

Rendiconti Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari Supplemento Vol. 70 (2000)

Neurosteroidi: i modulatori endogeni delle emozioni

GIOVANNI BIGGIO (*), ALESSANDRA CONCAS (*), PAOLO FOLLESA (*), LAURA DAZZI (*),
ENRICO SANNA (*), MARIANGELA SERRA (*)

Abstract. *The discovery that facilitation or inhibition of γ -aminobutyric acid (GABA)-mediated neurotransmission results in anxiolytic versus anxiogenic, hypnotic versus somnolitic, and anticonvulsant versus convulsant effects, respectively, provided important early insight into the physiology and pharmacology of central GABAergic transmission. This realization, together with subsequent evidence that high-affinity recognition sites for positive and negative allosteric modulators of GABA_A receptors are located on these GABA-gated Cl⁻ channels, led to the concept that GABA_A receptors contribute directly not only to the pharmacology but also to the neurobiology and physiopathology of a variety of neurological and psychiatric diseases characterized by changes in emotional state, sleep pattern, or neuronal excitability. These findings have suggested the hypothesis that the brain and peripheral organs in mammals might produce endogenous compounds that selectively modulate central GABA_A receptor function. Evidence directly supporting this hypothesis has been provided over the last decade by the discovery that steroid hormones synthesized in the brain or in peripheral organs are among the most selective, potent, and efficacious allosteric modulators of GABA_A receptors. Neurosteroids are steroid derivatives that are synthesized de novo from cholesterol in the central nervous system (CNS), some of which modulate GABA_A receptor function with potencies and efficacies similar to or greater than those of benzodiazepines and barbiturates. These molecules have thus been suggested to be the endogenous modulators of GABA_A receptor-mediated neurotransmission. In fact some of these molecules have the capability to modulate synaptic activity by binding to membrane sites associated with ligand-gated ionotropic receptors including GABA_A receptors. Here we summarize some of the most recent evidences obtained by our and other laboratories pertaining the role of two neuroactive steroids allopregnanolone (AP) and tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) actives in modulating the function and plasticity of GABA_A receptors in nature.*

INTRODUZIONE

La scoperta che la facilitazione o la riduzione della neurotrasmissione inibitoria mediata dall'acido γ -aminobutirrico (GABA) risulta, rispettivamente, in effetti ansiolitici

(*) Dip. Biologia Sperimentale, Sez. Neuroscienze, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari.

o ansiogenici, ipnotici o sonnoliti, anticonvulsivanti o convulsivanti, ha fornito importanti informazioni sulla fisiologia e farmacologia della trasmissione GABAergica centrale. Queste osservazioni, insieme alle successive evidenze che hanno mostrato che i siti ad alta affinità per i modulatori allosterici positivi e negativi dei recettori per il GABA di tipo A (recettori GABA_A) sono localizzati sullo stesso complesso recettoriale GABA_A a cui è associato un canale allo ione Cl⁻, ha condotto all'ipotesi che i recettori GABA_A contribuiscono direttamente non solo alla farmacologia ma anche alla neurobiologia e fisiopatologia di una varietà di malattie neurologiche e psichiatriche caratterizzate da alterazioni dello stato emozionale, *pattern* del sonno, o eccitabilità neuronale. Queste diverse osservazioni, effettuate in maggior parte tra il 1975 e il 1985, hanno suggerito inoltre l'ipotesi che il cervello e gli organi periferici dei mammiferi producano composti endogeni che selettivamente modulano la funzione dei recettori GABA_A centrali.

Le evidenze sperimentali che sostengono direttamente questa ipotesi sono state fornite nell'arco dell'ultima decade con la scoperta che gli ormoni steroidei sintetizzati, oltre che negli organi periferici come i surreni e le gonadi, anche nelle cellule gliali e nei neuroni, sono tra i più potenti ed efficaci modulatori allosterici dei recettori GABA_A. Questa scoperta biochimica, insieme ai risultati degli studi comportamentali e clinici effettuati su due dei composti più efficaci – i derivati 5 α -ridotti 3 α -idrossilati del progesterone allopregnanolone (AP) e il tetraidrodeossicorticosterone (THDOC) – ha indicato che tali «neurosteroidi» svolgono il ruolo di modulatori endogeni selettivi della trasmissione centrale mediata dai recettori GABA_A. Numerosi studi molecolari, neurochimici, e neuropsicofarmacologici hanno cercato di determinare il possibile ruolo che le fluttuazioni nel plasma o nel cervello della concentrazione di progesterone, AP, e THDOC svolgono nello sviluppo di alterazioni comportamentali che a queste condizioni fisiologiche e patologiche sono associate.

Di seguito, verranno illustrati alcuni dei più importanti e recenti risultati del nostro e di altri laboratori che indicano come, nel ratto, i derivati AP e THDOC siano responsabili della modulazione della funzione e plasticità dei recettori GABA_A e delle alterazioni comportamentali apparenti in condizioni di stress o durante la gravidanza. Le concentrazioni di questi neurosteroidi raggiunte nel cervello in queste condizioni sono compatibili con tale ruolo proposto. Inoltre, la persistente inibizione dell'attività dell'enzima 5 α -reduttasi, che porta ad una marcata diminuzione della concentrazione di AP e THDOC nel cervello, previene i cambiamenti nella funzione e plasticità dei recettori GABA_A normalmente associati con la gravidanza o con la pseudogravidanza. Queste osservazioni rappresentano evidenze convincenti che i neurosteroidi sono i più importanti regolatori endogeni della funzione e dell'espressione genica dei recettori GABA_A.

BIOSINTESI DEGLI STEROIDI NEL CERVELLO

L'osservazione che quantità sostanziali di pregnenolone e deidroepiandrosterone (DHEA) possono essere misurate nel cervello di roditori 3-4 settimane dopo l'asportazione

chirurgica dei tessuti steroidogenici periferici, e che cellule del cervello (oligodendrociti e astrociti) sono in grado di sintetizzare steroidi, sia *de novo* dal colesterolo [1] o mediante il metabolismo di precursori [2-4], ha condotto al concetto primario di neurosteroidi: steroidi prodotti dal cervello che possono avere un ruolo nella fisiopatologia cerebrale. Sebbene il tessuto nervoso esprima alcuni enzimi steroidogenici presenti nel tessuto delle ghiandole surrenali e delle gonadi, la steroidogenesi del cervello non sembra essere regolata da fattori ipofisari che controllano la produzione periferica di ormoni steroidei [4, 5].

Nel cervello dei roditori, la maggior parte del citocromo P450_{sc} mitocondriale, l'enzima che rompe la catena laterale del colesterolo per produrre pregnenolone, è presente nelle cellule gliali [6]. I mitocondri delle cellule gliali, come quelli delle cellule steroidogeniche periferiche, esprimono anche i cosiddetti recettori «periferici» per le benzodiazepine [7]. Questi recettori esibiscono alta affinità per varie classi di ligandi [8-10], incluse le benzodiazepine, imidazopiridine, isochinoline, e derivati 2-aril-indol-acetamidi, così come il peptide endogeno DBI (diazepam binding inhibitor) e il suo metabolita TTN (trikontatetranuropeptide) [8, 9, 11]. Il legame di DBI, TTN, e dei ligandi sintetici su questo recettore promuove l'ingresso del colesterolo attraverso la membrana interna mitocondriale e stimola la produzione di pregnenolone [8, 9, 11]. I neuroni e la glia esprimono anche gli enzimi richiesti per la sintesi di vari metaboliti del pregnenolone [12-14], inclusi la 5 α -reduttasi e la 3 α -idrossi steroide ossidoreduttasi. Perciò, la somministrazione di agonisti selettivi del recettore mitocondriale per le benzodiazepine/DBI in ratti surrenectomizzati-castrati (ADX-CX) aumenta la produzione di pregnenolone nel cervello [10, 15], e la somministrazione sistemica di progesterone in animali ADX-CX aumenta la quantità di AP nel cervello in maniera regione-dipendente [16]. Inoltre, l'incubazione di fettine di corteccia cerebrale di ratto con cAMP o acido L-ascorbico aumenta la produzione di pregnenolone, progesterone, AP, THDOC, e DHEA in maniera concentrazione- e regione-dipendente, e questo effetto è bloccato dal derivato isochinolino-carbossamide PK11195, che agisce da agonista parziale del recettore mitocondriale per le benzodiazepine/DBI [17, 18].

NEUROSTEROIDI E CANALI IONICI ATTIVATI DA NEUROTRASMETTITORI

Un aspetto cruciale del ruolo fisiologico dei neurosteroidi come neuromodulatori è che, in aggiunta al classico meccanismo d'azione degli steroidi che include il loro legame a recettori citoplasmatici e nucleari, e quindi nella regolazione della trascrizione di specifici geni [19], essi sono capaci di effettuare una rapida azione modulatrice dell'attività sinaptica mediante il loro legame con siti recettoriali della membrana cellulare direttamente associati a recettori ionotropici [20-24]. Il termine *steroidi neuroattivo* è stato proposto [20] per includere gli steroidi prodotti in periferia e nel cervello così come steroidi sintetici che esercitano tali effetti di membrana sulla trasmissione sinaptica.

Il meccanismo molecolare che è alla base delle interazioni di AP, THDOC, e dei vari

steroidi neuroattivi sintetici, con il complesso recettoriale $GABA_A$, e la conseguente amplificazione della corrente al Cl^- GABA-dipendente sono stati caratterizzati in maniera estesa [21, 24]. Altri effetti degli steroidi neuroattivi includono l'inibizione delle correnti al Cl^- GABA-dipendenti [22, 23], e il potenziamento della corrente cationica mediata dai recettori per l'acido glutammico sensibili all'acido N-metil-D-aspartico (NMDA) [25] ad opera del pregnenolone solfato e DHEA solfato, così come l'inibizione della corrente cationica indotta dall'acetilcolina e mediata da recettori nicotinici [26]. Mentre la modulazione positiva dei recettori $GABA_A$ ad opera di AP e THDOC è osservabile *in vitro* a concentrazioni nanomolari, che possono essere raggiunte *in vivo* sotto varie condizioni (es. stress acuto, ciclo mestruale, gravidanza), come dimostrato dalle misurazioni *ex vivo* in estratti di cervello di roditori [5, 27-30], gli effetti degli steroidi sulle correnti cationiche mediate dai recettori NMDA e nicotinico sono apparenti *in vitro* solo a concentrazioni micromolari e perciò potrebbero non avere una rilevanza fisiologica.

Tuttavia, DHEA è capace di favorire l'allungamento dei neuriti che esprimono il marker assonale Tau-1 e di aumentare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} in neuroni corticali embrionali (gg 16) a concentrazioni subnanomolari che sono consistenti con quelle misurate nel cervello di ratti adulti o neonati. Entrambe le azioni di DHEA vengono inibite da AP-5 e MK-801, rispettivamente antagonista competitivo e non-competitivo del recettore glutammatergico NMDA [31]. In questo stesso modello, il derivato DHEA solfato non è in grado di aumentare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , e sebbene favorisca l'allungamento dei neuriti che esprimono il marker dendritico MAP-2, questa azione è AP-5 e MK-801 insensibile. Quindi, se questi effetti sono importanti per le azioni di potenziamento della memoria da parte di DHEA e DHEA solfato [32] è ancora una questione non risolta; a questo proposito, è interessante rimarcare che nell'uomo, le concentrazioni plasmatiche (e probabilmente cerebrali) di DHEA e DHEA solfato diminuiscono marcatamente con l'età [33].

Insieme alla scoperta che le concentrazioni di progesterone, AP, e DHEA differiscono nelle varie regioni cerebrali [16, 34, 35], queste osservazioni suggeriscono che i neurosteroidi agiscono come modulatori endogeni della funzione cerebrale in maniera regione-dipendente.

NEUROSTEROIDI E FUNZIONE DEL CANALE AL Cl^- ASSOCIATO AL RECETTORE $GABA_A$

Studi elettrofisiologici iniziali hanno dimostrato che il derivato sintetico steroideo alfaxalone, dotato di un potente effetto anestetico generale, potenzia l'apertura GABA-mediata del canale al Cl^- associato ai recettori $GABA_A$ [36], sia in fettine di tessuto cerebrale che in neuroni dissociati. AP, THDOC, e altri metaboliti endogeni del progesterone e DHEA sono stati mostrati successivamente condividere questa proprietà dell'alfaxalone a concentrazioni nanomolari e di promuovere direttamente l'attivazione del canale al Cl^- a concentrazioni superiori a 1 micromolare [37]. L'identificazione attraverso studi

elettrofisiologici e neurochimici dei determinanti strutturali che contribuiscono all'azione modulatoria dei recettori $GABA_A$ ad opera dei neurosteroidi ha rivelato che questo effetto non dipende né dalla loro lipofilità né da una loro azione di alterazione della fluidità della membrana cellulare, ma piuttosto sembra essere mediata da una specifica interazione con un sito di legame stereoselettivo e ad alta affinità per gli steroidi [21, 23].

L'evidenza dell'esistenza di un sito per gli steroidi sul recettore $GABA_A$ è anche sostenuta da varie altre osservazioni sperimentali. L'interazione di AP e THDOC con il recettore $GABA_A$ sembra essere responsabile del profilo farmacologico di questi composti: entrambi i derivati inducono un effetto ansiolitico, anticonvulsivante, ipnotico, ed effetti neuroendocrini simili a quelli prodotti dai modulatori allosterici positivi dei recettori $GABA_A$ come le benzodiazepine e loro congeneri, e i barbiturici [21, 23]. Il potenziamento della funzione dei recettori $GABA_A$ ad opera di AP e THDOC risulta sia da un prolungamento della durata del fenomeno di attivazione delle correnti inibitorie postsinaptiche, un meccanismo simile a quello dei barbiturici, sia da un aumento della frequenza di apertura dei singoli canali ionici, un meccanismo simile a quello osservato con le benzodiazepine. Simile agli effetti dei barbiturici e delle benzodiazepine, la facilitazione della funzione dei recettori $GABA_A$ ad opera dei neurosteroidi è maggiore quando la concentrazione di GABA è minima, come dimostrato sia *in vitro*, in studi elettrofisiologici, che *in vivo*, mediante la comparazione degli effetti dell'iniezione intracerebroventricolare di AP tra ratti di controllo e animali in cui la concentrazione cerebrale di GABA veniva marcatamente ridotta a seguito della somministrazione sottocutanea di isoniazide [38]. Tale pretrattamento con isoniazide aumenta il binding del ^{35}S -TBPS, un ligando selettivo per il sito della picrotossina localizzato nel canale al Cl^- associato al recettore $GABA_A$, in membrane cerebrali. Questo parametro è inversamente correlato con la quantità di GABA legato al recettore. In maniera simile all'effetto della benzodiazepina midazolam, la somministrazione i.c.v. di AP determina una diminuzione dose-dipendente del binding del ^{35}S -TBPS nelle membrane corticali preparate sia da animali di controllo che animali trattati con isoniazide, ma la potenza di AP è maggiore nei ratti trattati con isoniazide (Tab. 1). Mentre l'aumento di 4-8 volte della concentrazione di AP misurata nella corteccia cerebrale 15 minuti dopo la somministrazione i.c.v. di 1,25 o 2,5 μg di questo neurosteroido marcatamente riduce il binding del ^{35}S -TBPS nelle membrane dei ratti trattati con isoniazide, le stesse dosi non hanno effetto su questo parametro misurato negli animali di controllo.

Il recettore $GABA_A$ è un complesso eteropolimerico la cui sensibilità nei confronti di modulatori positivi o negativi dipende dal tipo di stechiometria delle subunità che lo compongono, che includono le subunità $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 3$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$, δ , ϵ , π , e $\rho 1$ - $\rho 3$. La presenza della subunità γ , che è essenziale per l'effetto ottimale delle benzodiazepine [39-40], non appare influenzare sostanzialmente la modulazione dei recettori $\alpha_n\beta_n$ ad opera di AP o THDOC. Mentre alcuni ricercatori hanno dimostrato una maggiore efficacia dei neurosteroidi in recettori ricombinanti contenenti la subunità $\gamma 1$ rispetto a quelli contenenti la $\gamma 2$ [41], altri hanno mostrato che l'efficacia di AP in recettori ricombinanti

Tabella 1. Effetto della somministrazione intracerebroventricolare di allopregnanolone (AP) o midazolam in ratti di controllo o trattati con isoniazide sul binding del [³⁵S]TBPS e sulle concentrazioni di AP nella corteccia cerebrale^(a).

| Trattamento (µg) | Binding specifico del [³⁵ S]TBPS (% del controllo) | | AP corticale (ng/g tessuto) |
|------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Controllo | Isoniazide | |
| Veicolo | 100 ± 3 | 156 ± 5 | 4,7 ± 1,6 |
| AP (0,6) | 102 ± 4 | 150 ± 6 | 19 ± 4,5 ^(c) |
| AP (1,25) | 98 ± 3 | 130 ± 4 ^(b) | 37 ± 6,6 ^(c) |
| AP (2,5) | 95 ± 4 | 115 ± 6 ^(b) | 101 ± 18 ^(c) |
| AP (5,0) | 80 ± 3 ^(b) | 101 ± 5 ^(b) | 301 ± 42 ^(c) |
| AP (10) | 62 ± 5 ^(c) | 80 ± 4 ^(c) | |
| AP (15) | 35 ± 4 ^(c) | 68 ± 4 ^(c) | |
| Midazolam (10) | 55 ± 3 ^(c) | 65 ± 4 ^(c) | |

[³⁵S]TBPS, t-butilbicyclofosforotionato marcato col radioisotopo ³⁵S.
^(a) I ratti maschi sono stati trattati per via sottocutanea con soluzione fisiologica (controllo) o con isoniazide (375 mg/kg) 30 minuti prima della iniezione intracerebroventricolare di AP, midazolam o della soluzione veicolo. Gli animali sono stati sacrificati 45 minuti dopo l'iniezione di isoniazide (15 minuti dopo la somministrazione di AP o midazolam), e la corteccia cerebrale è stata utilizzata per la misurazione del binding specifico del [³⁵S]TBPS e delle concentrazioni di AP. I dati del binding sono espressi come percentuale del valore misurato negli animali trattati col veicolo. I dati sono le medie ± ESM dei valori ottenuti da 10-12 ratti.
^(b) $p < 0,05$ comparato al rispettivo valore del veicolo.
^(c) $p < 0,05$ comparato al rispettivo valore del veicolo.

$\alpha 1\beta 1\gamma 3$ espressi in oociti di *Xenopus* è maggiore di quella osservata in recettori $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ o $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ [42]. L'efficacia di AP o THDOC è relativamente più bassa in recettori ricombinanti contenenti la subunità δ [43] o ϵ [44]. Sebbene la potenza e l'efficacia di una benzodiazepina sono influenzate dal tipo di subunità α presente nel complesso recettoriale, risultati inconsistenti sono stati ottenuti nel caso di AP e THDOC [21]. L'interruzione di una somministrazione a lungo termine di dosi farmacologiche di progesterone induce un aumento dell'espressione della subunità $\alpha 4$ così come una diminuzione nella sensibilità dei recettori ad un potenziamento da parte di benzodiazepine e AP, ma non dei barbiturici [45].

La comparazione dei risultati ottenuti da numerosi studi è complicata dai differenti sistemi di espressione eterologa utilizzati per studiare i recettori ricombinanti (che possono risultare in differenze nei livelli di espressione delle diverse subunità o nel grado della loro incorporazione nella membrana cellulare) e dall'uso di differenti combinazioni di isoforme di subunità. Ciononostante, è probabile che l'amplificazione dell'attività sinaptica mediata dal GABA ad opera dei neurosteroidi *in vivo* dipenda non solo dall'attività intrinseca della specifica molecola (modulatore allosterico parziale o com-

pleto) ma anche dalla struttura del recettore GABA_A con cui interagisce. L'osservazione che l'espressione di certe subunità del recettore GABA_A è ristretta a certe regioni cerebrali [46] suggerisce anche che il potenziamento delle correnti al Cl⁻ mediate dal GABA ad opera di steroidi neuroattivi potrebbe essere localizzata in specifiche aree del cervello, e che possano esserci delle molecole di steroidi in grado di interagire più selettivamente con alcuni sottotipi di recettori GABA_A piuttosto che con altri.

Il particolare meccanismo di interazione dei neurosteroidi con il recettore GABA_A, che appare differire da quello delle benzodiazepine e loro congeneri, ha giustificato il crescente sforzo di sintetizzare steroidi neuroattivi che possano dimostrarsi utili come nuovi farmaci ansiolitici e anticonvulsivanti. Tali composti condividono con benzodiazepine e barbiturici l'abilità di proteggere gli animali dalle convulsioni indotte da isoniazide, PTZ o bicucullina [21], ma, diversamente da questi farmaci, essi svolgono un'azione protettiva anche contro le convulsioni indotte da cocaina o NMDA [47]. A dosi che sono inefficaci se somministrate da sole, AP e alcuni steroidi neuroattivi aumentano gli effetti anticonvulsivanti del diazepam [47] e flurazepam [48] in modelli di convulsioni nei roditori. Inoltre, il progesterone aumenta la sensibilità al triazolam in donne in postmenopausa [49].

Un fattore importante nel considerare il potenziale terapeutico di un farmaco anticonvulsivante è il possibile sviluppo di tolleranza durante il trattamento a lungo termine. Tolleranza alle benzodiazepine e congeneri appare essere correlato con la loro efficacia nel potenziare la funzione dei recettori GABA_A ed essere associata con l'abilità di influenzare l'espressione di distinte subunità del recettore GABA_A stesso. Per esempio, la tolleranza alla somministrazione acuta di un modulatore ad alta attività intrinseca dopo somministrazioni ripetute dello stesso farmaco nel ratto si correla con la down-regulation degli mRNA codificanti per specifiche subunità del recettore GABA_A nel cervello [50-54], mentre la mancanza di tolleranza nei confronti di modulatori con attività intrinseca ridotta (agonisti parziali) si associa con la mancanza di induzione di tali effetti [55]. Risultati contrastanti sono stati ottenuti a riguardo della potenzialità di sviluppo di tolleranza con gli steroidi neuroattivi nei confronti del loro effetto anticonvulsivante, ansiolitico, e sedativo [56-58], così come sullo sviluppo di tolleranza crociata tra steroidi neuroattivi e benzodiazepine [45, 57]. Sebbene si potrebbe speculare che una mancanza di tolleranza agli steroidi neuroattivi possa essere conseguenza della specifica natura della loro interazione con il recettore GABA_A, le differenze nel tipo di neurosteroidi somministrato o nel dosaggio o nel protocollo di somministrazione potrebbero essere responsabili per le discrepanze osservate nella potenzialità di sviluppo di tolleranza a questi composti.

TRASMISSIONE GABAERGICA, STRESS E ASSE IPOTALAMO-IPOFISISURRENE

Inibitori selettivi dei recettori GABA_A

L'elevata potenza ed efficacia di AP e THDOC nel potenziare l'azione del GABA a

livello dei recettori GABA_A suggeriscono che questi steroidi possono giocare un ruolo fisiologico nella modulazione dell'eccitabilità neuronale in varie regioni cerebrali, incluso l'ipotalamo. L'evidenza che il GABA, agendo sui recettori GABA_A, inibisce la secrezione del fattore di rilascio della corticotropina (CRF) dall'ipotalamo [59, 60] suggerisce che la trasmissione mediata dai recettori GABA_A svolga un importante ruolo nella diretta modulazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e che i neurosteroidi possano partecipare nella regolazione a *feed-back* di questo sistema. In accordo con questo schema, una singola dose di AP o progesterone è in grado di attenuare l'aumento della concentrazione plasmatica dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e del corticosterone indotto da uno stress emozionale [61], indicativo di un'azione inibitoria di AP sull'attivazione dell'asse HPA indotta dallo stress.

Per chiarire il ruolo della trasmissione GABAergica e dei neurosteroidi nella modulazione dell'asse HPA, a diversi tempi dopo la somministrazione sottocutanea in ratti non stressati (*handling-habituated*) con isoniazide, un inibitore della acido glutammico decarbossilasi [62], abbiamo misurato le concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC [29, 63]. Le concentrazioni cerebrali di AP e THDOC sono state determinate mediante saggio radioimmunologico (RIA) utilizzando anticorpi specifici [64], dopo estrazione di un omogenato di tessuto con acetato di etile e frazionamento dell'estratto mediante HPLC [18]. Questi passaggi sono essenziali per una quantificazione ottimale di questi neurosteroidi ed evitano possibili fenomeni di reattività crociata o interferenze con altri componenti steroidei o non-steroidi presenti nell'estratto.

Con una curva temporale che ben si correla con quella della sua azione depletiva del GABA [62], la somministrazione di isoniazide aumenta le concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC (Tab. 2); questi effetti sono già evidenti 20 minuti dopo la somministrazione del farmaco, sono massimali tra i 40 e gli 80-120 minuti, e non sono più apparenti dopo 300 minuti. La concentrazione plasmatica di corticosterone risulta aumentata 40 minuti dopo la somministrazione di isoniazide ma ritorna ai valori di controllo entro gli 80 minuti. L'osservazione che l'aumento delle concentrazioni di AP e THDOC nel cervello e nel plasma persistono per un periodo di tempo più lungo rispetto all'aumento delle concentrazioni plasmatiche di corticosterone è consistente con un ruolo di questi neurosteroidi nel controllo a *feed-back* dell'asse HPA. Una diminuzione dell'attività sinaptica mediata dal GABA potrebbe indurre un'attivazione dell'asse HPA, mentre AP e THDOC potrebbero contribuire a ripristinare il tono funzionale della trasmissione GABAergica. Questa ipotesi è anche consistente con il potenziamento della risposta plasmatica del corticosterone allo stress acuto osservato dopo una iniezione intracerebroventricolare di anticorpi contro AP nel ratto [65].

Dal momento che la somministrazione di isoniazide induce convulsioni tonico-cloniche in circa l'80% degli animali trattati entro circa 50 minuti dalla somministrazione [38], la possibilità che l'osservato aumento delle concentrazioni di AP e THDOC possa essere causato da un generale aumento nell'eccitabilità neuronale associata alle convulsioni, piuttosto che essere una diretta conseguenza della ridotta trasmissione GABAergica,

Tabella 2. Variazione temporale degli aumenti delle concentrazioni cerebrocorticali e plasmatiche di allopregnanolone (AP), allotetraidrodeossicorticosterone (THDOC), e corticosterone (CORT) indotti da isoniazide e da FG 7142^a

| Trattamento (min) | Corteccia (ng/g proteina) | | Plasma (ng/ml) | | |
|-------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | AP | THDOC | AP | THDOC | CORT |
| Veicolo | 9,0 ± 1,0 | 11 ± 1,2 | 0,55 ± 0,13 | 0,5 ± 0,12 | 114 ± 19 |
| Isoniazide (20) | 17 ± 2,4 ^(b) | 16 ± 1,3 | 1,2 ± 0,24 ^(b) | 1,3 ± 0,27 ^(b) | 95 ± 31 |
| Isoniazide (40) | 45 ± 12 ^(b) | 42 ± 8,0 ^(b) | 1,6 ± 0,32 ^(b) | 1,4 ± 0,23 ^(b) | 171 ± 18 ^(b) |
| Isoniazide (80) | 39 ± 7,1 ^(b) | 35 ± 6,4 ^(b) | 1,4 ± 0,4 ^(b) | 2,3 ± 0,37 ^(b) | 135 ± 22 |
| Isoniazide (120) | 13 ± 2,1 | 20 ± 2,0 ^(b) | 0,7 ± 0,22 | 2,9 ± 0,68 ^(b) | 120 ± 10 |
| Isoniazide (300) | 10 ± 1,5 | 12 ± 1,0 | 0,6 ± 0,12 | 0,75 ± 0,21 | 92 ± 28 |
| Veicolo | 8,9 ± 1,1 | 10,5 ± 1,0 | 0,6 ± 0,13 | 0,65 ± 0,11 | 120 ± 18 |
| FG 7142 (30) | 31 ± 2,0 ^(b) | 23 ± 1,9 ^(b) | 1,2 ± 0,2 ^(b) | 1,9 ± 0,23 ^(b) | 305 ± 42 ^(b) |
| FG 7142 (60) | 20 ± 1,8 ^(b) | 20 ± 1,5 ^(b) | 1,0 ± 0,1 ^(b) | 1,7 ± 0,2 ^(b) | 220 ± 24 ^(b) |
| FG 7142 (120) | 10 ± 1,1 | 12 ± 1,4 | 0,7 ± 0,11 | 0,5 ± 0,1 | 160 ± 31 |

^(a) Ratti maschi non stressati (*handling-habituated*) sono stati trattati con isoniazide (375 mg/kg, s.c.), FG 7142 (20 mg/kg, i.p.) o soluzione veicolo, e sacrificati ai tempi indicati. Sono state quindi misurate le concentrazioni cerebrocorticali e plasmatiche di AP, THDOC e CORT. I dati sono le medie ± ESM dei valori ottenuti da almeno 10 ratti.

^(b) $p < 0,05$ comparato ai rispettivi valori del veicolo.

è stata valutata trattando gli animali con un modulatore allosterico negativo dei recettori GABA_A, il derivato β -carbolinico FG 7142. Questo composto, che possiede proprietà ansiogeniche e proconvulsivanti [66-68], è stato scelto per la sua incapacità di indurre *per se* convulsioni. Questo esperimento era inteso a chiarire il tipo di recettore GABA responsabile per le variazioni nelle concentrazioni di AP e THDOC indotte dall'isoniazide, dato che la deplezione di GABA dovrebbe provocare una riduzione della funzione GABAergica mediata sia dai recettori GABA_A sia da quelli GABA_B.

La somministrazione di FG7142 induce una diminuzione delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC con una curva temporale (Tab. 2) consistente con quella della sua azione ansiogenica e proconvulsivante mediata dai recettori GABA_A [68]. Il contributo della diminuzione della funzione dei recettori GABA_A a determinare l'aumento delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC indotto dall'isoniazide o dall'FG7142 è ulteriormente dimostrato dalla capacità dell'abecarnil, un derivato b-carbolinico con attività modulatoria positiva sui recettori GABA_A e che agisce come potente ansiolitico e anticonvulsivante [69], di prevenire questi aumenti a una dose (0,3 mg/kg) non capace di modificare le concentrazioni basali di AP e THDOC nei ratti non-stressati (*handling-habituated*) [63].

I nostri dati hanno mostrato che le concentrazioni cerebrali di AP e THDOC, due

neurosteroidi potenti modulatori positivi dell'azione del GABA a livello dei recettori GABA_A, sono aumentate in risposta ad una selettiva diminuzione del tono della neurotrasmissione mediata dai recettori GABA_A ottenuta mediante manipolazione farmacologica. Questo effetto è contrastato dall'abecarnil, un selettivo modulatore positivo della funzione dei recettori GABA_A. Questi risultati indicano che AP e THDOC, e probabilmente altri neurosteroidi endogeni attivi sui recettori GABA_A, possano giocare un ruolo fisiologico nel regolare la trasmissione inibitoria GABAergica nel Sistema Nervoso Centrale.

Queste osservazioni, insieme alle precedenti evidenze che lo stress acuto riduce la funzione dei recettori GABA_A [70] e aumenta le concentrazioni plasmatiche e cerebrali di neurosteroidi [20, 27-29, 63], ci hanno indotto a valutare ulteriormente il ruolo funzionale giocato da questi ormoni nel ripristino della funzione dei recettori GABA_A dopo esposizione degli animali ad uno stress acuto o ad uno stress cronico. Abbiamo inoltre indagato il ruolo dell'asse HPA come fonte di neurosteroidi plasmatici e cerebrali in animali soggetti ad una diminuzione farmacologica o stress-indotta della neurotrasmissione GABAergica.

Stress acuto

Alcuni protocolli sperimentali di stress acuto nei roditori hanno messo in evidenza come questa condizione sia associata ad una riduzione transitoria della funzione dei recettori GABA_A che è apparente quasi immediatamente (entro pochi minuti) dopo l'esposizione allo stimolo stressante e che è accompagnata dall'espressione di un comportamento proconflittuale, un indice di stato ansioso nei roditori [70]. L'esposizione dei ratti ad un debole stimolo elettrico somministrato alle zampe (*foot-shock*) o l'inalazione forzata di diossido di carbonio (CO₂) per 1 minuto, una procedura quest'ultima che induce ansia in individui sani e precipita attacchi di panico in individui con disturbi d'ansia [71], risulta in un aumento del legame del ³⁵S-TBPS in preparazioni di membrane cerebrali e una diminuzione dell'uptake di ³⁶Cl⁻ stimolato da GABA o muscimolo in sinaptoneurosomi [72]. Sia gli effetti neurochimici che comportamentali dello stress acuto sono prevenuti, in modo flumazenil-sensibile, dalla somministrazione sistemica di vari modulatori positivi dei recettori GABA_A che si legano al sito di riconoscimento delle benzodiazepine [70]. Sulla base di queste premesse, è stato quindi di notevole interesse determinare se AP e THDOC contribuiscono alle modificazioni della trasmissione GABAergica indotte dallo stress acuto.

Uno stress da *foot shock* di bassa intensità (0,2-mA, impulsi di 500-msec separati da intervalli di 500 msec, in un periodo di tempo di 5 minuti) induce un aumento tempo-dipendente delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC e di quelle dei loro precursori, pregnenolone e progesterone [29, 73].

I ratti sottoposti ad inalazione di una miscela gassosa consistente di 65% O₂ e 35% CO₂ per 1 minuto mostrano un aumento tempo-dipendente della concentrazione di AP nella corteccia cerebrale. La curva temporale di questo effetto è stata comparata con quella dell'azione comportamentale di proconflitto indotta da CO₂ (determinato con il test di Vogel, in cui il numero di bevute associate ad uno stimolo negativo è stato registrato in

Tabella 3. Relazione temporale del comportamento proconflittuale (diminuzione del numero di periodi di bevute, dell'aumento del binding del [³⁵S]TBPS in membrane corticali e accumulo cerebrocorticale di allopregnanolone (AP)) indotti dal diossido di carbonio (CO₂).

| <i>Trattamento (min)</i> | <i>Periodi di bevute (% del controllo)</i> | <i>Binding del [³⁵S]TBPS (% del controllo)</i> | <i>AP (% del controllo)</i> |
|--------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Controllo | 100 ± 6 | 100 ± 5 | 100 ± 15 |
| CO ₂ (10) | 50 ± 4 ^(b) | 148 ± 4 ^(b) | 150 ± 28 |
| CO ₂ (30) | 63 ± 5 ^(b) | 130 ± 5 ^(b) | 318 ± 34 ^(b) |
| CO ₂ (60) | 88 ± 8 | 120 ± 4 ^(c) | 221 ± 22 ^(b) |
| CO ₂ (120) | 98 ± 6 | 101 ± 7 | 123 ± 18 |

[³⁵S]TBPS, t-butilbiciclofosforotionato marcato col radioisotopo ³⁵S.
^(a) I ratti maschi sono stati esposti a CO₂ per 1 minuto e quindi sacrificati ai tempi indicati. I dati sono espressi come percentuali del valore dei ratti di controllo (non esposti alla CO₂) e sono le medie ± ESM dei valori di 10 (AP), 15 (binding del [³⁵S]TBPS), o 48 (test di Vogel) ratti.
^(b) *p* < 0,05 rispetto al valore di controllo.
^(c) *p* < 0,05 rispetto al valore 10-min post-CO₂.

ratti privati d'acqua per 24 ore) e quello dell'aumento del binding del ³⁵S-TBPS (Tab. 3). Sia l'effetto di proconflitto (diminuzione del numero di bevute associate allo stimolo negativo) che l'aumento del binding del ³⁵S-TBPS sono massimali 10 minuti dopo l'inalazione di CO₂, e non sono più apparenti dopo 60 minuti, mentre l'aumento della concentrazione nella corteccia cerebrale di AP è massimale 30 minuti dopo l'inalazione di CO₂ e non ritorna ai valori di controllo se non dopo 120 minuti dopo lo stress. L'osservazione che, quando la concentrazione cerebrale di AP è massimamente aumentata, gli indici di comportamento ansioso e della funzione dei recettori GABA_A ritornano alla norma suggerisce una relazione funzionale tra aumento dei livelli cerebrali di AP e il ripristino della trasmissione GABAergica. Inoltre, come indicato dagli effetti dell'iniezione di isoniazide o FG7142 (Tab. 2), l'aumento delle concentrazioni cerebrali di neurosteroidi potrebbero essere una conseguenza della riduzione indotta dallo stress della funzione dei recettori GABA_A.

Stress acuto in ratti surrenectomizzati e castrati

Per chiarire ulteriormente se l'aumento delle concentrazioni cerebrali di AP e THDOC indotte dallo stress acuto o mediante una diminuzione farmacologica della trasmissione GABAergica sia causato da un aumentato rilascio dai tessuti steroidegenici periferici o da una aumentata sintesi nel cervello, abbiamo esposto ratti ADX-CX ad uno stress acuto o alla somministrazione di isoniazide o FG7142. Sebbene la rimozione delle ghiandole surrenali e delle gonadi riduce solo parzialmente la concentrazione cerebrocorticale di AP nei ratti di controllo, in accordo col fatto che AP è prodotto nel

cervello [1-4], questa rimozione previene completamente l'aumento delle concentrazioni corticali e plasmatiche di AP e THDOC indotto da inalazione di CO₂, *foot shock*, isoniazide, o FG7142 (Tab. 4). Quindi, gli effetti dello stress acuto, isoniazide e FG7142 su questi steroidi neuroattivi appare essere mediato da un identico meccanismo: una diminuzione della funzione inibitoria GABAergica del rilascio di CRF dall'ipotalamo e conseguente attivazione dell'asse HPA.

Nel loro insieme, questi dati sembrano escludere una diretta azione dei ligandi del recettore GABA_A sulla sintesi di neurosteroidi nel cervello. Tuttavia, i dati suggeriscono che AP e THDOC endogeni possono giocare un ruolo nel limitare il grado e la durata della diminuzione della funzione GABAergica indotta dallo stress acuto, un'azione che potrebbe essere rilevante nella patofisiologia dei disturbi emozionali correlati allo stress.

Sebbene lo stress acuto aumenti la concentrazione di steroidi neuroattivi parallelamente nel cervello e nel plasma, suggerendo che le concentrazioni di plasma possono essere considerate come un indicatore di quelle cerebrali, esistono delle eccezioni a questa correlazione. Per esempio, le concentrazioni di AP e THDOC nella corteccia cerebrale, ma non quelle plasmatiche, sono più alte nei ratti *naive* rispetto a quelli non-stressati (*handling-habituated*) [29]. Inoltre, durante la gravidanza, le variazioni della funzione dei recettori GABA_A nel cervello del ratto si correlano con l'aumento delle concentrazioni cerebrali di AP ma non con l'aumento della concentrazione plasmatica di

Tabella 4. La surrenectomia e la castrazione (ADX-CX) prevengono l'aumento delle concentrazioni cerebrocorticali e plasmatiche di allopregnanolone (AP) e allotetraidrodeossicorticosterone (THDOC) indotto normalmente dal foot shock (FS), isoniazide (Iso) o FG 7142^(a).

| Trattamento (min) | Corteccia (ng/g proteine) | | Plasma (ng/ml) | |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | AP | THDOC | AP | THDOC |
| Controllo | 9,0 ± 1,0 | 10 ± 1,3 | 0,7 ± 0,16 | 0,6 ± 1,0 |
| FS (10) | 20 ± 2,3 ^(b) | 40 ± 9,0 ^(b) | 2,1 ± 0,3 ^(b) | 4,8 ± 0,6 ^(b) |
| Iso (40) | 45 ± 12 ^(b) | 42 ± 8,0 ^(b) | 1,6 ± 0,32 ^(b) | 1,4 ± 0,2 ^(b) |
| FG (30) | 31 ± 2,0 ^(b) | 23 ± 1,9 ^(b) | 1,2 ± 0,1 ^(b) | 1,7 ± 0,2 ^(b) |
| ADX-CX, controllo | 5,3 ± 0,6 ^(b) | 1,4 ± 0,2 ^(b) | 0,1 ± 0,02 ^(b) | 1,1 ± 0,04 ^(b) |
| ADX-CX, FS (10) | 5,0 ± 0,8 | 1,8 ± 0,3 | 0,15 ± 0,03 | 0,2 ± 0,05 |
| ADX-CX, Iso (40) | 6,4 ± 1,0 | 2,1 ± 0,4 | 0,2 ± 0,05 | 0,3 ± 0,03 |
| ADX-CX, FG (30) | 4,9 ± 0,9 | 2,2 ± 0,5 | 0,18 ± 0,04 | 0,18 ± 0,03 |

^(a) Tre settimane dopo la castrazione e la surrenectomia, i ratti maschi sono stati esposti al foot shock o al trattamento con isoniazide (375 mg/kg, s.c.) o FG 7142 (20 mg/kg, i.p.) e sono stati successivamente sacrificati ai tempi indicati. I dati sono le medie ± E.S.M. dei valori ottenuti da 8 ratti.

^(b) $p < 0,05$ rispetto al gruppo di controllo.

AP, che invece ha luogo molto prima [30]. Questi dati forniscono ulteriore sostegno per un ruolo dei neurosteroidi nella modulazione della funzione cerebrale, sebbene i meccanismi attraverso i quali la neurosteroidogenesi sia regolata in relazione allo stato emozionale restano da essere determinati.

Stress cronico

L'osservazione che la rimozione delle ghiandole surrenali e delle gonadi previene l'aumento delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC indotto dallo stress acuto ha suggerito che l'asse HPA giochi un ruolo importante nel mediare questo effetto dello stress acuto. L'esposizione ripetuta allo stress risulta in un adattamento dell'asse HPA e in un conseguente graduale decremento nel rilascio di CRF e ACTH [74-76]. Per chiarire ulteriormente il ruolo dell'asse HPA nella regolazione delle concentrazioni cerebrali e plasmatiche di neurosteroidi, abbiamo comparato gli effetti dello stress cronico associato all'isolamento sociale sulla concentrazione di neurosteroidi con quelli indotti dallo stress acuto. L'isolamento sociale dei ratti dopo lo svezzamento produce marcati effetti in un ampio spettro di comportamenti: gli animali isolati mostrano un profilo compatibile con uno stato ansioso nel test dell'*elevated plus maze*, un comportamento aggressivo, un aumento dell'attività locomotoria, e neofobia [77-80].

In accordo con dati precedenti [81, 82], i nostri esperimenti hanno mostrato che i ratti maschi isolati per 1 mese immediatamente dopo lo svezzamento (al giorno 25 postnatale) esibiscono un profilo ansiogenico nel test del *elevated plus maze* e nel test di proconflitto di Vogel: i ratti isolati mostrano una diminuzione del 55% del tempo speso nel braccio aperto del labirinto e una diminuzione del 50% del numero di bevute nel test di Vogel, in relazione agli animali non socialmente isolati. In contrasto con l'effetto dello stress acuto, lo stress cronico indotto da isolamento sociale induce una diminuzione nella concentrazione cerebrocorticale di pregnenolone (-25%), progesterone (-33%), AP (-45%) e THDOC (-24%) (Tab. 5). Queste osservazioni indicano che il marcato aumento delle concentrazioni cerebrali di steroidi neuroattivi apparente durante l'esposizione iniziale allo stress è transitorio, e che questo è seguito da una diminuzione delle concentrazioni fino a valori inferiori a quello basale durante la fase di adattamento alla risposta allo stress cronico. Le concentrazioni di DHEA nella corteccia cerebrale, DHEA che è formato come risultato della rottura della catena laterale del pregnenolone, non sono influenzate dall'isolamento sociale, in accordo con l'osservata mancanza di effetti da parte dello stress acuto causato da inalazione di CO₂ o *foot shock* su questo parametro [28].

L'isolamento sociale riduce anche le concentrazioni di steroidi neuroattivi eccetto che nel caso del corticosterone nel plasma, con gli effetti sugli steroidi neuroattivi che sono quantitativamente simili a quelli osservati nella corteccia cerebrale (Tab. 5). Queste osservazioni sono in accordo con quelle di studi precedenti che mostrano che l'esposizione cronica o intermittente a stimoli stressanti determina un marcato aumento della concentrazione di corticosterone nel plasma [74, 76, 83]. Queste discrepanze potrebbero essere attribuibili al diverso stimolo stressante utilizzato nei diversi studi.

Tabella 5. Effetti dell'isolamento sociale sulle concentrazioni cerebrocorticali e plasmatiche di vari steroidi nel ratto^(a).

| Parametro | Steroidi (ng/g di proteine o ng/ml) | | | | | |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|------------------------|
| | Pregnenolone | Progesterone | AP | THDOC | DHEA | Corticosterone |
| Corteccia cer. | | | | | | |
| – Non isolati | 94 ± 9,5 | 48 ± 5,2 | 5,8 ± 0,6 | 6,7 ± 0,4 | 4,8 ± 0,6 | ND |
| – Isolati | 70 ± 6,7 ^(b) | 32 ± 3,2 ^(b) | 3,2 ± 0,3 ^(b) | 5,1 ± 0,5 ^(b) | 4,7 ± 0,5 | ND |
| Plasma | | | | | | |
| – Non isolati | 2,2 ± 0,1 | 3,4 ± 0,2 | 2,8 ± 0. | 3,9 ± 0,3 | 0,8 ± 0,09 | 122 ± 12 |
| – Isolati | 1,3 ± 0,09 ^(b) | 1,6 ± 0,1 ^(b) | 1,7 ± 0,1 ^(b) | 2,2 ± 0,1 | 0,6 ± 0,06 | 160 ± 7 ^(b) |

AP, allopregnanolone, DHEA; deidroepiandrosterone; THDOC, allotetraidrodeossicorticosterone; ND, non determinato.

^(a) Dopo lo svezzamento (al giorno 25 di vita), i ratti maschi sono stati mantenuti in gruppi (non isolati) o in isolamento per 30 giorni. I dati sono le medie ± E.S.M. dei valori ottenuti da 20 ratti (ciascun campione analizzato in duplicato).

^(b) $p < 0,05$ comparato al rispettivo valore di controllo (non isolati).

Il risultato che lo stress cronico induce una persistente diminuzione delle concentrazioni plasmatiche e cerebrocorticali di steroidi neuroattivi così come una down-regulation di lunga durata dell'asse HPA, rafforza ulteriormente l'ipotesi che l'asse HPA giochi un ruolo importante nel determinare le concentrazioni periferiche e centrali di neurosteroidi negli animali stressati. Dal momento che l'asse HPA ha anche un ruolo nella patofisiologia di disordini affettivi e malattie mentali legate allo stress, i neurosteroidi potrebbero anche essere coinvolti e contribuire a tali alterazioni.

NEUROSTEROIDI E PLASTICITÀ DEL RECETTORE GABA_A DURANTE LA GRAVIDANZA

Un'importante caratteristica dei recettori GABA_A nel cervello di ratto è la loro plasticità in risposta a brevi o duraturi stimoli fisiologici o a trattamenti farmacologici di lunga durata. Le caratteristiche cinetiche dei vari siti di legame localizzati sul recettore GABA_A e l'espressione dei geni codificanti le diverse subunità del recettore GABA_A in differenti aree cerebrali di ratto sono influenzati da stimoli stressanti acuti, kindling, e somministrazione prolungata di una varietà di modulatori allosterici, inclusi gli steroidi neuroattivi [70, 84-87]. Per esempio, il trattamento prolungato *in vivo* e *in vitro* con progesterone o i suoi metaboliti influenzano la funzione e la struttura dei recettori GABA_A [88-90].

La gravidanza rappresenta una condizione fisiologica associata a marcate alterazioni del quadro ormonale. Durante la gravidanza, le concentrazioni di progesterone raggiungono il loro valore massimo misurabile nell'arco della vita di una donna, e le concentra-

zioni di altri steroidi sono in maniera simile marcatamente aumentate. Inoltre, la gravidanza nella donna è caratterizzata da pronunciate alterazioni nel tono dell'umore, nello stato emozionale, con sonnolenza, sensazione di benessere e spesso un aumento della soglia al dolore [91]. In maniera opposta, il puerperio si associa ad un aumento dello stato ansioso e a disturbi depressivi [92]. Dal momento che i recettori GABA_A partecipano nella regolazione di differenti fenomeni psicofisiologici, inclusa l'ansia, il sonno e la depressione, e che AP e THDOC sono derivati del progesterone, abbiamo studiato se la plasticità dei recettori GABA_A durante la gravidanza è correlata a variazioni delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di progesterone, AP e THDOC.

I nostri studi hanno mostrato che il marcato aumento delle concentrazioni di steroidi neuroattivi nel plasma e nel cervello durante la gravidanza esercitano una tonica azione modulatrice sull'attività ed espressione dei recettori GABA_A cerebrali, mentre la rapida e sostanziale diminuzione nelle concentrazioni di questi composti immediatamente prima del parto e i loro bassi livelli durante l'allattamento potrebbero rappresentare un fenomeno di astinenza [30, 93, 94].

Concentrazioni plasmatiche e cerebrocorticali

Le concentrazioni di pregnenolone, progesterone, AP e THDOC nel plasma e nella corteccia cerebrale di ratti durante la gravidanza e dopo il parto sono state comparate con le corrispondenti concentrazioni nel giorno dell'estro. Come atteso, la concentrazione di progesterone nel plasma aumenta marcatamente durante la gravidanza e diminuisce rapidamente prima del parto. Un quadro simile si osserva nel caso di pregnenolone, AP e THDOC. Le concentrazioni plasmatiche di pregnenolone, progesterone, AP e THDOC sono aumentate significativamente (+88%, +277%, +102%, e +6%, rispettivamente) nel giorno 10 di gravidanza, sono ulteriormente aumentate (circa 2,5, 10, 3,6 e 2,5 volte il valore dell'estro, rispettivamente) nei giorni 15 o 19, ritornano ai valori di controllo nel giorno 21, e rimangono immutati 2 giorni dopo il parto.

Le cinetiche delle concentrazioni cerebrali di steroidi neuroattivi differiscono da quelle delle concentrazioni plasmatiche. L'aumento delle concentrazioni corticali di pregnenolone, AP e THDOC è più lento rispetto a quelle di progesterone, raggiungendo un picco massimo nel giorno 19 di gravidanza (+63%, +208%, e +90%, rispettivamente). La curva nel tempo delle concentrazioni corticali di progesterone è simile a quella della sua concentrazione plasmatica, raggiungendo il picco massimo nel giorno 15 (12 volte rispetto al valore dell'estro) e rimane sostanzialmente aumentata nel giorno 19. Le concentrazioni cerebrali di tutti i quattro steroidi ritorna ai valori di controllo immediatamente prima del parto e non si modifica ulteriormente durante il periodo postpartum. Questi risultati suggeriscono che la sintesi o l'accumulazione di AP e THDOC nel cervello delle ratte gravide non è semplicemente una funzione delle concentrazioni plasmatiche di progesterone. Una simile dissociazione tra le concentrazioni di progesterone e AP è stata trovata anche nel fluido cerebrospinale umano [95]. Una possibile spiegazione per questa differenza è che gli ormoni steroidei come gli estrogeni o altri agenti

possono regolare l'attività o l'espressione sia della 5 α -reduttasi sia della 3 α -idrossisteroide ossidoreduttasi nel cervello durante la gravidanza. Infatti, l'estradiolo è capace di regolare l'attività della 3 α -idrossisteroide ossidoreduttasi nel cervello di ratto [96].

Densità e funzione dei recettori GABA_A

Le misurazioni del binding del ³H-GABA, ³H-flunitrazepam e ³⁵S-TBPS in membrane cerebrocorticali hanno rivelato un progressivo aumento della densità dei siti di riconoscimento associati con il recettore GABA_A durante la gravidanza [94]. L'aumento massimo della densità recettoriale coincide col giorno 19 di gravidanza ed è seguito da una marcata riduzione fino ai valori di controllo immediatamente prima del parto (giorno 21 di gravidanza). La densità di ciascuno dei tre siti di legame è ulteriormente diminuita dopo il parto, per poi ritornare ai valori di controllo entro il settimo giorno dopo il parto. Questi dati sono in accordo con le variazioni precedentemente descritte per il binding del ³H-muscimolo nella corteccia frontale di ratto durante la gravidanza e nel periodo postpartum [97], ma essi differiscono da dati più recenti che non hanno messo in evidenza nessuna modificazione dei recettori GABA_A e delle benzodiazepine nella corteccia cerebrale di ratto durante la gravidanza [98].

Le alterazioni nella densità dei recettori GABA_A durante la gravidanza e dopo il parto sono associate ad alterazioni nella funzione recettoriale [30, 93]. La misurazione dell'uptake di ³⁶Cl⁻ in vescicole di membrane cerebrocorticali ha rivelato una progressiva diminuzione degli effetti stimolatori del muscimolo, raggiungendo un valore minimo nel giorno 19 della gravidanza; questo parametro ritorna ai valori di controllo immediatamente prima del parto e mostra un ulteriore aumento 2 giorni dopo il parto. Perciò, la ridotta sensibilità del canale al Cl⁻ accoppiato al recettore GABA_A nei confronti dell'azione del muscimolo durante la gravidanza suggerisce una ridotta attività di questo canale ionico. In contrasto, il marcato aumento dell'efficacia del muscimolo nello stimolare l'uptake di ³⁶Cl⁻ dopo il parto potrebbe essere correlato con un'aumentata attività dei recettori GABA_A. In accordo con queste conclusioni, la capacità del diazepam e di AP, modulatori positivi allosterici dei recettori GABA_A, di stimolare l'uptake di ³⁶Cl⁻, è significativamente ridotta nel giorno 19 di gravidanza e marcatamente aumentata 2 giorni dopo il parto, relativamente ai valori dell'estro.

I nostri dati suggeriscono che le alterazioni nella densità e nella funzione dei recettori GABA_A della corteccia cerebrale di ratto durante la gravidanza e dopo il parto sono funzionalmente correlati a parallele variazioni nelle concentrazioni cerebrali di steroidi neuroattivi. La relazione temporale delle concentrazioni cerebrali di AP e THDOC durante la gravidanza sono simili a quelle della densità dei siti di legame del ³H-GABA, ³H-flunitrazepam e ³⁵S-TBPS. Le concentrazioni corticali di neurosteroidi raggiungono un massimo in corrispondenza del giorno 19 di gravidanza, coincidente con il massimo aumento della densità dei siti di riconoscimento del GABA, benzodiazepine e TBPS. Il picco delle concentrazioni cerebrali di AP e THDOC coincide anche con la massima diminuzione della funzione dei canali al Cl⁻. Inoltre, nel giorno 21 di gravidanza, la

marcata diminuzione delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di steroidi che precede il parto è parallelo con il ripristino della densità e funzione dei recettori $GABA_A$ rispetto ai valori di controllo.

Diversi studi hanno indicato che il trattamento a lungo termine con steroidi neuroattivi può influenzare i recettori $GABA_A$. Il progesterone induce una up-regulation regione-dipendente dei siti di legame del 3H-muscimolo e 3H-flunitrazepam nel cervello [99, 100]. Inoltre, gli esperimenti con neuroni corticali in coltura hanno mostrato che l'esposizione persistente con neurosteroidi riduce sia l'abilità del GABA di stimolare l'uptake di $^{36}Cl^-$ sia l'efficacia delle benzodiazepine e neurosteroidi di potenziare questo effetto [88, 89]. Perciò, l'aumento delle concentrazioni cerebrali di neurosteroidi durante i primi 19 giorni di gravidanza possono essere considerati comparabili alla somministrazione al lungo termine con alte dosi di questi composti, mentre la marcata riduzione delle concentrazioni di progesterone e dei suoi metaboliti apparente al termine della gravidanza e dopo il parto è simile ad una improvvisa interruzione di tale trattamento. Di conseguenza, la deprivazione di ormoni steroidei elicitata dalla ovariectomia sia da sola sia insieme alla surrenectomia, risulta in una diminuzione del numero massimo di siti di riconoscimento del GABA nel cervello [101]. In maniera opposta, alcuni studi hanno mostrato che la sospensione di un trattamento con AP dopo somministrazione intermittente di progesterone [45] o in un modello di pseudogravidanza [102] risulta in una diminuzione della corrente al Cl^- totale mediata dai recettori $GABA_A$ nell'ippocampo. La ragione di questa apparente discrepanza con i nostri dati potrebbe essere correlata alle differenze nelle regioni cerebrali studiate o dal diverso modello sperimentale utilizzato: la gravidanza è un fenomeno fisiologico caratterizzato da un complesso stato ormonale che non può essere facilmente comparato o replicato con la somministrazione di dosi farmacologiche di un singolo ormone. Ciononostante, sia i dati farmacologici [45, 102] che i nostri studi fisiologici [30, 93] indicano che la plasticità dei recettori $GABA_A$ è funzionalmente correlata alle fluttuazioni delle concentrazioni di steroidi endogeni.

Espressione genica delle subunità del recettore $GABA_A$

Per studiare ulteriormente la plasticità del recettore $GABA_A$ nel cervello di ratto durante la gravidanza e dopo il parto, abbiamo misurato la quantità delle diverse subunità proteiche del recettore $GABA_A$ e dei relativi mRNA nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo. Il saggio della Protezione da Rnasi ha rivelato che la quantità di mRNA codificante per la subunità $\gamma 2$ in entrambe le regioni cerebrali diminuisce progressivamente durante la gravidanza. La diminuzione è significativa nel giorno 10 e massima (circa -25%) nel giorno 19 di gravidanza, comparata con il valore dei ratti in estro. La quantità di mRNA per questa subunità ritorna ai valori di controllo il giorno 21 di gravidanza e rimane immodificata 2 giorni dopo il parto. Un simile pattern di alterazioni si osserva per l'espressione della proteina relativa. L'analisi degli *immunoblot* rivela che la quantità di proteina $\gamma 2$ nella corteccia cerebrale è ridotta (-30%) nel giorno 15 e 19 di gravidanza e ritorna ai valori di controllo 2 giorni dopo il parto.

La subunità $\gamma 2$ è essenziale per l'azione modulatoria delle benzodiazepine [39, 40], e l'aumento della probabilità di apertura del canale al Cl^- durante l'occupazione dell'agonista è limitato in assenza di questa subunità [103]. Perciò, le modificazioni nell'espressione di geni codificanti specifiche subunità recettoriali potrebbe contribuire alle alterazioni dell'attività del canale al Cl^- , così come alle variazioni nell'efficacia degli agonisti dei recettori GABA_A e dei modulatori positivi nel potenziare l'uptake di $^{36}\text{Cl}^-$, effetti che si osservano durante la gravidanza e dopo il parto. Alterazioni nell'abbondanza di mRNA per le subunità $\alpha 1$ e $\alpha 2$ in prossimità del parto hanno effetti sostanziali sulla cinetica del canale al Cl^- e sulla sensibilità ai neurosteroidi dei recettori GABA_A nativi in neuroni ipotalamici magnocellulari di ratto [104]. La quantità di mRNA per la subunità $\alpha 5$ nella corteccia cerebrale diminuisce durante la gravidanza. La diminuzione è massima (circa 25%) il giorno 21, e la quantità di mRNA per questa subunità ritorna ai valori di controllo dopo il parto. Queste alterazioni potrebbero essere correlate con la bassa affinità del sito di legame del GABA osservata durante la gravidanza, dato che i recettori GABA_A contenenti la subunità $\alpha 5$ esibiscono l'affinità più alta per il GABA [105]. Per contro, nessun cambiamento significativo nella quantità di peptide $\alpha 1$ o di mRNA codificante per le subunità $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, o $\gamma 2S$ del recettore GABA_A erano apparenti nella corteccia cerebrale (dati non mostrati), suggerendo che le alterazioni dell'espressione delle subunità $\gamma 2L$ e $\alpha 5$ sono specifiche e non rappresentano un fenomeno generalizzato. Quindi, è possibile ipotizzare che solo certi neuroni contenenti specifiche popolazioni di recettori GABA_A contribuiscano alle osservate alterazioni della espressione delle subunità. La quantità di mRNA per le subunità $\alpha 1$ e $\gamma 2$ aumentano selettivamente nei neuroni magnocellulari ipotalamici durante il corso della gravidanza e allattamento, rispettivamente [104, 106].

Effetti degli inibitori della 5α -reduttasi sulla plasticità del recettore GABA_A

La steroido 5α -reduttasi, esistente in due isoforme [13], catalizza la riduzione nicotinammide adenina dinucleotide ridotto (NADPH)-dipendente di vari steroidi Δ^4 -keto (progesterone e androgeni) nei loro metaboliti 5α -ridotti a livello degli organi periferici e nel cervello. Il metabolita 5α -ridotto del testosterone, 5α -androstano- 17β -ol-3-one (diidrotestosterone), è essenziale per il normale sviluppo dei genitali esterni maschili e della prostata, mentre il metabolita 5α -ridotto del progesterone è AP. Perciò, le alterazioni nell'attività di questo enzima, oltre che influenzare il metabolismo del testosterone e contribuire ai disturbi associati, potrebbe risultare in alterazioni delle concentrazioni di steroidi neuroattivi nel plasma e nel cervello, influenzando di conseguenza la plasticità del recettore GABA_A .

Recentemente, sono stati sviluppati alcuni inibitori della 5α -reduttasi con l'obiettivo di bloccare la produzione di diidrotestosterone e di bloccare l'azione di androgeni nella prostata e nella pelle [107]. Questi composti si sono mostrati efficaci nell'inibire l'attività della 5α -reduttasi *in vivo*, diminuendo marcatamente la quantità totale di androgeno prostatico e riducendo l'iperplasia prostatica. L'uso di tali agenti è stato esteso al trattamento dell'acne, irsutismo, e calvizie con alterato pattern. Infatti, molti adolescenti

e giovani adulti (specialmente femmine) affrontano ora un trattamento a lungo termine con finasteride, un 4-azasteroide, che è un inibitore competitivo potente e specifico della 5 α -reduttasi [108].

Per chiarire ulteriormente i ruoli dei neurosteroidi nella plasticità del recettore GABA_A durante la gravidanza e dopo il parto, noi abbiamo investigato gli effetti del blocco dell'attività della 5 α -reduttasi con la finasteride sulle concentrazioni di AP e THDOC così come sulla densità, funzione e struttura dei recettori GABA_A. Una singola somministrazione di questo farmaco (25 mg/kg), dissolto in una miscela di etanolo e olio di mais e iniettato sottocutaneamente nel collo, riduce in 2 ore la concentrazione di AP e THDOC sia nelle ratte in estro (circa -75% nella corteccia cerebrale e -65% nel plasma) e nelle ratte nel giorno 19 di gravidanza (circa -90% e -55%, rispettivamente). La diminuzione indotta da finasteride delle concentrazioni di AP e THDOC persiste per più di 19 ore, sebbene dopo questo tempo la concentrazione cerebrale di AP e THDOC si riporta ai valori di pretrattamento. Il maggiore effetto inibitorio della finasteride sulla concentrazioni di AP e THDOC nel cervello rispetto a quanto osservato nel plasma è in qualche modo inatteso, dal momento che questo composto possiede un'affinità maggiore per la 5 α -reduttasi di tipo 2 (presente nel tessuto steroidogenico periferico) rispetto al tipo 1 (presente nel cervello) [109]. Sebbene la 5 α -reduttasi di tipo 2 non sia stata ritrovata nel tessuto cerebrale adulto *ex vivo*, l'osservazione che l'espressione di questo isoenzima sia transientemente e androgeno-dipendentemente aumentata (cioè, l'aumento nei maschi è maggiore di quello delle femmine) nel cervello di ratto durante lo sviluppo embrionale [110], suggerisce che il marcato aumento nelle concentrazioni di certi ormoni steroidei durante la gravidanza possa influenzare l'espressione di questo isoenzima nel cervello della madre.

Per inibire permanentemente gli aumenti associati alla gravidanza di AP e THDOC, abbiamo trattato le ratte gravide giornalmente con finasteride dal giorno 12 al giorno 18. Questo trattamento riduce marcatamente gli aumenti nelle quantità di AP e THDOC, sia nella corteccia cerebrale sia nel plasma, che sono normalmente apparenti nel giorno 19 (Tab. 6). Tale trattamento con finasteride risulta anche in una apparente normalizzazione della trasmissione GABA_Aergica, come riflesso dalla prevenzione dell'aumento della densità e della costante di dissociazione dei siti di binding del ³H-flunitrazepam e ³⁵S-TBPS, e dalla diminuzione dell'effetto stimolatorio del muscimolo (5 μ M) sull'uptake di ³⁶Cl⁻ normalmente apparenti nel giorno 19 di gravidanza [30, 94]. In maniera simile, la diminuzione nella quantità di mRNA codificanti per la subunità γ 2L normalmente osservata nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo durante la gravidanza è prevenuta dal trattamento con finasteride [30, 94].

Nel loro insieme, questi dati indicano che le alterazioni nella densità, funzione e espressione genica dei recettori GABA_A che avvengono nel cervello di ratto durante la gravidanza e dopo il parto sono correlate alle fluttuazioni delle concentrazioni cerebrali di neurosteroidi. Resta da determinare se le alterazioni nella funzione ed espressione dei recettori GABA_A durante la gravidanza risultano da una azione diretta o indiretta dei neurosteroidi. L'ossidazione di AP e THDOC, che possono avvenire *in vivo*, producono

il 5 α -diidroprogesterone (5 α -DHP) e il 5 α -diidrideossicorticosterone (5 α -DHDOC), entrambi i quali si legano e attivano il recettore citosolico del progesterone [111]. Tuttavia, le alterazioni nell'espressione delle subunità del recettore GABA_A durante la gravidanza non sono probabilmente regolate dai recettori del progesterone occupato dal 5 α -DHP o dal 5 α -DHDOC. Perciò, il marcato aumento delle concentrazioni cerebrali di progesterone durante la gravidanza, che è resistente alla finasteride (Tab. 6), dovrebbe probabilmente precludere un'azione del 5 α -DHP o 5 α -DHDOC sui recettori del progesterone. Questa conclusione non esclude un'azione genomica del progesterone mediata da altre proteine regolatorie che influenzano la trascrizione dei geni che codificano le subunità del recettore GABA_A o la traduzione degli mRNA durante la gravidanza. Tuttavia, il blocco indotto dalla finasteride dell'aumento delle concentrazioni cerebrali di AP e dei cambiamenti sia nella sensibilità dei recettori GABA_A verso agonisti e dell'espressione del gene che codifica la subunità γ 2L che avvengono durante la gravidanza suggerisce che questi effetti della gravidanza sono la conseguenza di un'azione di AP su siti di legame degli steroidi localizzati sul recettore GABA_A. Infatti, studi precedenti hanno mostrato che i metaboliti del progesterone sono in grado di modulare l'espressione dei geni che codificano le subunità del recettore GABA_A con tale meccanismo [112]. In conclusione, i nostri dati dimostrano una relazione funzionale tra le fluttuazioni nelle concentrazioni cerebrocorticali di neurosteroidi e plasticità del recettore GABA_A durante la gravidanza e dopo il parto.

Tabella 6. Effetti del trattamento subcronico con finasteride sulle concentrazioni cerebrocorticali e plasmatiche di progesterone, allopregnanolone (AP), e allotetraidrideossicorticosterone (THDOC) nelle ratte in estro e durante la gravidanza^(a).

| Condizione | Corteccia cerebrale (ng/g di tessuto) | | | Plasma (ng/ml) | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Progesterone | AP | THDOC | Progesterone | AP | THDOC |
| Estro | 7,1 ± 2,5 | 3,7 ± 0,5 | 1,3 ± 0,1 | 6,8 ± 0,8 | 13,3 ± 1,2 | 8,8 ± 0,7 |
| Estro + Finasteride | 6,8 ± 3,1 | 2,0 ± 0,3 ^(b) | 0,7 ± 0,1 ^(b) | 7,3 ± 1,0 ^(b) | 7,8 ± 1,1 ^(b) | 5,1 ± 0,8 ^(b) |
| Gravidanza | 70,0 ± 8,5 | 15,9 ± 2,5 | 2,6 ± 0,4 | 58,0 ± 8,0 | 39,0 ± 3,0 | 24,9 ± 0,7 |
| Gravidanza + Finasteride | 68,6 ± 7,6 | 5,8 ± 1,4 ^(d) | 1,0 ± 0,3 ^(c) | 55,2 ± 8,5 | 22,4 ± 2,5 ^(c) | 14,2 ± 1,6 ^(d) |

^(a) Finasteride (25 mg/kg, s.c.) o la soluzione veicolo sono state iniettate giornalmente, dal giorno 12 al giorno 18 della gravidanza, i ratti sono stati sacrificati il giorno 19. I ratti in estro sono stati trattati in modo simile per 7 giorni con finasteride. I dati sono le medie ± E.S.M. dei valori ottenuti da 15 ratti.

^(b) $p < 0,05$ comparato al rispettivo valore di estro.

^(c) $p < 0,05$ comparato al rispettivo valore di gravidanza.

^(d) $p < 0,01$ comparato al rispettivo valore di gravidanza.

NEUROSTEROIDI E ESPRESSIONE GENICA DEI RECETTORI GABA_A IN CELLULE GRANULARI DEL CERVELLETTO DI RATTO IN COLTURA PRIMARIA

La modulazione selettiva operata dai neurosteroidi sulla funzione ed espressione dei recettori GABA_A nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo [30, 93] e nei neuroni magnocellulari ossitocinergici [102, 104, 106] in condizioni fisiologiche o farmacologiche come la gravidanza e la pseudogravidanza suggerisce che questi composti producono questi effetti mediante due meccanismi distinti: le variazioni rapide dell'attività dei recettori sono probabilmente mediate a livello di membrana cellulare, mentre gli effetti sull'espressione delle subunità del recettore appaiono essere mediate a livello della trascrizione genica.

Una popolazione omogenea di cellule neuronali in coltura rappresenta un utile mezzo con cui studiare la regolazione dei geni che codificano per le diverse subunità del recettore GABA_A ad opera dei neurosteroidi. Gli effetti di AP sulla funzione e farmacologia dei recettori GABA_A e sull'espressione dei geni delle subunità del recettore GABA_A sono stati esaminati in neuroni corticali di topo in coltura [88, 89]. Nel nostro laboratorio [113], abbiamo studiato la regolazione dell'espressione genica del recettore GABA_A mediante una esposizione prolungata con neurosteroidi di cellule granulari del cervelletto di ratto in coltura primaria. L'esposizione di tali cellule per 5 giorni di AP o THDOC (1 μM) induce una significativa diminuzione della quantità di mRNA per la subunità γ2L. Un trattamento simile delle cellule con progesterone (1 μM) per 5 giorni riduce la quantità di mRNA per le subunità γ2S, γ2L, α1, α3, e α5 (Tab. 7) e induce un aumento di più di 8 volte e 3 volte, rispettivamente, della quantità di AP nelle cellule e nel medium di crescita delle cellule (Tab. 8). Il progesterone non ha effetto sulle quantità di mRNA per le subunità α4, β2 o β3. Dal momento che è improbabile che il progesterone eserciti un'azione diretta sui recettori GABA_A, i suoi effetti sulle quantità di mRNA per le subunità del recettore GABA_A probabilmente risultano dalla sua conversione in AP. In accordo con questa ipotesi, il bloccante della 5α-reduttasi finasteride inibisce marcatamente l'accumulo di AP indotto dal progesterone (Tab. 8) così come la down-regulation degli mRNA per le subunità γ2L e γ2S.

Esperimenti di ibridizzazione *in situ* hanno rivelato la presenza di 5α-reduttasi sia nelle cellule neuronali sia in quelle gliali presenti nelle colture di cellule granulari di cervelletto, in accordo con la capacità delle cellule granulari di sintetizzare AP dal progesterone. Tuttavia, la sintesi di pregnenolone dal colesterolo e la presenza dell'enzima che catalizza questa reazione, il citocromo P-450_{scc}, devono ancora essere dimostrata nei neuroni.

L'astinenza da progesterone nel modello della pseudogravidanza nel ratto altera la cinetica delle correnti al Cl⁻ mediate dai recettori GABA_A in cellule ippocampali, aumenta la quantità di mRNA codificante per la subunità α4, e induce negli animali uno stato ansioso [102]. In un simile modello di astinenza da progesterone che riproduce le sindromi premenstruale e postpartum, il blocco dell'aumento astinenza-indotto del-

Tabella 7. Effetti del trattamento prolungato con progesterone sulla quantità di mRNA codificante per le subunità $\gamma 2L$, $\gamma 2S$, $\alpha 1$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$ del recettore $GABA_A$ in cellule granulari del cervelletto di ratto in coltura primaria^(a).

| Trattamento | mRNA codificante per le subunità (% del controllo) | | | | |
|--------------|----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $\gamma 2L$ | $\gamma 2S$ | $\alpha 1$ | $\alpha 3$ | $\alpha 5$ |
| Solvente | 100 ± 5 | 100 ± 2 | 100 ± 2 | 100 ± 2 | 100 ± 2 |
| Progesterone | 67 ± 3 ^(c) | 81 ± 3 ^(c) | 88 ± 3 ^(b) | 89 ± 3 ^(b) | 87 ± 2 ^(c) |

(a) Le cellule granulari in coltura primaria sono state incubate per 5 giorni consecutivi con progesterone 1 μ M o solvente (dimetil solfossido). L'RNA totale veniva estratto e gli mRNA specifici codificanti per le subunità del recettore $GABA_A$ venivano quantificati col metodo del saggio della Protezione da Rnasi. I dati sono espressi come percentuale del gruppo di controllo (solvente) e sono le medie \pm E.S.M. di 3-6 differenti esperimenti.

(b) $p < 0,05$ comparato al rispettivo controllo.

(c) $p < 0,01$ comparato al rispettivo controllo.

Tabella 8. Effetti del trattamento prolungato con progesterone in assenza o presenza di finasteride sull'accumulo di allopregnanolone (AP) nelle cellule granulari e nel medium di crescita^(a).

| Trattamento | AP (% del controllo) | |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Cellule granulari | Medium di crescita |
| Solvente | 100 ± 7 | 100 ± 5 |
| Progesterone | 866 ± 90 ^(b) | 289 ± 15 ^(b) |
| Progesterone + finasteride | 129 ± 10 ^(c) | 87 ± 7 ^(c) |

(a) Le cellule granulari sono state incubate per 5 giorni consecutivi con progesterone 1 μ M in presenza o assenza di finasteride o solvente (dimetil solfossido). Le concentrazioni di AP nelle cellule e nel medium di crescita sono state quindi determinate come descritto precedentemente [28]. I dati sono espressi come percentuale dei valori del gruppo di controllo (solvente) e sono le medie \pm E.S.M. di 3-6 diversi esperimenti.

(b) $p < 0,01$ rispetto al solvente.

(c) $p < 0,01$ rispetto al progesterone.

l'espressione della subunità $\alpha 4$ previene i sintomi associati all'astinenza [45]. Nel nostro modello delle cellule granulari di cervelletto, la sospensione dell'esposizione prolungata al progesterone (astinenza) induce un marcato e tempo-dipendente aumento della quantità di mRNA codificante per la subunità $\alpha 4$ del recettore $GABA_A$; l'effetto massimo (+31%) è apparente 6 ore dopo la sospensione del trattamento con progesterone, mentre la quantità di

mRNA per la subunità $\alpha 4$ è diminuita del 28% 24 ore dopo la sospensione.

La quantità di mRNA codificante per le subunità $\alpha 1$ e $\gamma 2L$ rimane significativamente diminuita (relativamente ai valori di controllo) 6 ore dopo la sospensione del trattamento con progesterone; dopo l'incubazione delle cellule in assenza di progesterone per 18 ore addizionali, le quantità di questi mRNA non differiscono significativamente dai valori del controllo.

Nel loro insieme, i nostri dati mostrano che l'esposizione delle cellule granulari di cervelletto di ratto ad alte concentrazioni di AP mima l'effetto che la gravidanza induce sull'espressione di specifici geni delle subunità del recettore $GABA_A$. Inoltre, in maniera simile all'azione della finasteride, quando somministrata durante la gravidanza, l'inibizione della 5α -reduttasi mediante questo farmaco e la conseguente marcata diminuzione nella concentrazione di AP nelle cellule granulari antagonizza l'effetto del trattamento cronico con progesterone sull'espressione genica del recettore $GABA_A$. In maniera simile all'effetto dell'astinenza da progesterone nel modello della pseudogavidanza, l'interruzione del trattamento prolungato con progesterone *in vitro* aumenta la quantità dell'mRNA codificante per la subunità $\alpha 4$ nelle cellule granulari. Queste osservazioni sono in accordo con l'idea che la subunità $\alpha 4$ giochi un ruolo nello sviluppo della sindrome astinenziale da progesterone e suggerisce che un simile meccanismo potrebbe contribuire allo sviluppo della dipendenza e sindrome d'astinenza associate al trattamento cronico con altri modulatori allosterici positivi dei recettori $GABA_A$. Perciò, la sintesi periferica di progesterone e la sua conversione, nel cervello, nei suoi metaboliti sono probabilmente determinanti cruciali nella regolazione delle concentrazioni cerebrali di AP. Alterazioni nella produzione di progesterone nelle gonadi o nelle ghiandole surrenali potrebbero quindi influenzare la funzione dei recettori $GABA_A$ nel cervello.

CONCLUSIONI

I dati presentati in questo capitolo suggeriscono che il neurosteroido AP giochi un importante ruolo nella modulazione fisiologica della funzione ed espressione dei recettori $GABA_A$. Le fluttuazioni fisiologiche o indotte farmacologicamente delle concentrazioni cerebrali di AP risultano in parallele e selettive alterazioni sia nell'attività sia nell'espressione delle subunità del recettore $GABA_A$.

Inoltre, l'interruzione di un trattamento prolungato di progesterone, e perciò di AP, risulta in un aumento selettivo della quantità di mRNA codificante per la subunità $\alpha 4$ nei neuroni del cervello. Dal momento che la presenza di questa subunità nei recettori ricombinanti è associata con una ridotta sensibilità a vari modulatori positivi e ad un' aumentata sensibilità ai modulatori negativi dei recettori $GABA_A$, l'espressione della subunità $\alpha 4$ potrebbe contribuire allo sviluppo sia della tolleranza che della dipendenza a farmaci ansiolitici e ipnotici. Le marcate fluttuazioni nelle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di neurosteroidi associate a condizioni fisiologiche come la gravidanza, il ciclo mestruale, la menopausa, l'invecchiamento e lo stress suggeriscono anche che alterazioni

nel ritmo fisiologico della sintesi di neurosteroidi potrebbero contribuire a disturbi mentali associati con tali condizioni. Per esempio, la marcata diminuzione nella secrezione di ormoni steroidei associata con la menopausa potrebbe determinare lo sviluppo di alcuni sintomi mentali osservati nelle donne in postmenopausa.

Ulteriori studi su queste varie condizioni fisiologiche aiuteranno a chiarire ulteriormente il ruolo dei neurosteroidi nella modulazione della funzione dei recettori GABA_A e dei comportamenti associati a tale modulazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Z.Y. HU, E. BORREAU, I. JUNG-TESTA et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 84: 8215-8219 (1987).
- [2] K. KABBADI, M. EL-ETRE, E-E-. BAULIEU et al., *Glia* 7. 170-175 (1993).
- [3] H.J. KARAVOLAS, D.R. HODGES, in: Costa E., Paul S.M., eds. *Fidia Research Foundation Symposium Series, vol. 8: Neurosteroids and brain function*. New York, Thieme, 135-145 (1991).
- [4] C. MATHUR, V.V.K. PRASAD, V.S. RAJU et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 90: 85-88 (1993).
- [5] C. CORPECHOT, J. YOUNG, M. CALVEL et al., *Endocrinology*. 133: 1003-1009 (1993).
- [6] C. LE GOASCOGNE, P. REBEL, P. GOUZOU et al., *Science*. 237: 1212-1214 (1987).
- [7] A.G. MUKHIN, V. PAPADOPOULOS, E. COSTA et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 86: 9813-9816 (1989).
- [8] A. KORNEYEV, B.S. PAN, A. POLO et al., *J. Neurochem*. 61: 1515-1524 (1993).
- [9] P. GUARNIERI, V. PAPADOPOULOS, B. PAN et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 89: 5118-5122 (1992).
- [10] M. SERRA, P. MADAU, M.F. CHESSA et al., *Br. J. Pharmacol*. 127: 177-187 (1999).
- [11] E. COSTA, A. GUIDOTTI, *Life Sci*. 49: 325-341 (1991).
- [12] P. ROBEL, I. JUNG-TESTAS, Z.Y. HU et al., in: Costa E., Paul S.M., eds. *Fidia Research Foundation Symposium Series, vol. 8: Neurosteroids and brain function*. New York, Thieme, 147-154 (1991).
- [13] F. CELOTTI, R.C. MELANGI, L. MARTINI, *Front Neuroendocrinol*. 13: 163-2215 (1992).
- [14] S.H. MELLON, C.F. DESCHEPPER, *Brain Res*. 629: 283-292 (1993).
- [15] E. ROMEO, S. CAVALLARO, A. KORNEYEV et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 267: 462-471 (1993).
- [16] D. CHENEY, D. UZUNOV, E. COSTA et al., *J. Neurochem*. 15: 4641-4650 (1995).
- [17] M.L. BARBACCIA, G. ROSCETTI, M. TRABUCCHI et al., *Eur. J. Pharmacol*. 219: 485-486 (1992).
- [18] G. ROSCETTI, C. AMBROSIO, M. TRABUCCHI et al., *Eur. J. Pharmacol*. 269: 17-24 (1994).
- [19] B.S. Mc EWEN, *Trends Pharmacol. Sci*. 12: 141-147 (1991).
- [20] S.M. PAUL, R.H. PURDY, *FASEB J* 6: 2311-2322 (1992).
- [21] J.J. LAMBERT, D. BELELLI, C. HILL-VENNING et al., *Trends Pharmacol. Sci*. 16: 295-303 (1995).
- [22] J.M. MIENVILLE, S. VICINI, *Brain Res*. 489: 190-194 (1989).
- [23] M.D. MAJEWSKA, *Prog. Neurobiol*. 38: 379-95 (1992).
- [24] M.D. MAJEWSKA, N.L. HARRISON, R.D. SCHWARTZ et al. *Science*. 232: 1004-1007 (1986).
- [25] F.S. WU, T.T. GIBBS, D.H. FARB, *Mol. Pharmacol*. 40: 333-337 (1991).
- [26] S. VALERA, M. BALLIVET, D. BERTRAND, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 89: 9949-9952 (1992).
- [27] R.H. PURDY, A.L. MORROW, P.H. JR. MOORE et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 88: 4553-4557 (1991).
- [28] M.L. Barbaccia, G. Roscetti, M. Trabucchi et al., *Neuroendocrinology*. 63: 166-172 (1996).
- [29] M.L. BARBACCIA, G. ROSCETTI, M. TRABUCCHI et al., *Br. J. Pharmacol*. 120: 1582-1588 (1997).

- [30] A. CONCAS, M.C. MOSTALLINO, P. PORCU et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 95: 13284-13289 (1998).
- [31] N.D. COMPAGNONE, S.H. MELLON, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 95: 4678-4683 (1998).
- [32] J.F. FLOOD, J.E. MORLEY, E. ROBERTS, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 89: 1567-1571 (1992).
- [33] N. ORENTREICH, J.L. BRIND, R.L. RIZER et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59: 551-555 (1984).
- [34] A. KORNEYEV, A. GUIDOTTI, E. COSTA, *J. Neurochem.* 61: 2041-2047 (1993).
- [35] G. ROSCETTI, R. DEL CARMINE, M. TRABUCCHI et al., *J. Neurochem.* 71: 1108-1117 (1998).
- [36] N.L. HARRISON, M.A. SIMMONDS, *Brain Res.* 323: 284-293 (1984).
- [37] J.L. BARKER, N.L. HARRISON, G.D. LANGE et al., *J. Physiol. (Lond)*. 377: 83P (1986).
- [38] A. CONCAS, M.C. MOSTALLINO, C. PERRA et al., *Br. J. Pharmacol.* 118: 839-846 (1996).
- [39] D.B. PRITCHETT, H. SONTHEIMER, B.D. SHIVERS et al., *Nature*. 338: 582-585 (1989).
- [40] U. GUNTER, J.A. BENSON, D. BENKE et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 92: 7749-7753 (1995).
- [41] G. PUIA, I. DUCIC, S. VICINI et al., *Receptors Channels*. 1: 135-142 (1993).
- [42] R. MAITRA, J.N. REYNOLDS, *Soc. Neurosci. Abstr.* 24: 344 (1998).
- [43] W.J. ZHU, J.F. WANG, K.E. KRUEGER, S. VICINI, *J. Neurochem.* 16: 6648-6656 (1996).
- [44] P.A. DAVIES, M.C. HANN, T.G. HALES et al., *Nature*. 385: 820-823 (1997).
- [45] S.S. SMITH, Q.H. GONG, F-C. HSU et al., *Nature*. 392: 926-930 (1998).
- [46] E.A. BARNARD, P. SKOLNICK, R.W. OLSEN et al., *Pharmacol. Rev.* 50: 291-313 (1998).
- [47] M. GASIOR, R.B. CARTER, S.R. GOLDBERG et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 543-553 (1997).
- [48] S.I. DEUTSCH, R.B. ROSSE, K. STEINBERG et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55: 323-326 (1996).
- [49] J.W. MCAULEY, I.J. REYNOLDS, F.J. KROBOTH et al., *J. Clin. Pharmacol.* 15: 3-11 (1994).
- [50] R.J. PRIMUS, D.W. GALLAGER, *Eur. J. Pharmacol.* 226: 21-28 (1992).
- [51] R.A. HOLT, AN. BATESON, I.L. MARTIN *Neuropharmacology*. 35: 1457-1463 (1996).
- [52] F. IMPAGNATIELLO, C. PESOLD, P. LONGONE et al., *Mol. Pharmacol.* 48: 822-831 (1996).
- [53] C. PESOLD, H.J. CARUNCHO, F. IMPAGNATIELLO et al., *Neuroscience*. 79: 477-487 (1997).
- [54] V.A. RAMSEY-WILLIAMS, D.B. CARTER, *Mol. Brain Res.* 43: 132-140 (1996).
- [55] E. COSTA, D.M. THOMPSON, J. AUTA et al., *CNS Drug Rev.* 1: 168-189 (1995).
- [56] S. WIELAND, J. BELLUZZI, J.E. HAWKINSON et al., *Psychopharmacology*. 134: 46-54 (1997).
- [57] T.G. KOKATE, S. YAMAGUCHI, L.K. PANNELL et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287: 553-558 (1998).
- [58] F.H. MARSHALL, S.C. TRATTON, J. MULLINGS et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58: 1-8 (1997).
- [59] A.E. CALOGERO, W.T. GALLUCCI, G.P. CHROUSOS et al. *Brain Res.* 463: 223-228 (1988).
- [60] M.J. OWENS, C.B. NEMEROFF, *Pharmacol. Rev.* 43: 425-473 (1991).
- [61] V.K. PATCHEV, A.H.S. HASSAN, F. HOLSBOER et al., *Neuropsychopharmacology*. 15: 533-540 (1996).
- [62] R.W. HORTON, G. CHAPMAN, B.S. MELDRUM, *J. Neurochem.* 33: 745-750 (1979).
- [63] M.L. BARBACCIA, G. ROSCETTI, F. BOLACCHI et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 205-210 (1996).
- [64] R.H. PURDY, A.L. MORROW, J.R. BLINN et al., *J. Med. Chem.* 33: 1572-1581 (1990).
- [65] A.L. GUO, F. PETRAGLIA, M. CRISCUOLO et al., *Gynecol. Endocrinol.* 9: 1-7 (1995).
- [66] P.T. NINAN, T.M. INSEL, R.M. COHEN et al., *Science*. 218: 1332-1334 (1982).
- [67] R. DOROW, R. HOROWSKI, G. PASCHELKE et al., *Lancet*. 41: 98-99 (1983).
- [68] M.G. CORDA, W.D. BLAKER, W.B. MENDELSON et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 80: 2072-2076 (1983).
- [69] D.N. STEPHENS, H.H. SCHNEIDER, W. KEHZ et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 334-343 (1990).

- [70] G. BIGGIO, A. CONCAS, M.G. CORDA et al., *Pharmacol. Ther.* 48: 121-142 (1990).
- [71] S.W. WOODS, D.S. CHARNEY, J. LOKE et al., *Arch. Gen. Psychiatry.* 43: 900-909 (1986).
- [72] E. SANNA, T. CUCCHEDDY, M. SERRA et al., *Eur. J. Pharmacol.* 216: 457-458 (1992).
- [73] M.L. BARBACCIA, G. ROSCETTI, M. TRABUCCHI et al., *Neuropharmacology.* 35: 1299-1305 (1996).
- [74] C. RIVIER, W. VALE, *Endocrinology.* 121: 1320-1328 (1987).
- [75] M.R. IRWIN, R.L. HAUGER, *Neuropsychopharmacology.* 1: 239-242 (1988).
- [76] R.L. HAUGER, M. LORANG, M. IRWIN et al., *Brain Res.* 532: 34-40 (1990).
- [77] V. PARKER, A. MORIMAN, *Neuropharmacology.* 25: 663-664 (1986).
- [78] A. MORIMAN, V. PARKER, *Br. J. Pharmacol.* 86: 460 (1985).
- [79] L.A. HILAKIVI, M. OTA, R.G. LISTER, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33: 371-374 (1989).
- [80] N. WONGWITDECHA, C.A. MARDSEN, *Behav. Brain Res.* 75: 27-32 (1996).
- [81] K. MATSUMOTO, V. UZUNOVA, G. PINNA et al., *Soc. Neurosci. Abstr.* 24: 346 (1998).
- [82] M. SERRA, M. CADDEO, M.F. CHESSA et al., *Soc. Neurosci. Abstr.* 24: 346 (1998).
- [83] G.J. KANT, T. EGGLESTON, L. LANDMAN-ROBERTS et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22: 631-634 (1985).
- [84] H. HAVOUNDJIAN, S.M. PAUL, P. SKOLNICH, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237: 787-793 (1986).
- [85] A. EICHINGER, W. SIEGHART, *J. Neurochem.* 46: 173,180 (1986).
- [86] A. CONCAS, S. PEPITONI, T. ATSOGGIU et al., *Life Sci.* 43: 1761-1771 (1988).
- [87] M.N. TITULAER, W. KAMPHUIS, F.H. LOPEZ DA SILVA, *Neuroscience.* 68: 399-406 (1995).
- [88] R. YU, P. FOLLESA, M.K. TICKU, *Mol. Brain Res.* 41: 163-168 (1996).
- [89] R. YU, M.K. TICKU, *Mol. Pharmacol.* 47: 603-610 (1995).
- [90] A.M. COSTA, K.Y. SPENCE, S.S. SMITH et al., *J. Neurophysiol.* 74: 464-469 (1995).
- [91] T.F. PUGH, B.K. JERATH, W.M. SMITH et al. *N. Engl. J. Med.* 268: 1224-1228 (1963).
- [92] G.E. ROBINSON, D.E. STEWART, *Can. Med. Ass. J.* 134: 31-37 (1986).
- [93] P. FOLLESA, S. FLORIS, G. TULIGI et al., *Eur. J. Neurosci.* 10: 2905-2912 (1998).
- [94] A. CONCAS, P. FOLLESA, M.L. BARBACCIA et al., *Eur. J. Pharmacol.* 375: 225-235 (1999).
- [95] V. UZUNOVA, Y. SHELINE, J.M. DAVIS et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 95: 3239-3244 (1998).
- [96] T.M. PENNING, R.B. SHARP, N.R. KRIEGER, *J. Biol. Chem.* 260: 15266-15272 (1985).
- [97] M.D. MAJEWSKA, F. FORD-RICE, G. FALKAY, *Brain Res.* 482: 397-401 (1989).
- [98] R. WEIZMAN, E. DAGAN, S.H. SNYDER et al., *Brain Res.* 752: 307-314 (1997).
- [99] M. GAVISH, A. WEIZMAN, M.B.H. YODIM et al., *Brain Res.* 409: 386-390 (1987).
- [100] M. CANONACO, L.H. O'CONNOR, D.W. PFAFF et al., *Exp. Brain Res.* 77: 407-411 (1989).
- [101] A. JUSSOFIE, I. KORNER, C. SCHELL et al., *Exp. Clin. Endocrinol.* 103: 196-204 (1995).
- [102] S.S. SMITH, Q.H. GONG, X. LI et al., *J. Neurochem.* 18: 5275-5284 (1998).
- [103] A.L. HORNE, P.C. HARKNESS, K.L. HADINGHAM et al., *Br. J. Pharmacol.* 108: 711-716 (1993).
- [104] A.B. BRUSSARD, K.S. KITS, R.E. BAKER et al., *Neuron.* 19: 1103-1114 (1997).
- [105] E. SIGEL, R. BAUR, G. TRUBE et al., *Neuron.* 5: 703-711 (1990).
- [106] V.S. FENELON, A.E. HERBISON, *J. Neurosci.* 16: 4872-4880 (1996).
- [107] W. CHEN, C.C. ZOUBOULIS, C.E. ORFANOS, *Dermatology.* 193: 177-184 (1994).
- [108] R.S. RITTMASER, *N. Engl. J. Med.* 330: 120-125 (1994).
- [109] B. AZZOLINA, K. ELLSWORTH, S. ANDERSSON et al., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61: 55-64 (1997).
- [110] A. POLETTI, P. NEGRI-CESI, M. RABUFFETTI et al., *Endocrinology.* 139: 2171-2178 (1998).
- [111] R. RUPPRECHT, J.M.H.M. REUL, T. TRAPP et al., *Neuron.* 11: 523-530 (1993).
- [112] N.G. WEILAND, M. ORCHINIK, *Mol. Brain Res.* 32: 271-278 (1995).