



**SITOX**

# 20° Congresso Nazionale

Società Italiana di Tossicologia

**Sostanze  
di origine naturale:  
farmaci, veleni o entrambi**

**BOLOGNA** 25-26-27 Ottobre 2021

[www.sitox.org](http://www.sitox.org)

I RECETTORI AMPA CALCIO PERMEABILI COME POSSIBILE  
TARGET TERAPEUTICO NELLA NEUROTOSSICITÀ DA ASTINENZA DA ETANOLO:  
STUDI PRECLINICI IN FETTINE IPPOCAMPALI DI RATTO.

Elisabetta Gerace PhD

Dipartimento of Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino  
Sezione di Farmacologia e Tossicologia  
Università degli Studi di Firenze



## Drunkennes Is a Disease and Can be Cured.

It is now a well-known fact to the medical fraternity and the laity, that Drunkenness is a disease of the entire nervous system, and it is curable, the same as any other malady.

We have at very great expense, discovered a SURE and INFALLIBLE cure for this curse, having found it by many years of constant study and research. This treatment is not to be compared with the worthless quack cures advertised at so much per package, or "Free," &c. It is a different matter from all this to perfect a course of thorough, special treatment that

WILL REALLY DO THE WORK AND CURE

forever. This remedy can be given with or without the knowledge of the patient, and can be placed in any food or liquids that the person uses. It is PERFECTLY HARMLESS.

We have and are curing thousands, and we have thousands of grateful testimonial letters on file, speaking of the wonderful cures through the means of this remarkable remedy. WE PAY 500 DOLLARS FOR ANY CASE THAT WE CANNOT CURE. 87,000 used our cure during 1902, and we have yet to hear of one that was not perfectly satisfied. WE WANT THE WORST CASES ONLY. If yours is the worst case, by all means write at once, and save the downfall. All correspondence is held sacredly confidential, no names of patients being published or made public without written consent. Consultation FREE. All correspondence and packages without name and marks to indicate contents.

OVER THIRTY YEARS A CONQUEROR OF DISEASE.

### Treatment and Medicines only 21/-

Send us complete history of case: age, amount drunk a day, what kind of drink, weight of person, how long drinking, &c., together with 21/-, and we will send all necessary medicines, directions, &c., leaving you in position to commence treatment at once.

FREE BOOK! FREE BOOK! FREE BOOK!

Dr. Saunders' latest treatise on the causes, various types, successful treatment of the Liquor habit, "A CURSE AND ITS CURE," mailed free in a plain, sealed envelope, to any address for 1/- in stamps to pay the cost of postage. Remember postage to U.S. is 24d., and all letters must be fully prepaid. Address:

**Dr. W. H. SAUNDERS & Co.,**

Box 1453, Englewood Sta., CHICAGO, ILL., U.S.A.

1904 pubblicità che descrive l'alcolismo come una malattia

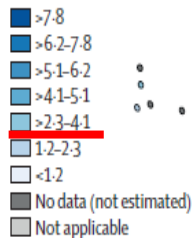


Global status report on alcohol and health 2018



World Health Organization

Percentage of deaths attributable to alcohol



- 208 milioni di alcolisti nel mondo
- 3 milioni di morti per cause correlate all'alcol
- 76.3 milioni di persone affette da Disordini legati all'uso dell'alcol(AUD)



## Farmaci per il disturbo da uso di etanolo

## Farmaci per l'astinenza

Medication	Typical Single Dose	FDA-Approved for AWS	Common Adverse Effects
<b>Benzodiazepines</b>			
Alprazolam	0.5-1.0 mg	No	Sedation, fatigue, ataxia, respiratory depression, retrograde amnesia, dependence and abuse
Chlordiazepoxide	25-50 mg	Yes	
Diazepam	10 mg	Yes	
Lorazepam	2 mg	No	
Oxazepam	15-30 mg	Yes	
<b>Anticonvulsants</b>			
Carbamazepine	600-800 mg	No	Dizziness, ataxia, diplopia, nausea, vomiting
Gabapentin	300-600 mg	No	
Oxcarbazepine	450-900 mg	No	
Valproic acid	1,000-1,200 mg	No	
Baclofen	10 mg	Yes	
Atenolol	50-100 mg	Yes	fatigue, dizziness, depression
Clonidine	0.2 mg	Yes	Nausea, dizziness, depression

## Farmaci anti craving

Disulfiram (Antabuse) Calcium Carbimide	ALDH blockers	May also have efficacy for reducing cocaine use
Naltrexone (ReVia, Vivitrol) Nalmefene	Opioid antagonists	
Acamprosate (Campral)	Glutamate stabilization	Reduction of protracted withdrawal?
Ondansetron	Serotonin-3-receptor Antagonist	May be effective in an older subset of alcoholic population
Topiramate (Topamax)	Dopamine inhibition Glutamate stabilization	Reward Reduction Reduction of protracted withdrawal?

L'effetto complessivo di questi farmaci è:  
Disintossicazione, sedazione, riduzione delle recidive,  
riduzione degli effetti piacevoli o  
riduzione delle ricadute durante il consumo di alcol

Nuovi e più specifici farmaci per  
i disturbi da uso di alcol sono un'esigenza clinica



## La Dipendenza e l'Astinenza da Etanolo sono associati a:

- **Compromissione della trasmissione sinaptica eccitatoria**

Varodayan et al., 2017-2018  
Wang et al., J of Neurosci 2012  
Puglia and Valenzuela, Alcohol 2009  
Lack et al., J Neurophysiol 2007

- **Cambiamenti nella composizione delle subunità dei recettori del glutammato**

Cristian et al., Neuropharmac 2012  
Wang et al., J of Neurosci. 2012  
Wu et al., J Neurochem. 2010

- **Morte neuronale**

Zhao et al., Behav Brain Res. 2013  
Harris et al., Alcohol Clin Exp Res. 2003  
Obernier et al., Alcohol Clin Exp Res. 2002



ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH

Vol. 40, No. 4  
April 2016

## Ethanol Toxicity During Brain Development: Alterations of Excitatory Synaptic Transmission in Immature Organotypic Hippocampal Slice Cultures

Elisabetta Gerace, Elisa Landucci, Arianna Totti, Daniele Bani, Daniele Guasti, Roberto Baronti, Flavio Moroni, Guido Mannaioni, and Domenico E. Pellegrini-Giampietro

## Glutamate Receptor-Mediated Neurotoxicity in a Model of Ethanol Dependence and Withdrawal in Rat Organotypic Hippocampal Slice Cultures

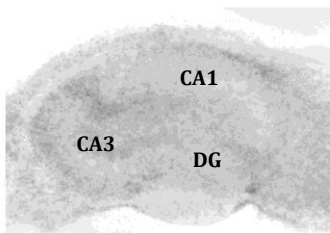
Elisabetta Gerace<sup>1,2\*</sup>, Elisa Landucci<sup>1</sup>, Daniele Bani<sup>3</sup>, Flavio Moroni<sup>2</sup>, Guido Mannaioni<sup>2</sup> and Domenico E. Pellegrini-Giampietro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Section of Clinical Pharmacology and Oncology, Department of Health Sciences, University of Florence, Florence, Italy,

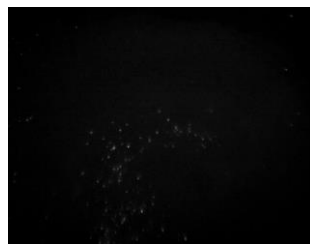
<sup>2</sup> Section of Pharmacology and Toxicology, Department of Neuroscience, Psychology, Drug Research and Child Health (NeuroFarBa), University of Florence, Florence, Italy, <sup>3</sup> Research Unit of Histology and Embryology, Section of Anatomy and Histology, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Florence, Italy



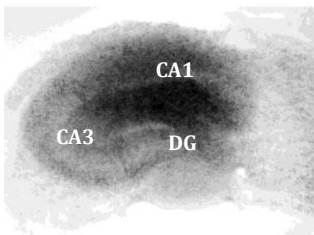
## Colture organotipiche ippocampali di ratto



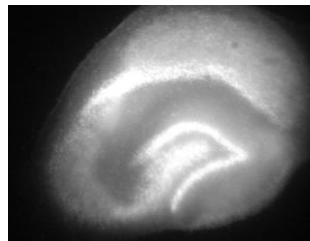
Controllo



Controllo



Tossicità

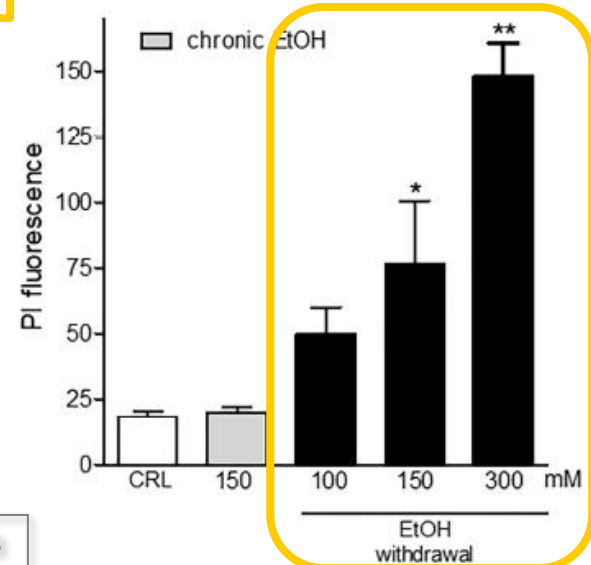
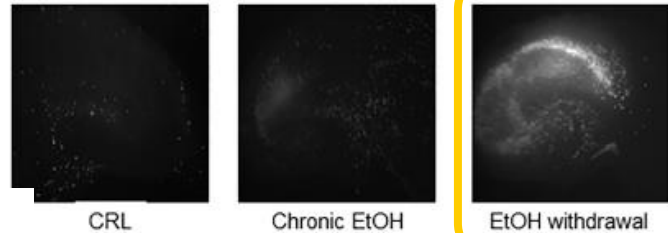
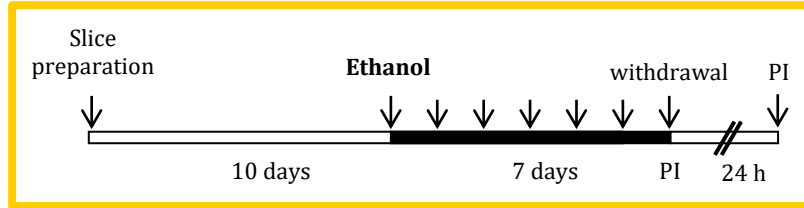


Tossicità

- **Fettine ippocampali** ottenute da ratti di 7-9 giorni e mantenute in coltura in filtri Millicell-CM per 10-15 giorni;
- Modello *in vitro* per applicare stimoli tossici e studiare i meccanismi e gli effetti dei farmaci;
- La **morte cellulare** è quantificata attraverso la misurazione dell'intensità di fluorescenza dello Ioduro di Propidio (PI);

Gerace et al., 2012 Methods Mol Biol.;846:343-54.

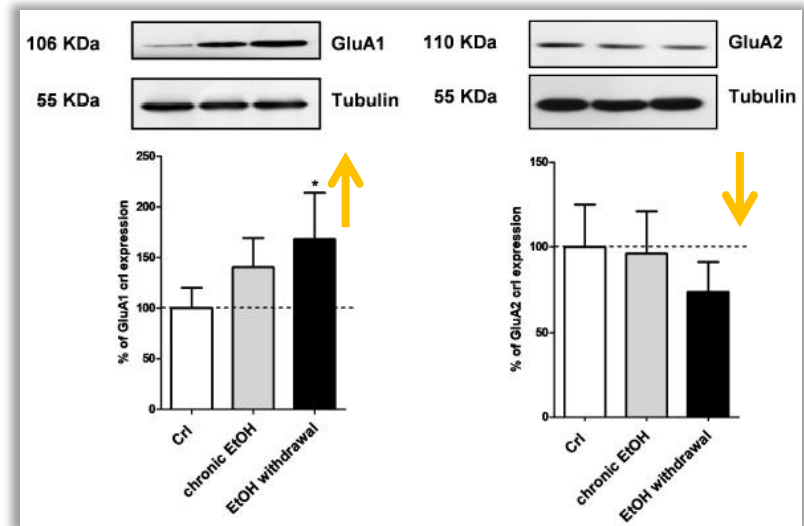
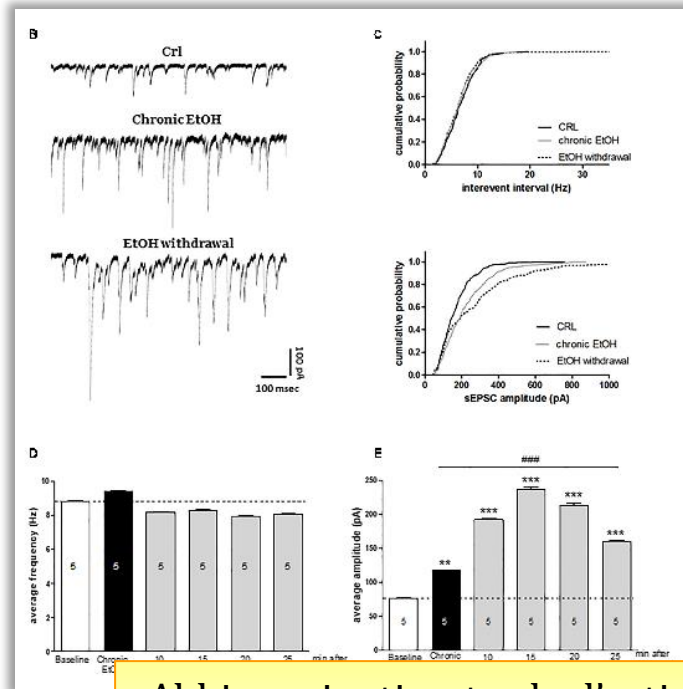
## L'astinenza da etanolo induce morte cellulare in fettine organotipiche mature di ippocampo



Gerace et al., Front Neurosci. (2019), 12, 1053



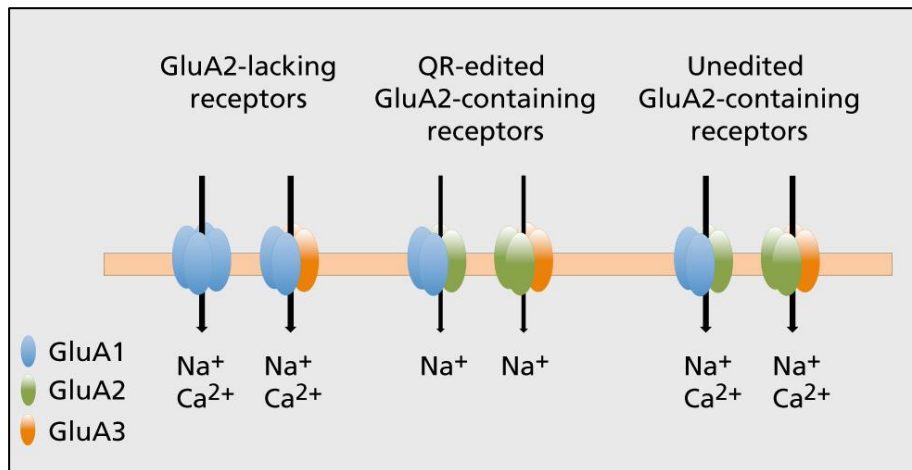
## La neurotossicità da astinenza da Etanolo è mediata dai recettori AMPA



Abbiamo ipotizzato che l'astinenza da etanolo possa portare alla formazione di canali AMPA permeabili al  $Ca^{2+}$  (Neurosci. (2019), 12, 1053)

## Recettori AMPA

- **Recettore** transmembrana **ionotropi** del glutammato che media la **neurotrasmissione sinaptica veloce**
- Composto da **quattro subunità** (GluA1, GluA2, GluA3 and GluA4) che si combinano per formare tetrameri
- La maggior parte degli AMPAR sono eterotetrameric, costituiti da dimeri 'simmetrici' di GluA2 e GluA1, GluA3 o GluA4

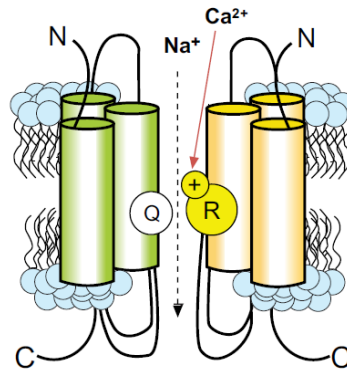


## Recettori AMPA $\text{Ca}^{2+}$ -permeabili

La presenza o l'assenza della subunità GluA2 ha un profondo impatto su assemblaggio, trafficking e selettività ionica del recettore AMPA

**GluA2 containing** AMPARs  
are  $\text{Ca}^{2+}$ -impermeable

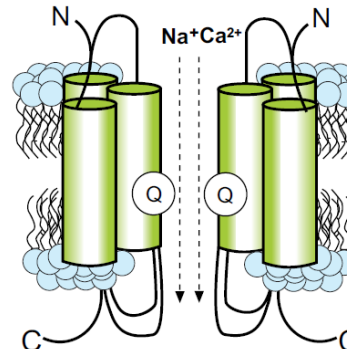
GluA1      GluA2



Calcium-impermeable

**GluA2-lacking** AMPARs are  
 $\text{Ca}^{2+}$ -permeable

GluA1      GluA1



Calcium-permeable

**SCOPO**

Studiare il ruolo dei recettori AMPA Ca<sup>2+</sup>-permeabili nella tossicità indotta dall'astinenza da Etanolo

*Experimental Plan:***STEP 1**

Expression levels  
of AMPAR subunits

**STEP 2**

Surface localization  
and trafficking

**STEP 3**

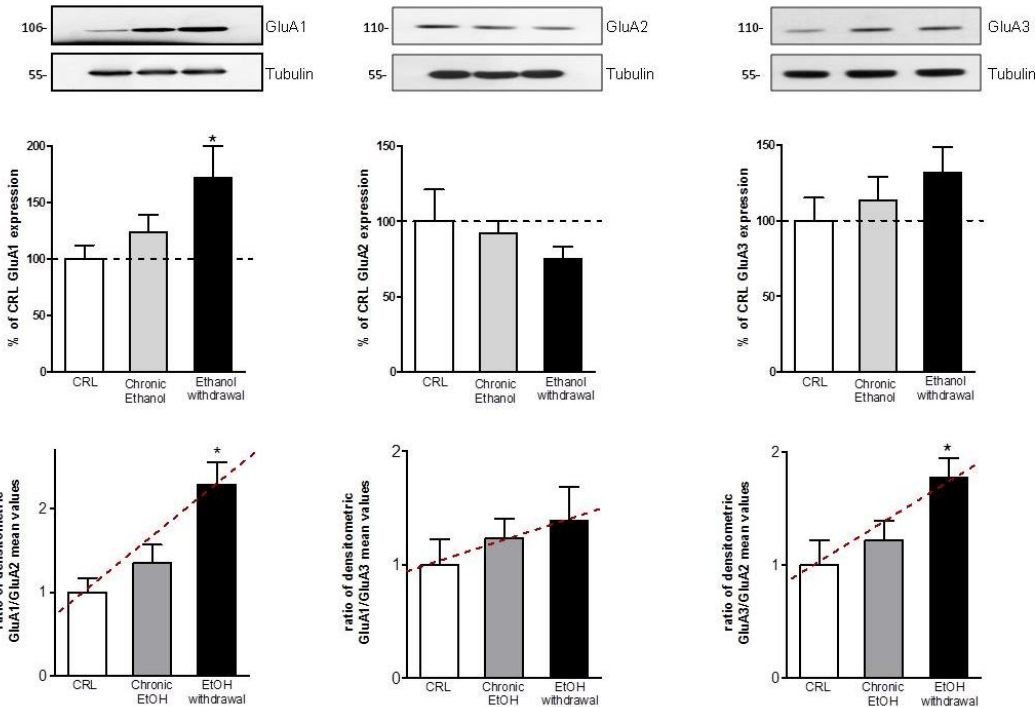
Functional properties





# L'astinenza da etanolo induce cambiamenti nella composizione in subunità dei recettori AMPA, portando alla formazione di canali privi della subunità GluA2

STEP 1



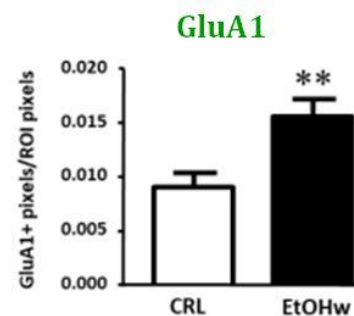
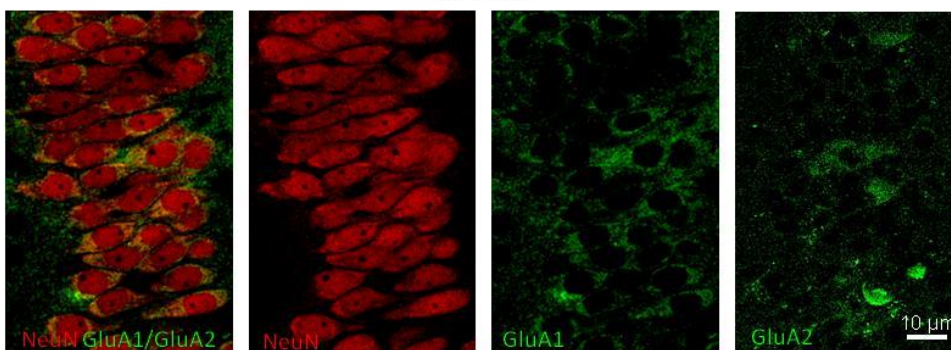
## Immunofluorescenza e microscopia confocale



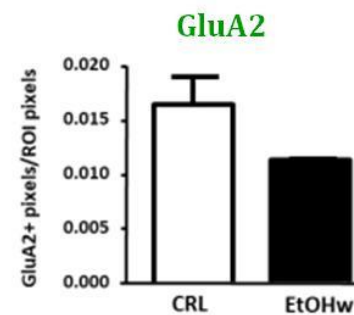
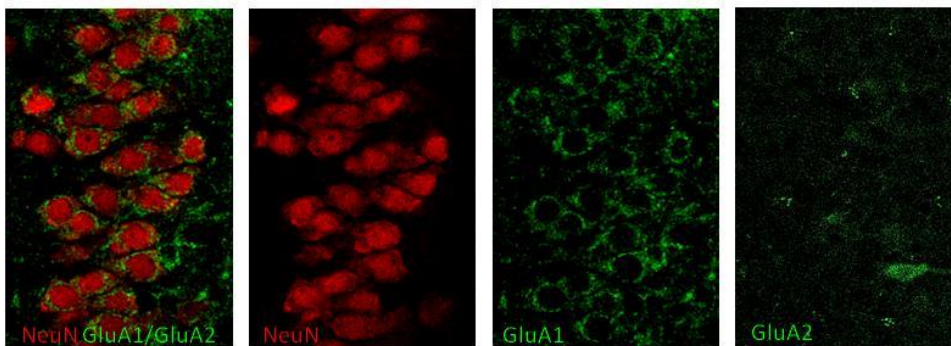
Daniele Lana

STEP 1

Control



EtOH withdrawal



**SCOPO** Studiare il ruolo dei recettori AMPA Ca<sup>2+</sup>-permeabili nella tossicità indotta dall'astinenza da Etanolo

*Experimental Plan:*

*Conclusions*

**STEP 1**

Expression levels  
of AMPAR subunits



Ethanol withdrawal leads to the formation of  
GluA2-lacking AMPA receptors  
(homotetrameric GluA1/GluA1 and/or  
heterotetrameric GluA1/GluA3)

**STEP 2**

Surface localization  
and trafficking

**STEP 3**

Functional properties



## SCOPO

Studiare il ruolo dei recettori AMPA  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabili nella tossicità indotta dall'astinenza da Etanolo

*Experimental Plan:*

STEP 1

Expression levels  
of AMPAR subunits

STEP 2

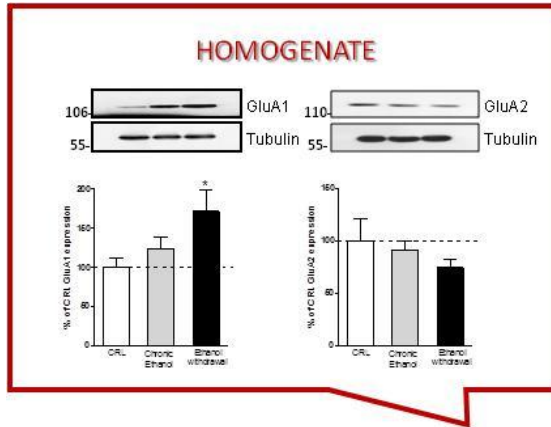
Surface localization  
and trafficking

STEP 3

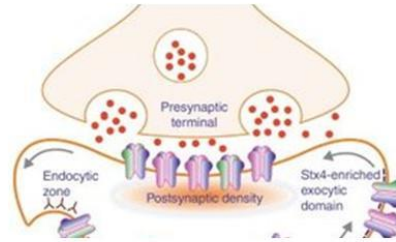
Functional properties



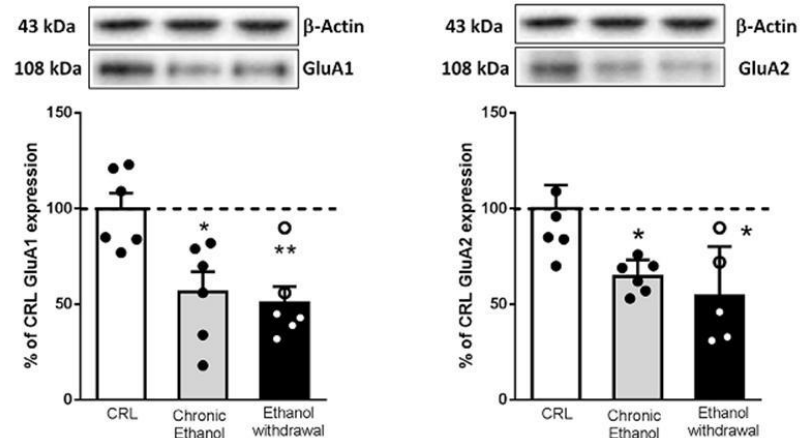


I recettori AMPA nelle densità post sinaptiche (**PSD**) dopo etanolo cronico e astinenza

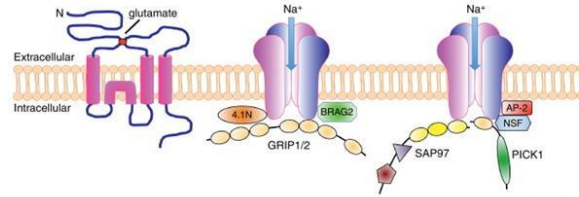
## Post Synaptic Densities



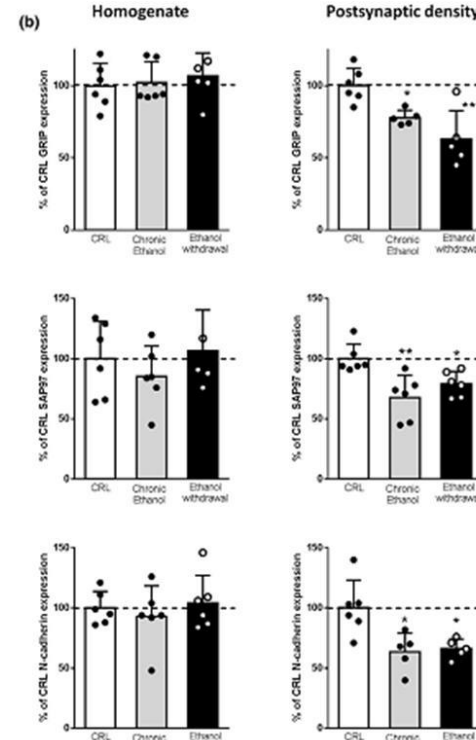
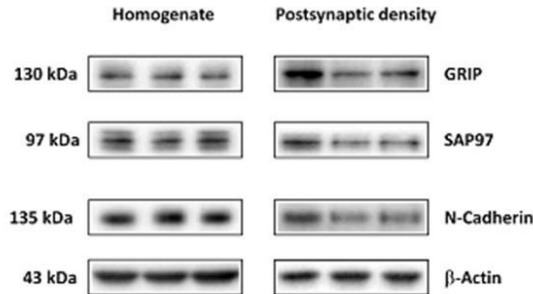
Lucia Caffino



## Trafficking dei recettori AMPA dopo etanolo cronico e astinenza



(a)



**SCOPO** Studiare il ruolo dei recettori AMPA Ca<sup>2+</sup>-permeabili nella tossicità indotta dall'astinenza da Etanolo

*Experimental Plan:*

*Conclusions*

STEP 1

Expression levels  
of AMPAR subunits

Ethanol withdrawal leads to the formation of  
GluA2-lacking AMPA receptors  
(homotetrameric GluA1/GluA1 and/or  
heterotetrameric GluA1/GluA3)

STEP 2

Surface localization  
and trafficking

Ethanol withdrawal induces alteration in  
trafficking and relocalization of AMPARs  
(extrasynaptic membranes, vesicles, ER network)

STEP 3

Functional properties



## SCOPO

Studiare il ruolo dei recettori AMPA Ca<sup>2+</sup>-permeabili nella tossicità indotta dall'astinenza da Etanolo

*Experimental Plan:*

STEP 1

Expression levels  
of AMPAR subunits

STEP 2

Surface localization  
and trafficking

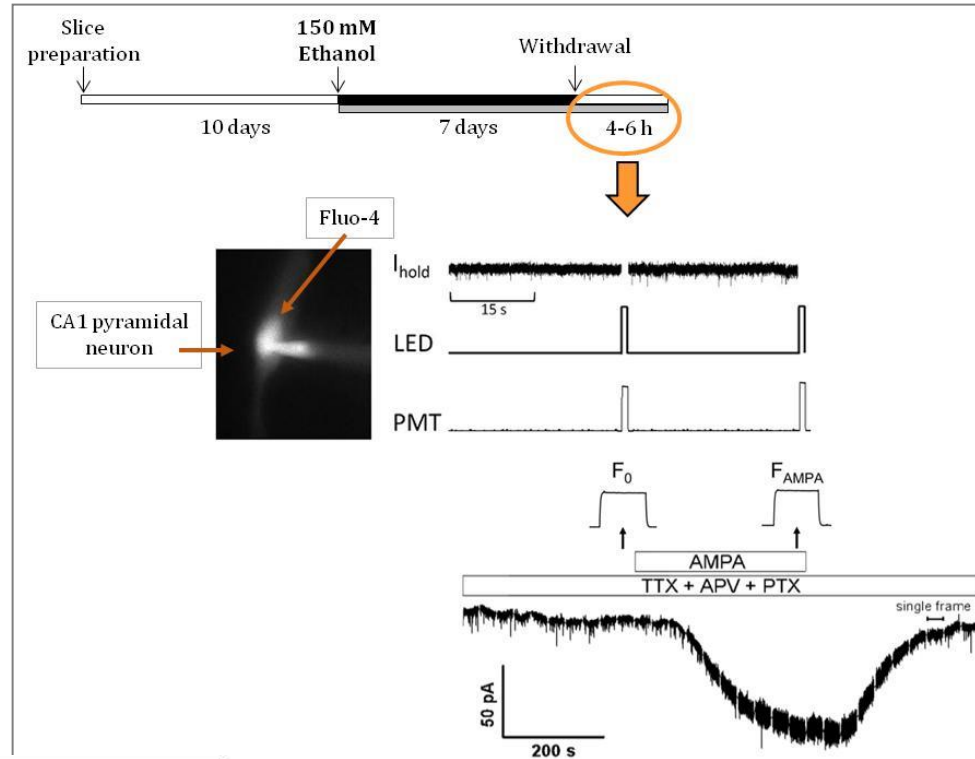
STEP 3

Functional properties





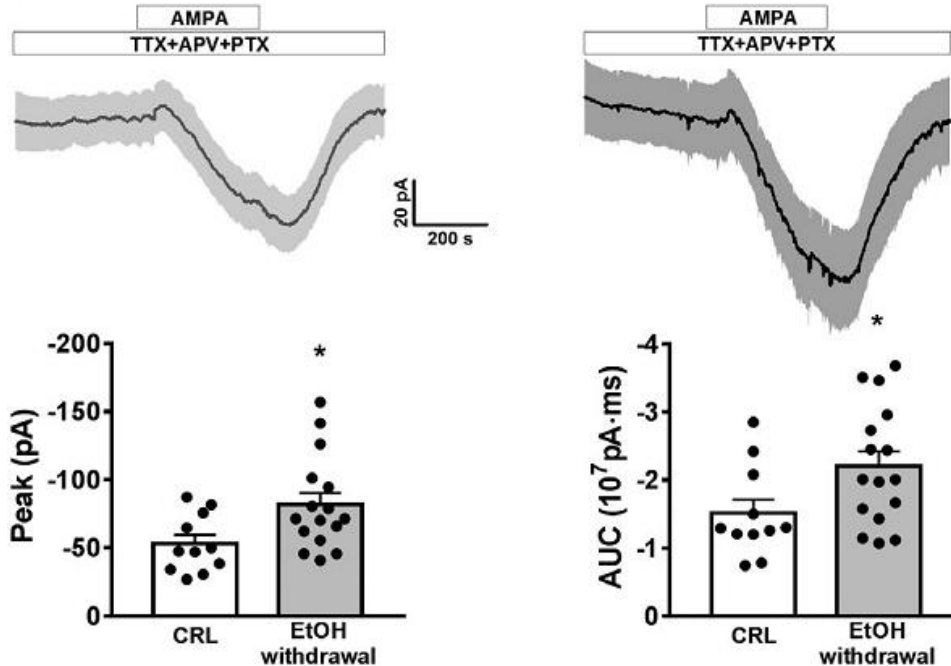
## Protocolli sperimentali per le risposte elettrofisiologiche e di fluorescenza del calcio indotte dalla stimolazione degli AMPA in fette organotipiche di ippocampo



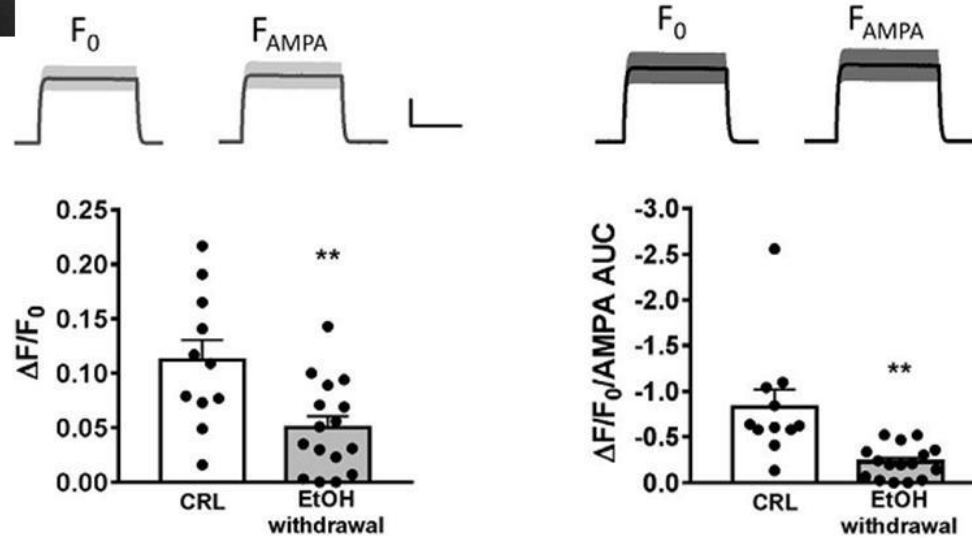
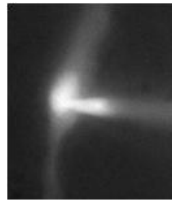
## L'astinenza da etanolo aumenta le correnti indotte dall'AMPA nelle fette organotipiche di ippocampo



Alice Ilari



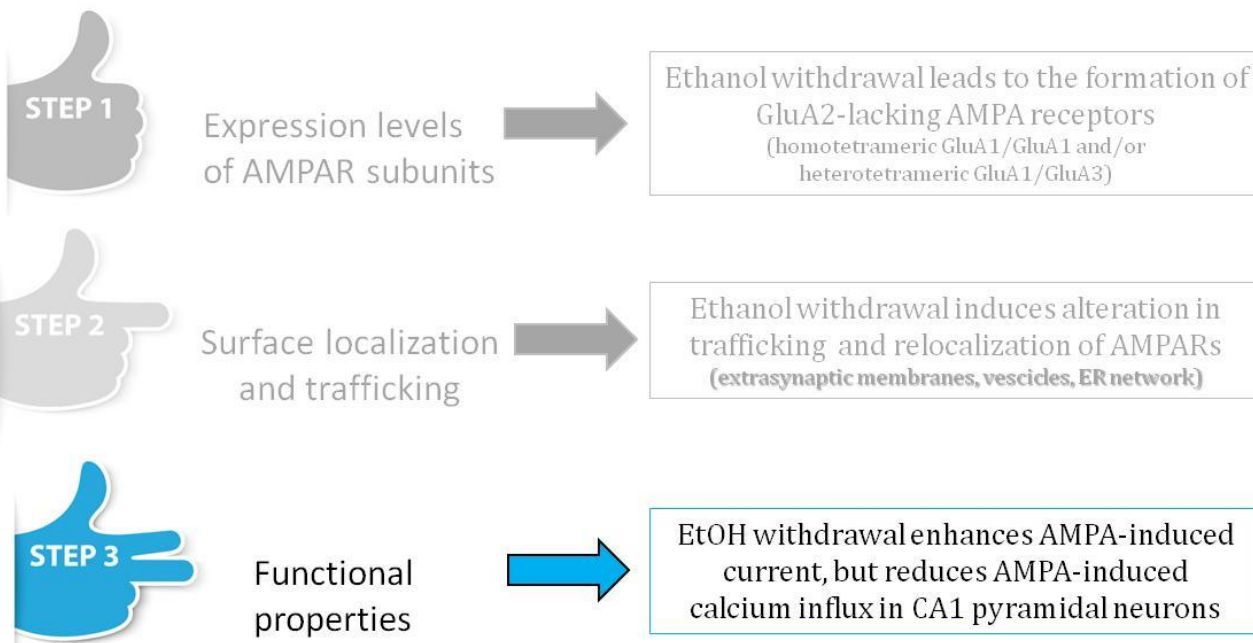
## L'ingresso di calcio mediato dai recettori AMPA è ridotto dall'astinenza dall'etanolo nelle fettine organotipiche ippocampali di ratto



**SCOPO** Studiare il ruolo dei recettori AMPA Ca<sup>2+</sup>-permeabili nella tossicità indotta dall'astinenza da Etanolo

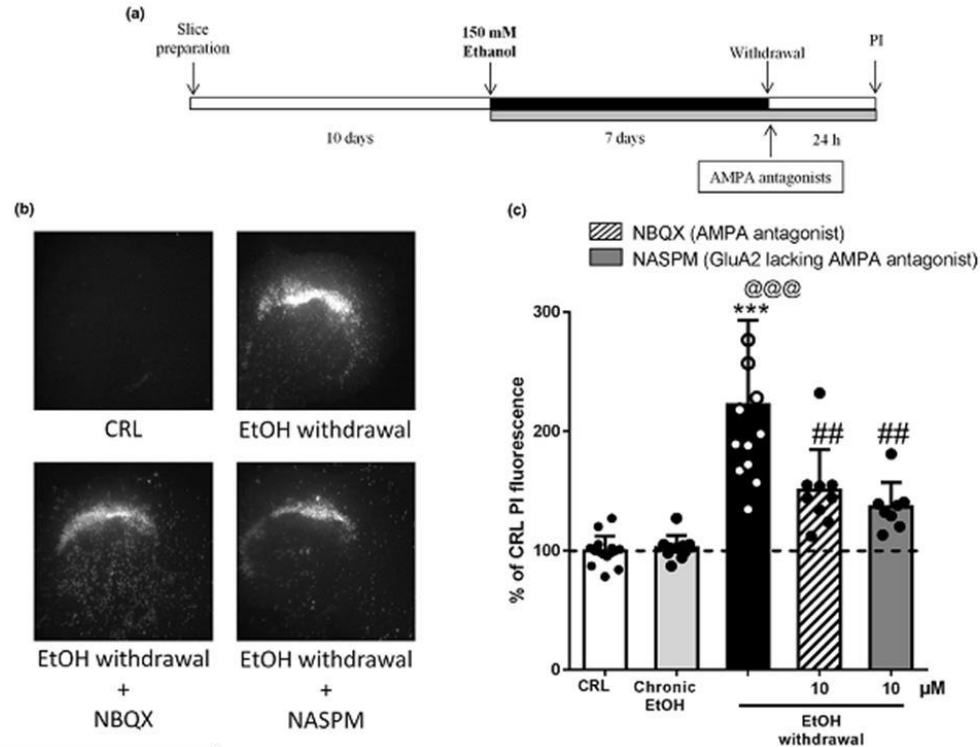
*Experimental Plan:*

*Conclusions*





## Effetto neuroprotettivo dell'antagonista selettivo dei recettori AMPA Ca<sup>2+</sup>-permeabili N-acetyl spermina (NASPM), sulla tossicità indotta dall'astinenza da etanolo

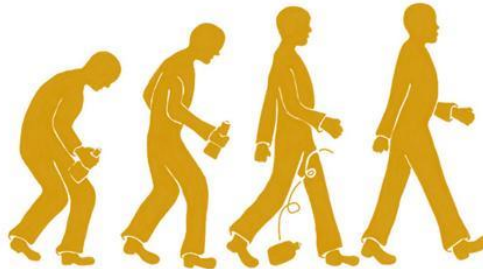




*\*Take  
home message*

L'astinenza da etanolo porta alla formazione di recettori AMPA privi della subunità GluA2, che sono mediatori della neurotossicità da etanolo.

Proponiamo i recettori AMPA privi della subunità GluA2 come specifici bersagli terapeutici per lo sviluppo di farmaci neuroprotettivi nella sindrome da astinenza da etanolo.



## Grazie a ....



Prof. Guido Mannaioni  
Alessio Masi  
Alice Ilari



Prof. Domenico Pellegrini-Giampietro  
Prof. Maria Grazia Giovannini  
Daniela Buonvicino  
Daniele Lana



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI MILANO



Prof. Fabio Fumagalli  
Lucia Caffino

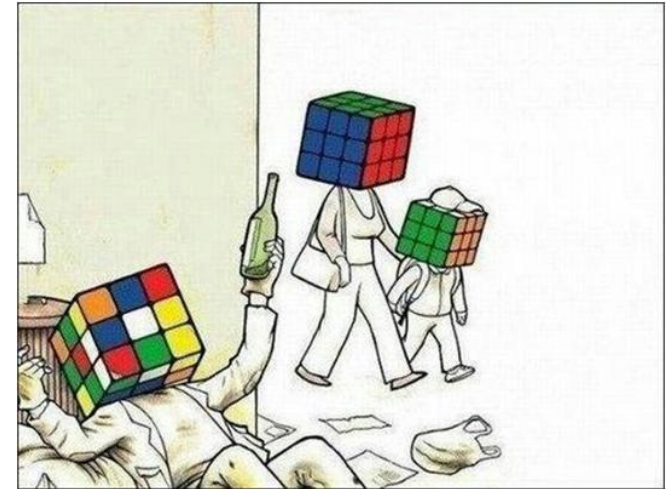


UNIVERSITÀ  
DI CAMERINO

Prof. Roberto Ciccocioppo



Italian Zardi-Gori  
Foundation for Addiction Research



Grazie a voi per il vostro  
tempo e per la vostra  
attenzione