACTH e corticosterone.

Questi dati indicano una correlazione diretta fra i livelli di BDNF e progesterone e l'attività del sistema ipotalamo ipofisi surrene (138).

E' stato chiaramente dimostrato il ruolo del BDNF nella risposta allo stress. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che intervengono variazioni dei livelli di BDNF durante il giorno, con valori più alti durante i periodi di attività e quando gli individui si trovano sotto stress e quando si ritrovano a riposo (130,139).

Il BDNF potrebbe avere un ruolo nel ripristinare il pool ormonale ipotalamico dopo che vari fattori ne hanno alterato l'omeostasi e potrebbe modulare il rilascio del CRH nel sistema portale (140).

Il presente studio indica una correlazione tra i livelli giornalieri di BDNF e cortisolo e corrobora l'ipotesi di una co-regolazione tra cortisolo, BDNF ed ormoni sessuali. Questa correlazione suggerisce l'affascinante possibilità che il tono glucocorticoide e neurotrofico possano giocare un ruolo sinergico nell'omeostasi delle funzioni cerebrali. Inoltre, la scomparsa delle fluttuazioni in fase luteale associata alla mancanza di correlazione con il cortisolo (il cui ritmo circadiano risulta conservato anche in fase luteale) potrebbe essere indicativa di un meccanismo che produrrebbe una disregolazione neuroendocrina nella seconda metà del ciclo in donne vulnerabili, così da predisporre alla sindrome premestruale.

Si sa, da precedenti lavori, che il premenstrual disforic disorder, è associato ad un'alterata regolazione dei ritmi circadiani del NSC ed all'attivazione del sistema ipotalamo ipofisi surrene (141). Si sa inoltre che l'uso dell'estroprogestinico ha dimostrato migliorare la sintomatologia in queste pazienti. (142,143). Nessun dato è al momento disponibile per ciò che riguarda le fluttuazioni dei livelli di BDNF nella sindrome premestruale, comunque le evidenze che la terapia EP possa modificare alcune funzioni del NSC come il BDNF, suggeriscono ipotesi interessanti che potrebbero essere analizzate in futuro (134). Il presente studio mostra qualche limitazione che ci suggerisce di interpretare cautamente tali dati. Ad esempio il campione studiato è esiguo e per la definizione della fase luteale

abbiamo fatto riferimento ad una stabilita giornata del ciclo (20-24^o) basandoci sulla regolarità della mestruazione (che comunque è stata in tutti i casi rispettata) e non ad un determinato giorno a partire dal picco dell'LH, come sarebbe stato più preciso e meglio confrontabile. Inoltre l'assenza di campioni di sangue prelevati durante la notte può aver impedito l'osservazione di importanti fluttuazioni del BDNF durante la notte; è comunque dimostrato che le fase di sleep-wake modificano il contenuto cerebrale di BDNF, come dimostrato dai suoi bassi livelli durante il sonno e massimi livelli durante la veglia (144).

CONCLUSIONI

In conclusione il presente studio indica che il BDNF mostra nelle donne un ritmo diurno che è in qualche modo analogo alle fluttuazioni del cortisolo e che l'ampiezza delle fluttuazioni è modulata dalla funzione ovarica. Informazioni sulle interazioni tra BDNF, asse ipotalamo-ipofisi-surrene e steroidi sessuali sono fondamentali per migliorare la nostra capacità di comprensione della biologia dell'omeostasi e dell'adattamento umano.

Ulteriori studi dovranno comunque essere approntati per chiarire se esiste una interrelazione tra questi due sistemi.

BIBLIOGRAFIA

1. Sohrabji F., Lewis D.K. (2006), Estrogen-BDNF interaction: implication for neurodegenerative diseases, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27, 404-414.
2. Mowla S.J., Farhadi H.F., Pareek S., Atwal J.K., Morris S.J., Seidah N.G. and Murphy R.A. (2001), Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor, *J. Biol. Chem.*, 276, 12660-12666.
3. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M. and Yancopoulos G.D., (1990), NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression, *Neuron*, 5, 501-509.
4. Maisonpierre P.C., Le Beau M.M., Espinosa R.d., Ip N.Y., Belluscio L., De Le Monte S.M., Squinto S., Furth M.E. and Yancopoulos G.D., (1991), Human and rat brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distribution, and chromosomal localization, *Genomics*, 10, 558-568.
5. Heumann R., (1994), Neurotrophin signalling, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 4, 668-679.
6. Tapia-Arancibia L., Rage F., Givalois L. and Arancibia S., (2004), Physiology of BDNF: focus on Hypothalamic function, *Frontiers in Neuroend.*, 25, 77-107.

7. Henderson C.E., (1996), Role of neurotrophic factors in neuronal development, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6, 64-70.
8. Lee J., Duan W.Z., Long J.M., Ingram D.K. and Mattson M.P., (2002), Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice, *J. Neurochem.*, 80, 539-547.
9. Dechant G. and Barde Y.A., (2002), The neurotrophins receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system, *Nat. Neurosci.*, 5, 1131-1136.
10. Reynolds A.J., Barlett S.E. and Hendry Ian, (2000), *Brain Research Reviews* 33, 169-178.
11. Bhattacharyya A., Wattson F.L., Bradlee T.A., Pomeroy S.L., Stiles C.D. and Segal R.A., (1997), Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system, *J. Neurosci.*, 17, 7007-2335.
12. Hersseen H.M. and Segal R.A., (2002), location: a spatial view of neurotrophin signal transduction, *Trends Neurosci.*, 25, 160-165.
13. Smith M.A., Zhang L.X., Lyons W.E., and Mamounas L.A. (1997), anterograde transport of endogenous brain-derived neurotrophic factor in hippocampal mossy fibers, *Neuro Report*, 8, 1829-1834.

- 14.** Altar C.A. and Di Stefano P.S. (1998), Neurotrophin trafficking by anterograde transport, *Trends Neurosci.*, 21, 433-437.
- 15.** Kato-Semba R., Takeuchi I.K. , Semba R. and Kato K., (1997), Distribution of brain-neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain, *J.Neurochem.*, 69, 34-42.
- 16.** Nawa H., Carnahan J. and Gall C., (1995), BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain after seizure: partial disagreement with mRNA levels, *Eur.J. Neurosci.* 7, 1527-1535.
- 17.** Yan Q., Rosenfeld R.D., Matheson C.R., Hawkins N., Lopez O.T., Bennett L. and Welcher A.A., (1997), Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system, *Neurosci.* 78, 431-448
- 18.** Kernie S.G., Liebl D.J. and Parada L.F., (2000), BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice, *EMBO J.*, 19, 1290-1300.
- 19.** Mallat M., Houlgatte R., Brachet R and Prochiantz A., (1989) Lipopolisaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro, *Dev. Biol.*, 133, 309-902
- 20.** Lu B, Yoko M., Drayfus C.F.,Black I.B., (1991), NGF expression in actively growing brain glia, *J. Neurosci.* 11, 318-326.

- 21.** Fryer R.H., Kaplan D.R., Feinstein S.C., Radeke M.J., Grayson D.R. and Kromer L.F., (1996), Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain, *J. Comp. Neurol.*, 374, 21-40.
- 22.** Yan Q., Radeke M.J., Matheson C.R., Talvenheimo J., Welcher A.A. and Feinstein S.C., (1997), Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat, *J. Comp. Neurol.*, 378, 135-157.
- 23.** Bliss T.V. and Lomo, (1973), Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path, *J. Physiol.*, 232, 331-356.
- 24.** Korte M., Carroll P., Wolf E., Brem G., Thoenen H. and Bonhoeffer T., (1995), Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8856-8860.
- 25.** Korte M., Staiger V., Griesbeck O., Thoenen H. and Bonhoeffer T., (1996), The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments, *J. Physiol. (London)*, 90, 157-164.
- 26.** Patterson S.L., Abel T., Deuel T.A.S., Martin K.C., Rose J.C. and Kandel E.R., (1996), Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice, *Neuron*, 16, 1137-1145.

- 27.** Mu J.S., Li W.P., Yao Z.B. and Zhou X.F., (1999), Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats, *Brain Res.*, 835, 259-265.
- 28.** Castren E., Zafra F., Thoenen H. and Lindholm D., (1992), Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9444-9448.
- 29.** Akaneya Y., Tsumoto T. and Hatanaka H., (1996), Brain-derived neurotrophic factor blocks long-term depression in rat visual cortex, *J. Neurophysiol.* 76, 4198-4201.
- 30.** Tokuyama W., Okuno H., Hashimoto T., Li Y.X. and Miyashita, (2000), BDNF up regulation during declarative memory formation in monkey inferior temporal cortex, *Nat. Neurosci.*, 3, 1134-1142.
- 31.** Altman J. and Das G.D., (1965), Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats, *J. Comp. Neurol.*, 124, 319-335.
- 32.** Fuchs E. and Gould E., (2000), In vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications, *Eur. J. Neurosci.*, 12, 2211-2214.
- 33.** Gage F.H., (2002), Neurogenesis in the adult brain, *J. Neurosci.*, 22, 612-613.

34. Brown J., Cooper-Kuhn C.M., and Kempermann G., Van Praag H., Winkler J., Gage F.H. and Kuhn H.G., (2003), Enriched environment and physical activity simulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis, *Eur. J. Neurosci.*, 17, 2042-2046.

35. Nilsson M., Perfilieva E., Johansson U., Orwar O. and Eriksson P.S., (1999), Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory, *J. Neurobiol.*, 39, 569-578.

36. Gould E., McEwen B.S., and Tanapat P., (1997), Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation, *J. Neurosci.*, 17, 2492-2498.

37. Gould E., Tanapat P., McEwen B.S., Flugge G. and Fuchs E., (1998), Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3168-3171.

38. Marmigere F., Rage F., Givalois L., Arancibia S. and Tapi-Arancibia L., (2003), Rapid induction of BDNF expression in hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats, *Hippocampus*, 13, 646-655.

39. Smith M.A., Makino S., Kvetnansky R. and Post R.M., (1995), Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus, *J. Neurosci.*, 15, 1768-1777.

40. Lee J., Duan W.Z., Long J.M., Ingram D.K. and Mattson M.P., (2000), Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats, *J. Mol. Neurosci.*, 15, 99-108.

41. Lee J., Seroogy K.B. and Mattson M.P., (2002), Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice, *J. Neurochem.*, 80, 539-547.

42. Pencea V., Bingaman K.D., Wiegand S.J. and Luskin M.B., (2001), Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus, *J. Neurosci.*, 21, 6706-6717.

43. Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J., Elmér E. and Mokaia M., (1994), Neurotrophins and brain insults, *Trends Neurosci.*, 17, 490-496.

44. Murer M.G., Yan Q. and Raisman-Vozari R, (2001), Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *Prog. Neurobiol.*, 63, 71-124.

45. Connor B. and Dragunow, (1998), The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain, *Brain Res. Rev.*, 27, 1-39.

46. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M, (2003) Alterations of serum levels of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants, *Society of Biological Psychiatry* 54, 70-75

47. Pan W, Banks W, Fasold M, Bluth J, Kastin A, (1998) Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier, *Neuropharmacology* 37, 1553-1561

48. McEwen BS, (2000) Allostasis and allostatic load: Implications for neuropsychopharmacology, *Neuropsychopharmacology* 22, 108-124

49. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS, (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus, *J Neurosci* 20, 9104-9110

50. Lyons W.E, Mamounas L.A, Ricaurte G.A, Coppola V, Reid S.V, Bora S.H, Wler C, Tessarollo L, (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities, *Proc. Natl. Acad. Sci* 96, 15239-15244

51. Kernie S.G, Liebl D.J, Parada L.F, (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice, *EMBO J* 19, 1290-1300

- 52.** Xu B.J, Goulding E.H, Zang K.L, Cepoi D, Kone R.D, Jones K.R, Tecott L.H, Reichardt L.F, (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor, *Nat.Neurosci* 6,736-742
- 53.** Nakazato M, Hashimoto K, Shimizu E, Kumakiri C, Koizumi H, Okamura N, Mitzsumori M, Komatsu N, Iyo M, (2002) Decreased levels of serum Brain-derived neurotrophic factor in female patients with eating disorders, *Society of Biological Psychiatry*,54,485-490
- 54.** Becker E.A, Grinspon S.K, Klibanski A, Herzog D.B, (1999) Eating disorders, *New Engl. J. Med* 340, 1092-1098
- 55.** Hinney A, Remshmidt H, Hebebrand J, (2000) Candidate gene polymorphisms in eating disorders, *Eur. J. Pharmacol* 410,147-159
- 56.** Kaye W.H, Klump K.L, Frank G.H, Strober M, (2000) Anorexia and bulimia nervosa, *Annu. Rev. Med* 51,299-313
- 57.** Egan M.F, Kojima M, Kallikot J.H, Goldberg T.E, Kolachana B.S, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger D.R, (2003) The BDNF val 66 met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function, *Cell* 112,257-269
- 58.** Robbins e Cotran, *Le basi patologiche delle malattie* (2006) *Malattie degenerative*, 1385

- 59.** Philips H.S, Hains J.M, Larami G.R, Rosenthal A, Winslow J.W, (1990) Widespread expression of BDNF but not NT-3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons, *Science* 250,290-294
- 60.** Narisawa-Saito M, Nawa H, (1996) Differential regulation of hippocampal neurotrophins during aging in rats, *J. Neurosci* 16,1124-1131
- 61.** Ferrer I, Marin C, Rey M.J, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, Tolosa E, Mart E, (1999) BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer's disease. Implications in therapeutic strategies, *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 58,729-739
- 62.** Hardy J, (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease, *Trends Neurosci* 20,154-159
- 63.** Murer M.G, Yan Q, Raisman-Vozari R, (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *Progress in Neurobiology* 63,71-124
- 64.** Terry R.D, Masliah E, Salmon D.P, Batters N, De Teresa R, Hill R, Hansen L.A, Katzman R, (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment, *Annu. Neurol* 30,572-580
- 65.** Mesulam M.-M, (1999) Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles, *Neuron* 24,521-529

- 66.** Parain K, Murer M.G, Yan Q, Fauscheux B, Agid Y, Hirsch E, Reisman-Vozari R (1999) Reduced expression of BDNF protein in Parkinson's disease substantia nigra, *NeuroReport* 10,557-561
- 67.** Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ikinose H, Nagatsu T, (1999) Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease, *Neurosci Lett* 270,45-48
- 68.** Benisty S, Boisiere F, faucheux B, Agid Y, Hirsch E.C, (1998) TrkB mRNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of Parkinsonian patients: an in situ hybridation study, *Neuroscience* 86,813-826
- 69.** Fearnley J, Lees A.J, (1997) Parkinson's disease: neuropathology. In: Watts R.L, Koller V.C (Eds), *movement disorders:neurological principles and practice*.Mc-Graw-Hill,New york
- 70.** Mavridis M, Degryse A.D, Lategan A.J, Marien M.R, Colpaert F.C, (1991) Effects of locus coeruleus lesion on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after MPTP in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson disease, *Neuroscience* 41,507-523
- 71.** Fornai F, Torracca M.T, Bassi L, D'Errigo D.A, Scolori V, Corsini (1996). Norepinephrine loss selectively enhances chronic nigrostriatal dopamine depletion in mice and rats, *Brain Res* 735,349-353

72. Rosenfeld R. D., Zeni L., Hanium M., Talvenheimo J., Radka S.F. and Bennett L., (1995), Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum, *Protein Expr. Purif.*, 6 (4), 465-471.

73. Radka S.F., Holst P.A., Fritsche M. and Altar C.A., (1996), Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay, *Brain Res*, 709 (1), 122-301.

74. Fujimura H., Altar C.A., Chen R., Nakamura T., Nakahashi T. and Kambayashi G., (2002), Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation, *Thromb Haemost*, 87 (4), 728-734.

75. Pliego-Rivero F.B., Bayatti N., Giannakoulopoulos X., Glover V., Bradford H.F. and Stern G., (1997), Brain-derived neurotrophic factor in human platelets, *Biochem Pharmacol*, 54 (1), 207-209.

76. Yamamoto H. and Gurney M.E.,(1990), Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor, *J. Neurosci.*, 10 (11), 3469-3478.

77. Nakahashi T., Fujimura H., Altar C.A., Li J., Kambayashi J., Tandon N.N. and Sun B., (2000), Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor, *FEBS Letters*, 470, 113-117.

78. Finkbeiner S., Tavazoie S.F., Maloratsky A., Jacobs K.M., Harris K.M. and Greenberg M.E., (1997), CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses, *Neuron*, 19, 1031-1047.

79. Donovan M.J., Miranda R.C., Kraemer R., McCaffrey T.A., Tessarollo L., Mahadeo D., Sharif S., Kaplan D.R., Tsoulfas P., Parada L., Toran-Allerand C.D., Hajjar D.P. and Hempstead B.L., (1995), Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury, *Am. J. Pathol.*, 147, 309-324.

80. Nemoto K., Fukamachi K., Nemoto F., Miyata S., Hamada M., Nakamura Y., Senba E. and Ueyama T., (1998), Gene expression of neurotrophin and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 284-288.

81. Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., Leal V.V., Misgeld T., Klinkert W.E., Kolbeck R., Hoppe E., Oropeza-Wekerle R.L., Bartke I., Stadelmann C. and Lassmann H, (1999), Activated human T cells, B cells and monocytes produce BDNF in vitro and inflammatory brain lesion: a neuroprotective role of inflammation?, *J. Exp. Med.*, 189, 865-870.

82. Lommatzsch M., Zingler D., Schuhbaeck K., Schloetcke K., Zingler C., Shuff-Werner P. and Virchow, (2005), The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma, *Neurobiology of aging*, 26, 115-123.

83. Seifer D.B., Feng B., Shelden R.M., Chen S. and Dreyfus C.F., (2002), Brain-derived neurotrophic factor: A novel human ovarian follicular protein, *J. of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87, 655-659.

84. Seifer D.B., Feng B., Shelden R.M., Chen S. and Dreyfus C.F., (2002), Neurotrophin-4/5 and neurotrophin-3 are present within the human ovarian follicle but appear to have different paracrine/autocrine function, *J. of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87, 4569-4571.

85. Seifer D.B., Feng B. and Shelden R.M., (2006), Immunocytochemical evidence for the presence and location of the neurotrophin-trk receptor family in adult preovulatory ovarian follicles, *Am J. Ob. Gyn.*, 194, 1129-1136.

86. Jensen T. and Johnson A.L., (2001), Expression and function of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in ovarian follicles from the domestic hen, *J. Exp. Biol.*, 204, 2087-2095.

87. Da Silva S.J.M., Gardner J.O., Taylor J.E., Springbett A., De Sousa P.A. and Anderson R.A., (2005), Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development., *Reproduction*, 129, 423-434.

88. Kamamura K., Kamamura N., Mulders S.M., Sollewijn Gelpe M.D. and Hsueh A.J., (2005), Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 9206-9211.

89. Seifer D.B., Lambert-Messerlian G. and Schneyer A.L., (2003), Ovarian brain-derived neurotrophic factor is present in follicular fluid from normally cycling women, *Fert. and Ster.*, 79.

90. Buyuk E., Seifer D.B., (2008) Follicular-fluid neurotrophin levels in women undergoing assisted reproductive technology for different etiologies of infertility, *Fertil. Steril.*

91. Grant M.M., Barber V.S. and Griffiths H.R., (2005), The presence of ascorbate induces expression of brain derived neurotrophic factor in SH-SY5Y neuroblastoma cells after peroxide insult, which associated with increased survival, *Proteomics*, 5, 534-540.

92. Jian Z., Nonaka I., Hattori S. and Nakamura S., (1996), Activation of Ras and protection from apoptotic cell death by BDNF in PC 12 cells expressing TrkB, *Cell Signal*, 8, 365-370.

93. Scharfman H.E. and MacLusky, (2006), Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: Complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS, *Front. Neuroendocr.*, 27, 415-435.

- 94.** Smith C.C. and McMahon L.L., (2005), Estrogen-induced increase in the magnitude of long term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission increased, *J. Neurosci.*, 25, 7780-7791.
- 95.** Luine V., (1997), Steroid hormone modulation of hippocampal dependent spatial memory, *Stress*, 2 (1), 21-36.
- 96.** Tyler W.J., Alonso M., Bramhan C.R. and Pozzo-Miller L.D., (2002), From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal dependent learning., *Learn Mem.*, 9, 224-237.
- 97.** Milner T.A., McEwen B.S., Hayashi S., Li c.J., Reagan L.P. and Alves S.E., (2001), Ultrastructural evidence that hippocampal α estrogen receptors are located at extranuclear sites, *J. Comp. Neurol.*, 429, 355-371.
- 98.** Romeo R.D., McCarthy J.B., Wang A., Milner T.A. and McEwen B.S., (2005), Sex differences in hippocampal estradiol-induced N-methyl-D-aspartic acid binding and ultrastructural localization of estrogen receptor- α , *Neuroendo.*, 81, 391-399.
- 99.** Milner T.A., Ayoola K., Drake C.T., Heric S.P., Tabori N.E., McEwen B.S., Warriar S. and Alves S., (2005), Ultrastructural localization of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat hippocampal formation, *J. Comp. Neurol.*, 491, 81-95.

100. Azcoitia I., Sierra A. and Garcia-Segura L.M., (1999), Localization of estrogen receptor β -immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain, *Glia*, 26, 260-267.

101. Nakamura N.H. and McEwen B.S., (2005), Changes in interneuronal phenotypes regulated by estradiol in the adult rat hippocampus: a potential role for neuropeptide Y, *Neurosci.*, 136, 357-369.

102. Blurton-Jones M., Kuan P.N. and Tuszynski M.H., (2004), Anatomical evidence for transsynaptic influences of estrogen on brain-derived neurotrophic factor expression. *J. Comp. Neurol.*, 468, 347-360.

103. Martin S., Jones M., Simpson E. and Buuse M.V., (2003), Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice, *Neuroreport*, 14, 1979-1982.

104. Lacreuse A., Verreault M. and Herndon J.G., (2001), Fluctuations in spatial recognition memory across the menstrual cycle in female rhesus monkeys, *Psychoneuroendocrin.*, 26, 623-639.

105. Croll S.D., Suri C., Compton D.L., Simmons M.V., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M., Wiegand S.J., Rudge J.S. and Scharfman H.E., (1999), Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex, *Neurosci.*, 93, 1491-1506.

106. Ziegler D.R. and Gallagher M., (2005), Spatial memory in middle-aged female rats: assessment of estrogen replacement after ovariectomy, *Brain Res.*, 1052, 163-173.

107. Altar C.A., (1999), Neurotrophins and depression, *Trend Pharmacol. Sci.*, 20, 59-61.

108. Pang P.T. and 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 Res. Rev.*, 3, 407-430.

109. Soharabji F., Miranda R.C.G. and Toran-Allerand, (1995), Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11110-11114.

110. 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.

111. Selmanoff M.K., Brodtkin L.D., Weiner R.I. and Siiteri P.K., (1997), Aromatization and 5 alpha-reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat, *Endocrinol.*, 101, 841-848.

112. Matera C. and Wardlaw S.L., (1994), Aromatization is not required for androgen-induced changes in proopiomelanocortin gene expression in the hypothalamus, *Brain Res Mol*, 27, 275-280.

113. Berchtold N.C., Kessler J.P., Pike C.J., Adlard P.A. and Cotman C.W., (2001), Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus, *Eur. J. Neurosci.*, 14, 1992-2002.

114. Sharfman H.E., Mercurio T.C., Goodman J.H., Wilson M.A. and MacLusky N.J., (2003), Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor, *J. Neurosci.*, 23, 11641-11652.

115. Zhou J., Zhang H., Cohen R.S. and Pandey S.C., (2005), Effects of estrogen treatment on expression of brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures, *Neuroendocrinol.*, 81, 294-310.

116. Murphy D.D., Cole N.B. and Segal M., (1998), Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11412-11417.

117. Begliuomini S., Casarosa E., Pluchino N., Lenzi E., Centofanti M., Freschi L., Pieri M., Genazzani A.D., Luisi S. and Genazzani A.R., (2007), Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor, *Human. Reprod.*, 22, 995-1002.

118. Fraser H.M., Bell J., Wilson H., Taylor P.D., Morgan K., Anderson R.A. and Duncan W.C.,(2005), Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 90, 427-434.

119. Tropea A., Micheli F., Minici F., Tiberi F., Orlando M., Gangale M.F., Romani F., Catino S., Mancuso S., Navarra P. and Lanzone A., (2006), Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis and release by human luteal cells in vitro, *J. Cli. Endocrinol. Metab.*, 91, 2303-2309.

120. Krizsan-Agbas D., Pedchenko T., Hasan W. and Smith P.G., (2003), Estrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus, *Eur. J. Neurosci*, 18, 2760-2768.

121. Gibbs RB (1998) Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res* 787: 259 268

122. Connor B., Young D., Yan Q., Faul R.L., Synek B. and Dragunow M., (1997), Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease, *Brain Res Mol Brain Res*, 49, 71-81.

123. Parain K., Murer M.G., Yan Q., Faucheux B., Hirsch Y. and Raisman-Vozari R., (1995), Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra, *Neuroreport.*, 10 (3), 557-561.

124. Karege F., Schwald M., and Cisse M., (2002), Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets, *Neurosci. Lett.*, 328 (3), 261-264.

125. Barbany G and Persson H (1992) Regulation of neurotrophin mRNA expression in rat brain by glucocorticoid, *Eur J Neurosci* 4: 396-403

126. Barbany G and Persson H (1993) Adrenalectomy attenuates kainic acid-elicited increases of messenger RNAs for neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neuroscience* 54: 909-922

127. Hansson AC, Cintra A, Belluardo N, Sommer W, Bhatnagar M, Badre M, Ganten D and Fuxe K (2000) Gluco- and mineralcorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neuroscience* 12: 2918-2934

128. Neeper SA, Gonez-Pinhilla F, Choi J and Cotman CW (1991) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Molecular and cellular biology* 11: 143-153

129. Castrèn E, Zafra H, Thoenen H and Lindholm D (1992) Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *PNAS* 89: 9444-9448

130. Bova R, Micheli MR, Quadralucci P and Zucconi GG (1998) BDNF and trkB mRNA oscillate in the rat brain during the light-dark cycle. *Molecular Brain Research* 57: 321 324

131. Schaaf MJM, Durland R, de Kloet ER and Vreugdenhil E (1998) Down-regulation of BDNF mRNA and protein in rat hippocampus by corticosterone. *Brain Research* 813: 112 120

132. Dolci C, Montaruli A, Roveda E, Barajon A, Vizzotto GG, Zucconi GC and Caradente F (2003) Circadian variations in expression of the trkB receptor in adult rat hippocampus. *Brain Research* 994: 67 72

133. Hastings MH (1997) central clocking. *Trends neurosci* 20: 459-464

134. Baker FC and Driver HS (2007) Circadians Rhythms, sleep and the menstrual cycle. *Sleep Medicine* 8: 613 622

135. Begliuomini S, Lenzi E, Ninni F, Casarosa E, Merlini S, Pluchino N, Valentino V, Luisi S, Luisi M and Genazzani AR (2008) Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *J of Endocrinol* 197: 1 8

136. Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hasan W and Smith PG (2003) Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci*.18(10):2760 8.

137. Kirschbaum C, Kudielka BM, Gaab J, Schimmer N and Hellhammer DH (1999) Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis. *Psychosomatic Medicine* 61: 154 162

138. Naert G, Maurice T, Tapia-Arancibia L and Givalois L (2007) Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 1062 1078

139. Berchtold NC, Oliff HS, Isaksson P and Cotman CW (1999) Hippocampal BDNF mRNA shows a diurnal regulation, primarily in the exon III transcript. *Molecular Brain Research* 71: 11 22

140. Givalois L, Arancibia S, Alonso G and Tapia-Arancibia L (2004) Expression of BDNF and its receptors in the median eminence cell with sensitivity to stress. *Endocrinology* 135: 4737 4747

141. Halbreich U (2003) The etiology, biology, and evolving pathology of premenstrual syndromes. *Psychoneuroendocrinology* 28 (suppl.3) 55 99

142. Pearlstein TB, Bachmann GA, Zacur HA and Yonkers KA (2005) Treatment of premenstrual dysphoric disorder with a new drospirenone-containing oral contraceptive formulation. *Contraception*. 72(6):414-21.

143. Kroll R and Rapkin AJ. (2006) Treatment of premenstrual disorders. *J Reprod Med*. 51(4):359-70.

144. Bova R, Micheli MR, Qualadrucci P, Zucconi GG. (1998) BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light-dark cycle. *Brain Res Mol Brain Res.*;57:321-4.

145. Poduslo JF and Curran GL (1996) Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Molecular Brain Research* 36: 280 286

LEGENDA DELLE FIGURE

Figura 1. Concentrazioni plasmatiche di estradiolo (E2) e BDNF durante la fase follicolare (FP) e luteale (LP) di donne normalmente mestruate, in terapia contraccettiva orale (OC) ed in postmenopausa.

** p < 0.01 *** p < 0.001 *versus* FP

Figura 2. Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne fertili in fase follicolare del ciclo mestruale

** p < 0.01, *** p < 0.001 *versus* 8:00.; ∞ p < 0.01. ∞∞ p < 0.001 *versus* 12 a.m., § p < 0.05, §§ p < 0.01 *versus* 16:00

Figura 3 Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne fertili in fase luteale del ciclo mestruale

*** p < 0.001 *versus* 8 a.m. ° p < 0.05. ∞∞ p < 0.001 *versus* 12:00; §§§ p < 0.001 *versus* 16:00.

Figura 4. Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne in terapia contraccettiva orale (OC).

** p < 0.01, *** p < 0.001 *versus* 8:00; ° p < 0.05, ∞∞ p < 0.001 *versus* 12:00.; § p < 0.05 *versus* 16:00.

Figura 5. Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne in postmenopausa

* p < 0.05, *** p < 0.001 *versus* 8:00, ∞ p < 0.01. ∞∞ p < 0.001 *versus* 12:00.

Figura 6. Confronto tra le variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e di cortisolo (B) in tutta la popolazione in studio.

Figura 7. Correlazione tra estradiolo (E2) e BDNF in donne in terapia contraccettiva orale OC

Figura 8. Correlazione tra estradiolo (E2) e BDNF in donne in postmenopausa

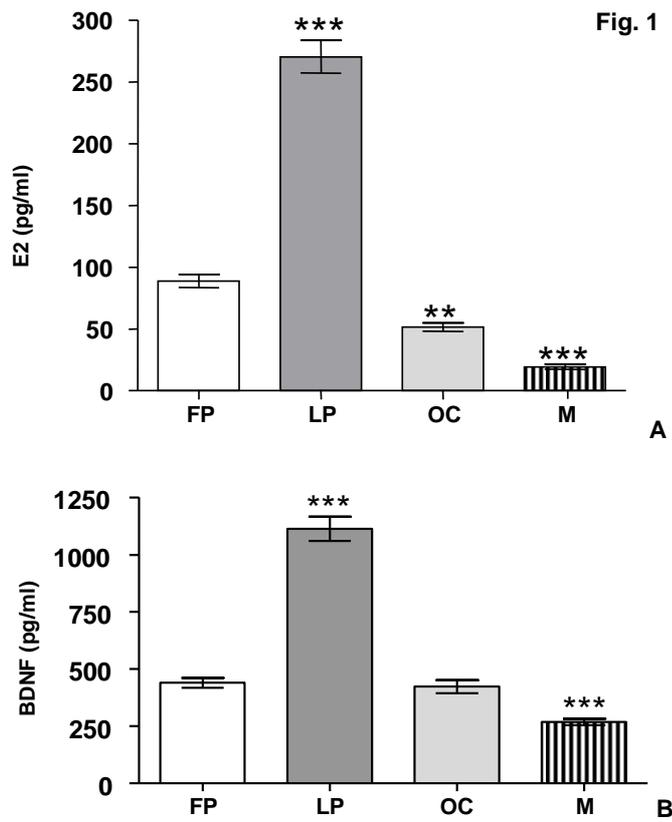
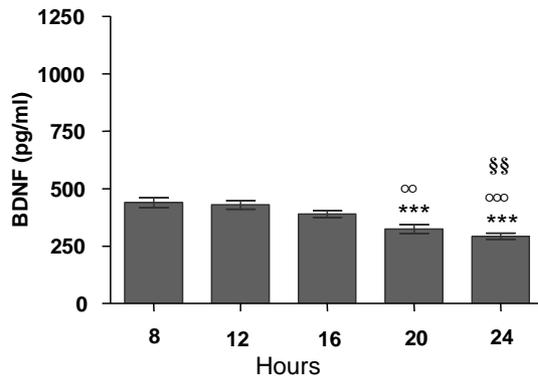
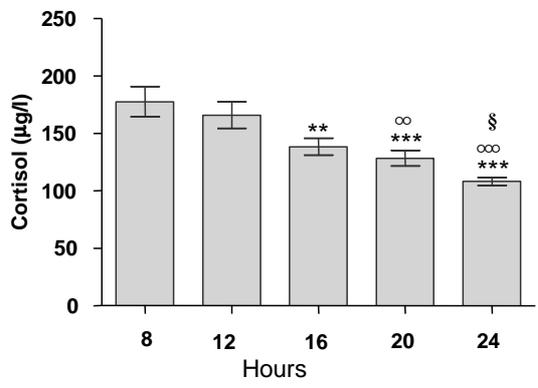


Figura 1. Concentrazioni plasmatiche di estradiolo (E2) e BDNF durante la fase follicolare (FP) e luteale (LP) di donne normalmente mestruate, in terapia contraccettiva orale (OC) ed in postmenopausa. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus FP

Fig. 2



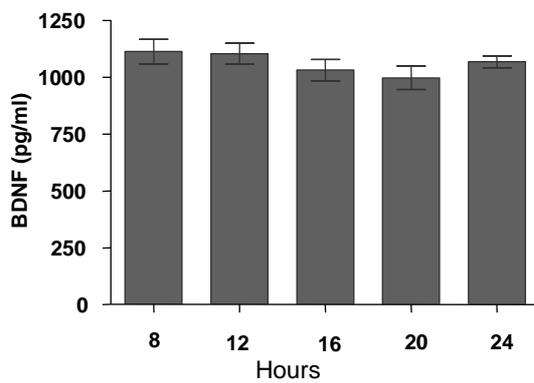
A



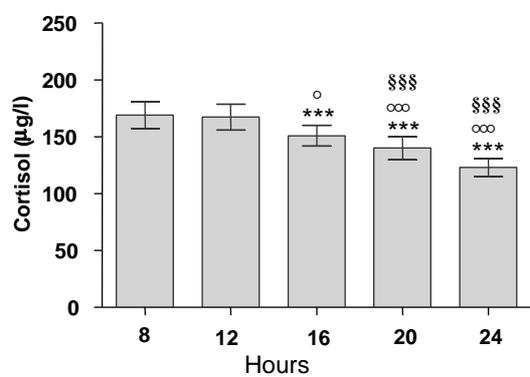
B

Figura 2. Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne fertili in fase follicolare del ciclo mestruale ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus 8:00.; ∞ p < 0.01, ∞∞ p < 0.001 versus 12 a.m., § p < 0.05, §§ p < 0.01 versus 16:00

Fig. 3



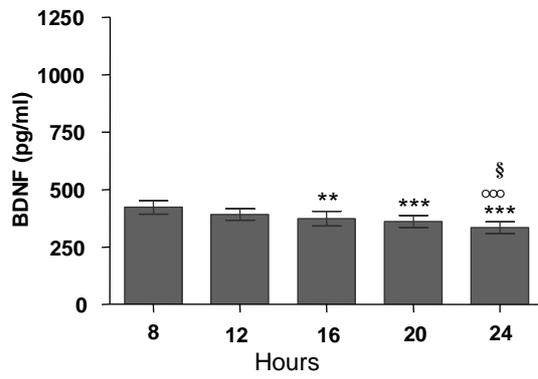
A



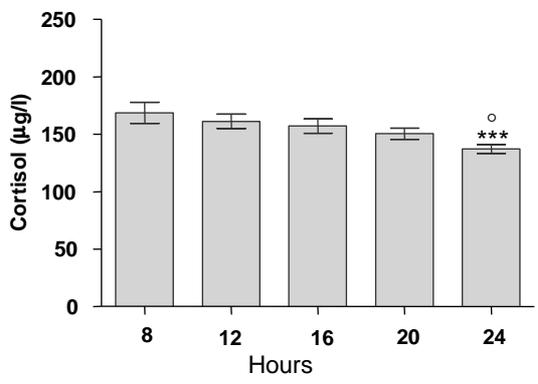
B

Figure 3. Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne fertili in fase luteale del ciclo mestruale *** p < 0.001 versus 8 a.m. *p<0.05. **p<0.001 versus 12:00; \$\$\$ p<0.001 versus 16:00.

Fig. 4



A



B

Figure 4. Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne in terapia contraccettiva orale (OC). ** p<0.01, *** p<0.001 versus 8:00; * p<0.05, **** p<0.001 versus 12:00.; § p<0.05 versus 16:00.

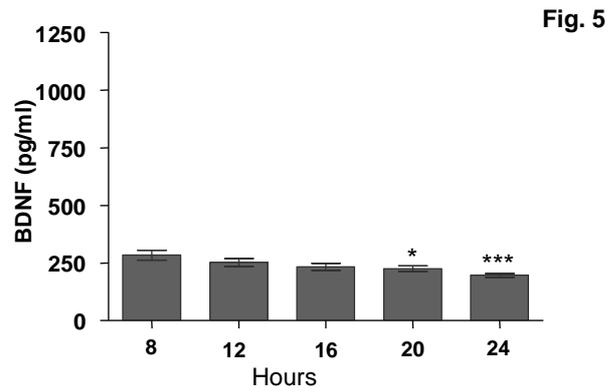
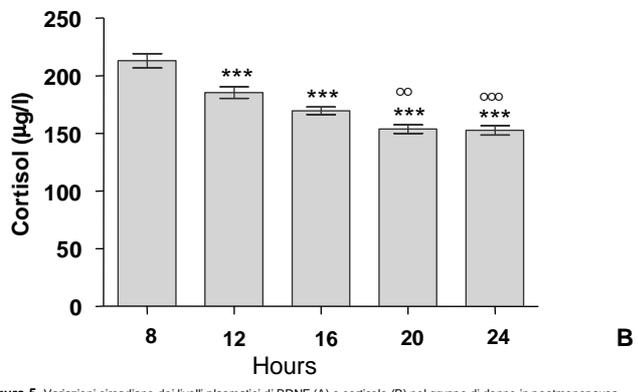


Fig. 5

A

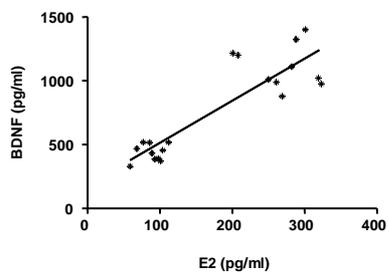


B

Figure 5. Variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e cortisolo (B) nel gruppo di donne in postmenopausa
 * p<0.05, *** p<0.001 versus 8:00, ∞ p<0.01, ∞∞ p<0.001 versus 12:00.

Correlation E2/BDNF during the fertile cycle

E2 (pg/ml)	BDNF (pg/ml)
68	468
77	518
59	329
86	516
101	371
93	385
104	456
98	392
89	433
112	518
208	1200
269	878
288	1324
301	1401
323	976
250	1010
261	988
319	1021
282	1111
201	1216



$r = 0.883$

Figura 6. Correlazione tra le variazioni circadiane dei livelli plasmatici di BDNF (A) e di cortisolo (B) in tutta la popolazione in studio.

Fig. 6

Fig. 7

Correlation E2/BDNF in OC women

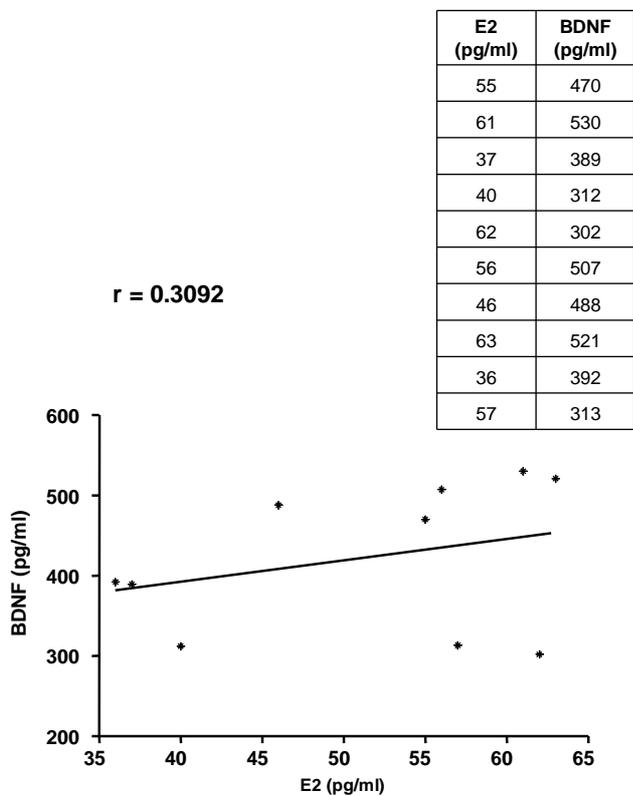


Figure 7. Correlazione tra estradiolo (E2) e BDNF in donne in terapia contraccettiva orale (OC).

Fig. 8

Correlation E2/BDNF in menopausal women

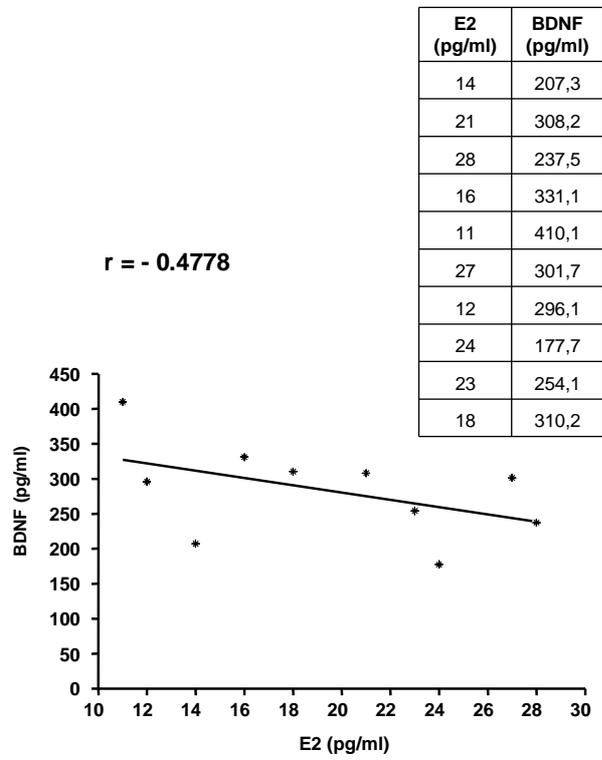


Figura 8. Correlazione tra estradiolo (E2) e BDNF in donne in postmenopausa