



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Scuola di Dottorato in Neuroscienze

Ciclo **XXVII**

**Effetto nell'auto-somministrazione dell'agonista
sintetico del recettore cannabinoide CB₁, WIN 55,212-2,
nel modello animale di depressione della bulbectomia
olfattoria (OBX)**

BIO/14-FARMACOLOGIA

Presentata da: Valentina Giugliano

Coordinatore Dottorato: Prof. Walter Fratta

Tutor: Dott.ssa Liana Fattore

Esame finale Anno Accademico 2013–2014

Sommario

Introduzione.....	1
Consumo di sostanze d'abuso e disordini psichiatrici	1
Comorbidità tra depressione e uso di cannabis	3
Il sistema endocannabinoide	5
Coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella depressione	9
Sistema serotoninergico e abuso di sostanze: focus sul recettore 5-HT _{1B}	13
Test comportamentali per la valutazione delle proprietà antidepressive di un farmaco nell'animale di laboratorio	15
Modelli animali di depressione	19
La Bulbectomia olfattoria come modello animale di depressione	25
Il bulbo olfattivo.....	25
L'epitelio olfattivo	31
La trasduzione olfattiva.....	33
Scopo dello studio.....	36
Materiali e Metodi.....	38
Animali	38
Farmaci e Trattamenti.....	38
La bulbectomia olfattoria (OBX).....	40
Test della preferenza al saccarosio	41
Test di attività motoria.....	42
Preparazione chirurgica per l'auto-somministrazione endovenosa di farmaco	43

Auto-somministrazione endovenosa di farmaco	44
Procedure chirurgiche e sperimentali per la microdialisi celebrale in vivo	47
Trattamento cronico passivo di WIN	48
Studi di autoradiografia [³ H]CP-55,940	49
Analisi delle immagini	50
Analisi Statistica.....	51
Risultati.....	52
Caratterizzazione del fenotipo depressivo-simile	52
Auto-somministrazione endovenosa cronica di WIN 55,212-2.....	55
Effetto del pre-trattamento acuto con CGS-12066B sull'auto-somministrazione di WIN	60
Misurazione dei livelli di dopamina nella shell del nucleus accumbens nei ratti OBX e SHAM.....	62
Effetto del trattamento cronico passivo con WIN 55,212-2	64
Studi di autoradiografia [³ H]CP-55,940	67
Discussione.....	69
Auto-somministrazione di WIN in ratti OBX e SHAM	69
Effetto della stimolazione acuta del recettore 5-HT _{1B} durante l'auto-somministrazione di WIN	73
Effetto di una infusione endovenosa di WIN sul rilascio di dopamina nella shell del nucleus accumbens nei ratti OBX.....	74
Referenze bibliografiche.....	79

Introduzione

Consumo di sostanze d'abuso e disordini psichiatrici

Il consumo di sostanze d'abuso e la dipendenza da droghe sono fenomeni spesso associati ad un disturbo psichiatrico. Questa associazione diventa sempre più oggetto d'interesse in campo scientifico e per coloro che si occupano di tossicodipendenza ed alcolismo. In passato i disturbi psichiatrici dei tossicodipendenti venivano facilmente liquidati come semplici conseguenze dell'assunzione delle sostanze psicoattive. Tuttavia, negli ultimi tempi una mole crescente di evidenze mostra come tra le due condizioni vi siano rapporti che possono essere di automedicazione, di causalità o di semplice associazione a seconda che il disturbo psichiatrico preceda, consegua o semplicemente si associ all'utilizzo di sostanze (Ruonsaville e Luthar, 1993).

Questo tipo di comorbidità, spesso sottovalutata e nota anche come «diagnosi doppia», è stata definita nel 1995 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come la «coesistenza nel medesimo individuo di un disturbo dovuto al consumo di sostanze psicoattive e di un altro disturbo psichiatrico». Si possono individuare due gruppi principali di consumatori di sostanze stupefacenti affetti da comorbidità, ognuno dei quali con un profilo ben preciso. Un gruppo è costituito principalmente da persone affette da malattie psichiatriche che in maniera più o meno regolare fanno uso di sostanze, mentre il secondo gruppo è caratterizzato prevalentemente da tossicodipendenti che manifestano sintomi psichiatrici di diversa natura e severità. Oggi in Europa circa il 30-50% dei pazienti psichiatrici soffre non solo di disturbi mentali, ma anche di quelli

derivanti dal consumo di diverse sostanze, principalmente alcool, sedativi o cannabis (Bakken et al., 2003). Tra i pazienti ospitati nei centri di disintossicazione, la comorbidità può esprimersi in maniera diversa, ma spesso il consumo di eroina, anfetamine o cocaina si unisce ad uno o più disturbi della personalità, seguiti da diagnosi di depressione, ansia e, in misura minore, da disturbi psicotici. La manifestazione concomitante di disturbi della personalità e di abuso di droghe è stata descritta soltanto di recente nella popolazione generale. Negli Stati Uniti, una indagine epidemiologica nazionale su abuso di alcool e condizioni ad esso associate ha stabilito una netta correlazione tra disturbi dovuti al consumo di droghe e disturbi della personalità, e circa la metà dei consumatori di droghe manifesta almeno un disturbo della personalità (Berglund et al., 2003).

La depressione è un disturbo debilitante che sconvolge le relazioni e la vita quotidiana ed è uno dei disturbi mentali più comuni (Aalto-Setälä et al., 2001). Le persone con depressione presentano alti tassi di comorbidità con altri disturbi mentali e uso di sostanze (McLennan et al., 1997; Manwell et al., 2004). D'altra parte, molti tossicodipendenti sviluppano depressione. Ad esempio, circa il 51% dei cocainomani ed il 34% degli eroinomani presenta come condizione principale di comorbidità psichiatrica la depressione, seguita da ideazione suicida (29% e 19%, rispettivamente) senza che sia possibile verificare quale sia la relazione di causalità tra questi disturbi e la cocaina o l'eroina (Flynn et al., 1995). Un altro studio ha messo in evidenza come tra pazienti in trattamento metadonico circa il 48% dei soggetti maschi studiati e il 47% delle femmine sono affetti dai disturbi psichiatrici, e che la depressione è prevalente nei soggetti di sesso femminile (24% vs 9%) mentre il disturbo di personalità

antisociale è prevalente nei soggetti di sesso maschile (40% vs 15%) (Brooner et al., 1997). Depressione e ansia spesso coesistono; questa associazione ha la potenzialità di condurre i soggetti all'isolamento e a problemi relazionali, spingendoli a fare uso di sostanze per cercare di alleviare i sintomi negativi. I medici spesso trovano difficile individuare un trattamento idoneo per curare la depressione quando questa è associata alla dipendenza da sostanze, e a stabilire se la depressione sia determinata dalla dipendenza o se si tratti piuttosto di una depressione primaria (Nunes e Levin, 2004).

In circostanze ideali, il paziente dovrebbe essere valutato per la depressione persistente dopo alcune settimane di astinenza per poter escludere che la depressione sia connessa al ricordo o dovuta all'uso stesso della sostanza. Gli antidepressivi hanno una probabilità più elevata di essere efficaci nei confronti della depressione primaria piuttosto che sulla depressione indotta da una sostanza d'abuso. Per quanto un miglioramento dei sintomi della depressione possa portare ad una riduzione del consumo di sostanze, queste riduzioni purtroppo non sempre persistono, rendendo così indispensabile l'individuazione di interventi specifici per ridurre l'abuso di sostanza in pazienti depressi.

Comorbidità tra depressione e uso di cannabis

La cannabis è la sostanza illecita più ampiamente utilizzata nel mondo. In Europa, più di 62 milioni di persone hanno assunto cannabis almeno una volta nella vita (più del 20% della popolazione adulta) e circa 3 milioni di adolescenti, soprattutto maschi, ne fanno uso quotidianamente o quasi (McGee et al., 2000). A causa di un suo così elevato utilizzo, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse

per le possibili conseguenze dell'uso della cannabis sulla salute, con particolare riguardo alla sua relazione con i disturbi mentali.

Il rapporto tra consumo di marijuana e depressione è divenuto recentemente oggetto di diverse ricerche, volte a indagare l'entità della loro associazione e le possibili spiegazioni dei motivi che da una parte spingono gli individui depressi a fumare marijuana e dall'altra favoriscono l'insorgenza di sintomi depressivo-simili nei fumatori di cannabis (Horwood et al., 2012; Lev-Ran et al., 2013).

Sono state formulate tre ipotesi principali sulla natura di questa relazione (Grant, 1995). La prima propone che l'uso di cannabis e la depressione si associano perché condividono diversi fattori di rischio, siano essi biologici, di personalità, sociali ed ambientali. In questo caso la relazione non sarebbe diretta ma rifletterebbe semplicemente l'esistenza di sovrapposte eziologie per due distinti esiti.

La seconda possibilità è che individui depressi utilizzino la cannabis per alleviare la loro sintomatologia, come una sorta di automedicazione. Infine, la terza ipotesi è che l'uso di cannabis sia un fattore causale che contribuisce alla depressione attraverso due modalità principali, una indiretta e una diretta. La prima (indiretta) consisterebbe nell'innescare di una cascata di eventi sociali (precoce abbandono scolastico, difficoltà lavorative e altre forme di disagio) che a loro volta predisporrebbero al disturbo, mentre la seconda modalità (diretta), di tipo neurobiologico, ipotizza che alte dosi del componente psicoattivo della cannabis, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), induca modificazioni nell'attività di alcuni sistemi di neurotrasmissione, che porterebbero alla comparsa di sintomi depressivi.

La teoria di automedicazione è stata sviluppata sulla base dell'ipotesi monoaminergica della depressione, in accordo con il fatto che la depressione è associata ad una ridotta trasmissione monoaminergica, in particolare noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (Rotenberg, 1994; Prins et al., 2011). Infatti, i sintomi relativi ad un deficit monoaminergico potrebbero essere alleviati da una varietà di sostanze. Curiosamente, quando i pazienti dipendenti da stimolanti con disordini depressivi vengono trattati con antidepressivi riducono il loro abuso in misura maggiore di quanto facciano individui dipendenti ma non depressi (Markou et al., 1998; Wohl e Ades, 2009).

Il sistema endocannabinoide

La Cannabis sativa o canapa indiana è una pianta apprezzata e coltivata da millenni per le utili fibre, le proprietà curative e, soprattutto, per i suoi effetti inebrianti che inducono uno stato definito "high" in cui la persona appare rilassata e mediamente euforica, ma con alterazioni percettive che possono includere distorsioni temporali, uditive e visive e un rallentamento delle funzioni cognitive. Sono inoltre presenti un incremento del battito cardiaco, vasodilatazione, bocca secca e stimolazione dell'appetito. Ora nota in tutto il mondo con il suo nome americano, marijuana, la *Cannabis sativa* contiene più di 600 sostanze tra i quali numerosi alcaloidi, steroidi e terpeni, di cui 66 hanno una caratteristica struttura terpenofenolica e formano la classe dei cannabinoidi, i cui più abbondanti rappresentanti sono il cannabinolo, il cannabidiolo ed alcuni isomeri del tetraidrocannabinolo. L'isomero responsabile della maggior parte degli effetti psicoattivi della marijuana è il delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC)

isolato nel 1964 da Gaoni e Mechoulam (Gaoni e Mechoulam, 1964). Questo alcaloide è il capostipite di una categoria di sostanze, denominate appunto cannabinoidi, che condividono con il Δ^9 -THC un comune meccanismo d'azione (Iversen, 2003). La scoperta del Δ^9 -THC diede impeto ad una serie di studi sperimentali finalizzati all'identificazione dei substrati molecolari e cellulari attivati dai cannabinoidi nel cervello.

Il corpo umano possiede specifici siti di legame per i cannabinoidi sulla superficie di molti tipi cellulari e il nostro organismo produce diversi endocannabinoidi, derivati degli acidi grassi, che si legano ai recettori cannabinoidi (CB), attivandoli. I recettori CB e gli endocannabinoidi costituiscono il sistema cannabinoide endogeno. In seguito all'identificazione del Δ^9 -THC, lo sviluppo e l'utilizzo di ligandi cannabinoidi radioattivi consentì l'identificazione di un primo sito recettoriale ad alta affinità per questi composti (Devane et al., 1988). Nel 1990, tale recettore, definito CB₁, fu clonato e caratterizzato come appartenente alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (Matsuda et al., 1990). Un secondo recettore, CB₂, fu localizzato pochi anni dopo in leucociti umani (Munro et al., 1993). Sebbene anche il CB₂ sia accoppiato a proteine G (Howlett, 2002), la sua sequenza primaria è significativamente divergente da quella del CB₁, suggerendo possibili differenze nella filogenesi di questi recettori (Ameri, 1999).

I due tipi principali di recettori ai cannabinoidi differiscono sostanzialmente anche nella distribuzione tissutale. I CB₁ sono infatti particolarmente presenti all'interno del sistema nervoso centrale e poco rappresentati in periferia (Herkenham et al., 1990; Johnson et al., 1992; Matsuda et al., 1992; Freund et al., 2003; Mackie, 2005), mentre i CB₂ sono maggiormente rappresentati nel

sistema immunitario, sebbene recenti studi abbiano rilevato la loro espressione anche a livello del tronco encefalico (Van Sickle et al., 2005).

La loro attivazione comporta la chiusura dei canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti di tipo N e P/Q, l'apertura dei canali al K^+ voltaggio-dipendenti e l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclastasi (con conseguente diminuzione di cAMP citosolico). I recettori CB_1 interferiscono con il rilascio di alcuni neurotrasmettitori e la loro attivazione protegge il sistema nervoso centrale dalla sovra-stimolazione o dalla sovra-inibizione prodotta da altri neurotrasmettitori. I recettori CB_2 , invece, svolgono prevalentemente un'azione periferica con attività immunomodulatoria, modulando il rilascio di molecole proteiche responsabili della regolazione della funzione immune e delle risposte infiammatorie (citochine).

A seconda del tipo cellulare, della dose e dello stato dell'organismo, l'attivazione dei recettori CB può causare una moltitudine di effetti che includono euforia, ansietà, secchezza delle fauci, rilassamento muscolare, fame e riduzione del dolore. Oltre all'attivazione dei recettori CB sono allo studio parecchi altri approcci che possono influenzare il sistema cannabinoide a scopo terapeutico, incluso il blocco dei recettori cannabinoidi (antagonismo) e la modulazione delle concentrazioni degli endocannabinoidi, tramite l'inibizione della loro degradazione. La ricerca sui recettori cannabinoidi è stata implementata dallo sviluppo di agonisti ed antagonisti selettivi. Al momento conosciamo 4 classi di agonisti del recettore cannabinoide (Pertwee, 1997; Palmer et al., 2002): i cannabinoidi "classici" come il Δ^9 -THC, gli analoghi bi- e tri-ciclici del Δ^9 -THC (CP-55,940, HU210), i derivati sintetici dell'acido arachidonico, correlati all'anandamide, e gli aminoalchilindoli, composti

strutturalmente differenti dalle altre classi (Martin et al., 1991), quali il WIN 55,212-2 (WIN), potente agonista non selettivo per i recettori cannabinoidi (Pertwee, 1999; Selley et al., 2001).

A differenza degli agonisti per il recettore CB₁, i quali presentano poca selettività recettoriale, sono stati sintetizzati degli antagonisti selettivi il cui capostipite è l'SR141716A, conosciuto con il nome rimonabant (Rinaldi-Carmona et al., 1994), un tempo approvato per il trattamento dell'obesità ma ritirato dal mercato qualche anno dopo a causa dei suoi pericolosi effetti collaterali.

Tuttavia, questo composto agisce anche sui recettori CB₁ come agonista inverso, come tra l'altro, la maggior parte degli antagonisti sinora sintetizzati, quali AM281 e AM251 (Pertwee, 2005).

Un ulteriore passo in avanti sul meccanismo d'azione dei cannabinoidi è stato compiuto grazie all'isolamento di ligandi endogeni per i cannabinoidi, i cosiddetti "endocannabinoidi", una famiglia di messaggeri lipidici che si legano agli stessi recettori ai quali si lega il Δ^9 -THC e che vengono sintetizzati da precursori di membrana su richiesta dell'organismo. Nel cervello, gli endocannabinoidi regolano l'attività di canali ionici nonché il rilascio di neurotrasmettitori. Nel 1992 è stato caratterizzato il principale ligando endogeno del sistema cannabinoide. Devane e collaboratori isolarono da campioni di cervello bovino e descrissero per la prima volta l'arachidoniletanolamide, un N-aciletanolamina derivata dall'acido arachidonico. Il composto, che si lega selettivamente al recettore centrale CB₁ mediando risposte cannabinergiche *in vivo*, è stato denominato suggestivamente anandamide, dalla parola Sanscrita ananda per "stato di grazia" (Devane et al., 1992).

Tre anni più tardi, un altro derivato dell'acido arachidonico, il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) è stato scoperto essere tra i composti endogeni implicati nella trasmissione cannabinergica (Mechoulam et al., 1995, Sugiura et al., 1995). Il 2-AG tuttavia, possiede una più debole affinità, ma maggiore efficacia per i recettori CB rispetto all'anandamide (Howlett et al., 2002). Inoltre, il 2-AG è circa 200 volte più abbondante nel sistema nervoso centrale, suggerendo una sua diretta implicazione nella neurofisiologia di questo sistema trasmettitoriale (Piomelli, 2004). Altri "candidati" endogeni sono stati riportati in letteratura, (Bradshaw e Walker, 2005), ma il loro metabolismo e funzione fisiologica sono ancora incerti e poco chiari.

Coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella depressione

Similmente ad altre droghe d'abuso, la Cannabis induce rilascio di dopamina (DA) nel circuito mesolimbico di gratificazione, migliorando l'umore e aumentando la sensazione di benessere (Oleson e Cheer, 2012). Tra le numerose funzioni modulate dal sistema endocannabinoide vi sono il controllo delle emozioni, del sistema di gratificazione e ricompensa e della spinta motivazionale. Una disfunzione quindi di questo sistema potrebbe giocare un ruolo molto importante nella patogenesi di diversi disturbi mentali, come per esempio la dipendenza da droghe, i disturbi dell'umore, l'ansia e i disturbi psicotici.

Diversi studi condotti recentemente sui modelli animali di depressione suggeriscono che la stimolazione diretta o indiretta (inibendo la ricattura o la degradazione enzimatica degli endocannabinoidi) dei recettori CB₁ ha un effetto

antidepressivo-simile, e che la sintomatologia depressiva possa essere associata ad una riduzione dell'attività del sistema endocannabinoide. L'ipotesi che la stimolazione dei recettori CB₁ possa avere un effetto antidepressivo è coerente con l'esperienza clinica dell'uso della cannabis nell'uomo.

I topi "*knockout*" (KO) per il recettore dei cannabinoidi di tipo CB₁, geneticamente selezionati per essere privi di tale recettore, sono più suscettibili allo sviluppo di comportamenti simil-depressivi nel modello del "chronic mild stress" in cui l'animale viene sottoposto ad uno stress cronico (Martin et al., 2002). Il "*chronic mild stress*" riduce anche la densità dei recettori CB₁ e i livelli dell'endocannabinoide 2-arachidonilglicerolo (2-AG) nell'ippocampo (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009). In questo modello animale di depressione una riduzione della preferenza al saccarosio è considerato un sintomo di anedonia. Pertanto, la riduzione dell'assunzione di zucchero da parte dei topi CB₁-KO suggerisce che questi animali potrebbero avere una più alta vulnerabilità allo sviluppo di anedonia, un sintomo cardine della depressione (Martin et al., 2002). Inoltre, coerentemente con questa ipotesi, il blocco dell'attività del sistema cannabinoide riduce le proprietà gratificanti sia degli stimoli naturali sia di quelli artificiali (Carai et al., 2006; Hill et al., 2008; Fattore et al., 2010), un effetto che potrebbe anch'esso risultare in anedonia. È stata inoltre evidenziata un'alterazione dei recettori CB₁ nei ratti sottoposti a "chronic unpredictable stress" (CUS), in cui l'animale è sottoposto ad uno stress lieve e imprevedibile. Questo porta ad un significativo aumento della densità dei recettori CB₁ nella corteccia prefrontale e ad una diminuzione nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nel nucleo striato. La maggior parte delle alterazioni indotte dal CUS è attenuata dal simultaneo trattamento antidepressivo (Hill et al., 2008).

Rodriguez-Gaztelumendi e collaboratori (2009) hanno anche osservato nel ratto reso depresso in seguito a resezione dei bulbi olfattivi (bulbectomia) delle anomalie comportamentali, neurochimiche e strutturali simili a quelle osservate nella depressione umana. Queste anomalie sono ripristinate dopo trattamento cronico (e non acuto) con antidepressivi. I ratti bulbectomizzati, ad esempio, mostrano iperattività nel test dell'open-field, mentre l'attività motoria ritorna a valori basali in seguito a trattamento cronico con fluoxetina. Gli animali bulbectomizzati mostrano anche un significativo aumento della densità dei recettori CB₁ e della loro funzionalità nella corteccia prefrontale (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009). Questo dato potrebbe essere interpretato come una "up-regulation" dei recettori CB₁, ossia una sovra-espressione recettoriale dovuta ad un'ipoattività della trasmissione endocannabinoide. La fluoxetina ripristina anche le anomalie recettoriali (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009).

Gli studi finora svolti con l'obiettivo di indagare il ruolo del sistema endocannabinoide nella fisiopatologia della depressione hanno paradossalmente dimostrato che sia l'attivazione della trasmissione endocannabinoide sia il blocco del recettore CB₁ producono un effetto simile antidepressivo nei modelli animali di depressione (Hill e Gorzalka, 2005).

La stimolazione dei recettori CB₁ esercita un effetto antidepressivo simile a quello indotto da antidepressivi tipici, quali desipramina e fluoxetina nel "Forced Swimming Test" (FST) e negli animali bulbectomizzati (OBX) rispettivamente (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009). L'effetto di questi antidepressivi è antagonizzato da antagonisti dei recettori CB₁ che ripristinano il fenotipo depressivo-simile (Hill e Gorzalka, 2005). Inoltre, l'agonista CB₁, HU210, induce effetti antidepressivi nell' FST nel ratto, in quanto riduce il tempo di immobilità,

incrementa il tempo di swimming ed aumenta notevolmente il tempo di latenza al primo episodio di immobilità (Bogliolo et al., 2010).

HU210 inoltre è capace di antagonizzare la sindrome reserpinica nel ratto, che rappresenta ancora oggi un utile modello animale di depressione farmacologicamente indotto (Garzia et al., 2010).

D'altra parte, però, la somministrazione di AM251 (un bloccante dei recettori CB₁) induce un effetto antidepressivo nell'FST e nel test di sospensione del topo in maniera dose-dipendente, un effetto simile a quello osservato dopo la somministrazione di desimipramina (Sherman et al., 2003).

Anche l'antagonista CB₁ SR141716A riduce l'immobilità nel *Forced Swimming Test* e aumenta il rilascio di monoamine nella corteccia prefrontale quando viene somministrato a dosi relativamente alte (3 mg/kg) ma non a dosi più basse (0.3 e 1 mg/kg) (Tzavara et al., 2003).

Per quanto apparentemente contraddittorie, queste ed altre evidenze precliniche rafforzano il coinvolgimento del sistema endocannabinoide negli stati depressivi-simili. Tuttavia, finora nessun studio è mai stato condotto per valutare specificatamente se animali depressi assumano spontaneamente più o meno cannabinoidi degli animali non depressi, in quanto non vi è alcun dato in letteratura riguardante l'autosomministrazione di agonisti dei recettori CB₁ in un modello animale di depressione.

Sistema serotoninergico e abuso di sostanze: focus sul recettore

5-HT_{1B}

La serotonina è l'unica fra le monoammine biogene ad esercitare la sua azione mediante l'attivazione di un 14 distinti recettori, suddivisi in 7 classi sulla base delle caratteristiche strutturali e funzionali (Boess e Martin, 1994).

Fatta eccezione per il recettore 5-HT₃, che appartiene alla famiglia dei canali ionici, tutti i recettori per la serotonina appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G, e, suddivisi in ulteriori 14 sottotipi, rappresentano una delle famiglie più complesse di recettori di neurotrasmettitori.

Tra le quattordici subunità per il recettore serotoninergico, la subunità 5-HT_{1B} è stata ampiamente studiata per il suo potenziale ruolo nel modulare i comportamenti di dipendenza (Pentkowski et al., 2012; Neisewander et al., 2013). Il recettore serotoninergico 5-HT_{1B} è stato inizialmente identificato nel ratto e osservato nel cervello (principalmente corteccia, globo pallido e sostanza nera) e nel sistema cerebrovascolare dove media vasocostrizione. I recettori 5-HT₁ sono accoppiati alla proteina Gi/o, enzima sensibile alla tossina della pertosse, che inibisce l'azione dell'adenilato ciclasi con conseguente diminuzione della produzione di adenosina monofosfato ciclica (cAMP). Questi recettori sono largamente distribuiti nel cervello con la funzione di auto-recettore ed etero-recettore e mediano il rilascio di serotonina e altri neurotrasmettitori (Barnes e Sharp, 1999; Moret e Briley, 2000; Pytliak et al., 2011; Cai et al., 2013). In particolare, Il recettore 5-HT_{1B} esercita due effetti principali: il primo è un potente effetto sul rilascio del glutammato (Rhoades et al., 1994; Laurent et al., 2002) probabilmente attraverso la modulazione del

flusso di calcio a livello pre-sinaptico e diminuendone la possibilità di rilascio; il secondo è la modulazione dei livelli di cAMP, che a sua volta può modulare la risposta degli assoni a fattori di regolazione attrattivi quali le netrine (Bonnin et al., 2007) o molecole repellenti come le efrine (Nicol et al., 2006).

Studi animali e clinici dimostrano un collegamento tra l'attività del recettore 5-HT_{1B} e lo sviluppo di condizioni neuropsichiatriche, incluse la depressione e la dipendenza da droghe. Per esempio, una bassa funzionalità dei recettori 5-HT_{1B} è stata riscontrata in pazienti che soffrono di depressione maggiore (Murrough et al., 2011), mentre si è visto che un polimorfismo del gene 5-HT_{1B} è associato con l'alcolismo (Lappalainen et al., 1998). Tra le molteplici funzioni cui sono preposti, questi recettori modulano anche l'ansia (Lin e Parsons, 2002; Kaiyala et al., 2003), l'attività sessuale (Fernandez-Guasti et al., 1992), l'aggressività (Ramboz et al., 1996) e l'appetito (Lin e York, 2005; Dalton et al., 2006). In modelli animali di depressione e dipendenza, la stimolazione del recettore 5-HT_{1B} induce effetti antidepressivi (Tatarczynska et al., 2004), una diminuzione del consumo di alcool (Grant et al., 1997; Maurel et al., 1999) e anfetamina (Fletcher e Korth, 1999), ed effetti di rinforzo positivo per la cocaina nei ratti (Harrison et al., 1999). Studi farmacologici suggeriscono che sia gli autorecettori che gli etero-recettori 5-HT_{1B} sono coinvolti nella modulazione del comportamento d'abuso, ed entrambi sono ampiamente espressi nel nucleus accumbens, cruciale area cerebrale che svolge un ruolo di rilievo nei circuiti della gratificazione del sistema limbico (Mengod et al., 1990, Bruinvels et al., 1993, 1994).

La somministrazione dell'agonista del recettore 5-HT_{1B}, CGS-12066B, nella subregione *core* del nucleus accumbens riduce l'autosomministrazione di alcool

ma non la preferenza verso la soluzione di saccarosio nei ratti, indicando un effetto selettivo di questo composto sulle risposte indotte dalle droghe (Czachowski, 2005). Inoltre, il pretrattamento con CGS-12066B riduce in maniera dose-dipendente l'autosomministrazione di alcool (Tomkins e O'Neill, 2000) e di GBR-12909, un selettivo inibitore della ricattura della dopamina, senza però ridurre l'auto-somministrazione di cocaina nei ratti (Parsons et al., 1996), suggerendo una certa selettività negli effetti di questo composto nel ridurre il comportamento di auto-somministrazione.

I suoi effetti sull'autosomministrazione di cannabinoidi nel ratto non sono però stati ancora studiati.

Test comportamentali per la valutazione delle proprietà antidepressive di un farmaco nell'animale di laboratorio

Lo sviluppo di antidepressivi richiede test comportamentali sui roditori per lo screening iniziale, prima di intraprendere ulteriori studi preclinici e valutazioni cliniche più complesse. I test di screening più ampiamente usati per valutare l'efficacia degli antidepressivi sono essenzialmente due: il "*Forced Swimming Test*" (FST) e il "*Tail Suspension Test*" (TST). Questi test hanno una buona validità predittiva e permettono la rilevazione rapida ed economica di sostanze con potenziale attività antidepressiva simile. L'FST e il TST sono basati sullo stesso principio, cioè sulla misura della durata dell'immobilità dei roditori quando sono esposti ad una situazione inevitabile di stress. L'esposizione allo stress è un principale fattore di rischio ambientale associato all'insorgere della depressione (Kessler et al., 1997; Kendler et al., 1999; Keller et al., 2007). Studi

recenti hanno indicato che l'esposizione allo stress può interagire con diversi fattori di rischio genetici per aumentare la suscettibilità alla depressione (Caspi et al., 2003; Kaufman et al., 2006). Per queste ragioni, molti modelli animali di depressione hanno tentato di riprodurre alcune componenti fondamentali del disturbo depressivo maggiore attraverso l'esposizione allo stress. Sperimentalmente, il risultato di esposizione allo stress è influenzato da diverse variabili, tra cui la natura dello stress (fisico o psicologico) e la gravità dello stress.

La maggior parte di antidepressivi utilizzati clinicamente diminuiscono la durata di immobilità e aumentano la latenza all'immobilità nei due test comportamentali del FST e TST (Castagné et al., 2011).

- *Forced swimming test (FST)*: Il FST ha il vantaggio di essere uno strumento veloce e a basso costo per valutare potenziali farmaci antidepressivi (Figura 1). Il test prevede il posizionamento di un ratto o topo in un cilindro con acqua tiepida ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), il tanto sufficiente a impedire che l'animale tocchi il fondo con le zampe posteriori (Porsolt et al., 1977a,b, 1978).

I parametri che vengono analizzati sono il tempo in cui l'animale rimane immobile (immobility), il tempo di nuoto (swimming), tempo in cui l'animale cerca di arrampicarsi nella parete (climbing), e il tempo delle immersioni sott'acqua (diving). Un animale normale mostrerà un incremento immediato di attività, proverà diverse strategie di fuga, e poi alla fine assumerà una postura "immobile", dove eserciterà solo i movimenti necessari per mantenere la testa sopra l'acqua. In questo test, l'immobilità viene interpretata come un comportamento passivo, depressivo-simile. Dopo la somministrazione di

antidepressivi gli animali saranno in grado di esercitare una tattica di fuga con una durata più lunga rispetto agli animali di controllo.

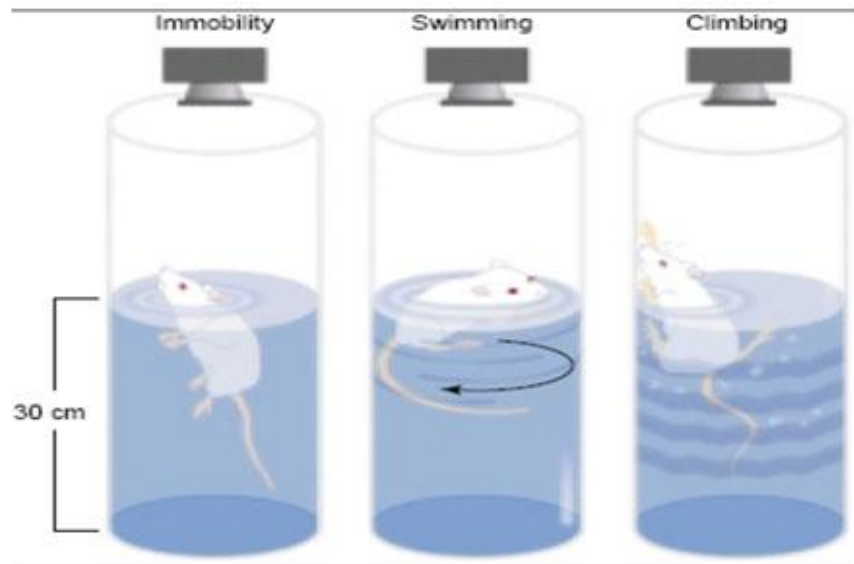


Figura 1. Parametri esaminati nel test del Forced Swimming Test (FST)

- *Tail suspension test (TST)*: Il TST è concettualmente simile al FST ma con una maggiore sensibilità. I roditori sono sospesi per la coda con un nastro adesivo su una barra orizzontale per un paio di minuti e viene registrato il tempo d'immobilità. In genere i roditori eseguono movimenti di fuga abbastanza rapidi seguiti da una postura immobile (Steru et al., 1985). Anche questo test presenta gli stessi vantaggi del FST, ma ha la limitazione di essere utilizzato solo con i topi e non con i ratti (Figura 2).



Figura 2. Tail suspension test

Esistono anche dei test basati sulla gratificazione, come la preferenza al saccarosio (*sucrose preference test*), o l'auto-stimolazione intracranica.

- *Sucrose preference*: Nel test della preferenza al saccarosio il parametro che viene esaminato è lo stato anedonico nei confronti di una soluzione zuccherina, quindi palatabile. Può misurare lo stato anedonico nel roditore in termini di perdita di interesse e motivazione nei confronti di uno stimolo piacevole, paragonabile quindi allo stato emotivo e la spinta motivazionale di un soggetto depresso (Figura 3).

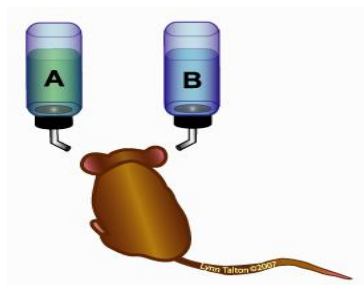


Figura 3. Preference Sucrose Test

- *L'auto-stimolazione intracranica (ICSS)*: In questo paradigma l'animale riceve un opportuno addestramento ed impara ad autosomministrarsi piccole

scosse elettriche intracerebrali che sono veicolate mediante elettrodi impiantati nelle aree cerebrali connesse ai processi di gratificazione. La frequenza con la quale un animale si auto-stimola è direttamente proporzionale al “piacere” che prova (Nielsen et al., 2000). L’auto-stimolazione è potenziata dai trattamenti acuti o cronici (anfetamina, cocaina, morfina) che producono “euforia” e dagli antidepressivi (imipramina).

La diminuzione dell’auto-stimolazione da parte dell’animale rappresenta la perdita d’interesse, stanchezza e perdita di energia durante gli episodi depressivi. Questa riduzione della frequenza di auto-stimolazione può essere invertita con un trattamento con antidepressivi (Figura 4).

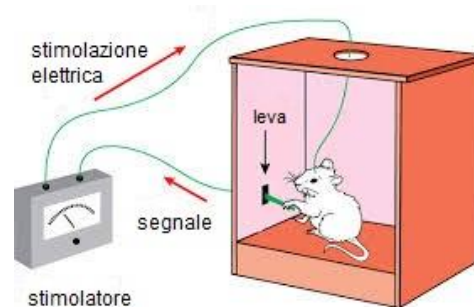


Figura 4. Auto-stimolazione intracranica

Modelli animali di depressione

Nonostante sia difficile sviluppare un modello animale che riproduca sistematicamente tutti i sintomi della depressione dei pazienti, alcuni dei quali (coscienza di sé, auto-riflessione, considerazione e comportamenti suicidi) impossibili da riprodurre in un animale, tuttavia alcuni sintomi della depressione (isolamento sociale, perdita dell’appetito, anedonia) possono essere facilmente

riprodotti nell'animale di laboratorio. Un modello animale ideale offre l'opportunità di studiare fattori molecolari, genetici ed epigenetici che possono portare alla depressione. I modelli animali sono fonte d'informazione sulla struttura di base e sui meccanismi patogenetici elementari coinvolti nella genesi delle anomalie nell'uomo. Alcuni dei sintomi più importanti della depressione, quali tristezza e angoscia, sono difficili da essere prontamente valutati negli animali. Questo rende necessario modellare i sintomi della depressione che possono tradursi in comportamenti facilmente misurabili negli animali.

I modelli animali attualmente utilizzati per la depressione variano considerevolmente nella misura in cui riproducono caratteristiche che assomigliano ad un stato depressivo-simile. Parametri che possono essere valutati in modelli comportamentali di roditori includono risposte motorie allo stress, interazione sociale, impotenza o disperazione, anedonia, isolamento sociale, tutti aspetti pertinenti alla depressione umana.

I modelli sono generalmente valutati seguendo i criteri di validità, per la loro affidabilità e riproducibilità. Per poter essere validato, un modello animale deve soddisfare tutti e tre i criteri di validità:

✓ Validità predittiva: definita come la capacità di un modello animale nel rispondere alle stesse manipolazioni terapeutiche utilizzate in clinica. La validità predittiva nei modelli animali in psichiatria è determinata in larga misura dalla loro risposta farmacologica, nelle stesse condizioni di trattamento che si usano per l'uomo. Nello specifico, un modello animale di depressione possiede validità predittiva se i sintomi della depressione presenti nell'animale (il fenotipo depressivo-simile) scompaiono o vengono almeno attenuati in seguito a trattamento cronico con antidepressivi (come nell'uomo).

- ✓ Validità fenomenologica: capacità di riprodurre nell'animale la stessa sintomatologia della malattia presente negli esseri umani; nel nostro caso specifico, se l'animale presenta buona parte dei sintomi caratteristici della depressione.
- ✓ Validità costruttiva o eziologica: si riferisce all'eziologia della patologia, e stabilisce il grado di coerenza tra le alterazioni neurobiologiche che caratterizzano la patologia che si vuole studiare e quelle riscontrabili nel modello animale. Nel caso della depressione, si ottiene una buona validità costruttiva ricreando nell'animale i processi eziologici che provocano la malattia nell'uomo (ad esempio, sottoponendo l'animale a stress acuto o ripetuto).

Nella sperimentazione animale esistono diversi modelli di depressione che soddisfano questi tre criteri. Alcuni dei modelli comportamentali di depressione utilizzati comunemente nella ricerca preclinica e che includono una componente di stress sono: "*Learned Helplessness*" (LH), "*Chronical Mild Stress*" (CMS), *Social Defeat Stress* (SDS), e *Maternal deprivation* (MD).

- "*Learned helplessness*" (LH): il paradigma LH consiste di una prima fase in cui ratti o topi vengono esposti a stress inevitabili (ad esempio, footshock elettrico) in un'area circoscritta del box, che induce nell'animale evidenti disturbi somatici quali perdita dell'appetito, diminuzione attività locomotoria, deficit cognitivi e incapacità di sfuggire situazioni di pericolo o comunque avverse (tutti sintomi paragonabili alla sintomatologia depressiva nell'uomo).

In una sessione successiva gli animali vengono esaminati in un test di evitamento attivo, in cui vengono posizionati su un lato di un box al quale

vengono inviate scariche elettriche, ma questa volta all'animale viene data la possibilità di fuggire attivamente spostandosi in un compartimento adiacente (Figura 5).



Figura 5. Apparato del Learned Helplessness

Gli animali precedentemente esposti allo stress inevitabile mostrano una ridotta capacità di fuga in questo modello. La ridotta risposta di fuga viene ripristinata da diversi antidepressivi triciclici, da inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, da inibitori della monoamino-ossidasi e dalla terapia di shock elettroconvulsiva (Sherman et al., 1982; Martin et al., 1990).

- *“Chronic mild stress”* (CMS): questo paradigma è stato sviluppato per studiare i cambiamenti neuronali che derivano dallo stress di natura più cronica (Katz et al., 1981a,b; Willner et al., 1984, 1997) ed è finalizzato a modellare uno stato depressivo cronico che si sviluppa gradualmente nel tempo in risposta allo stress. Il CMS comporta l’esposizione dell’animale a fattori di stress lievi e imprevedibili della durata di almeno due settimane, come l’illuminazione durante la notte, un periodo di deprivazione di cibo o restrizione idrica, l’inclinazione

della gabbia, un cambiamento della temperatura di stabulazione e isolamento o sovraffollamento. Questo modello soddisfa tutti e tre i criteri di validità, poiché i cambiamenti comportamentali sono invertiti con un trattamento antidepressivo (validità predittiva), i suoi sintomi sono riproducibili (validità fenomenologica), ed i cambiamenti neurochimici indotti sono del tutto simili a quelli riscontrati nei pazienti depressi (validità costruttiva).

○ *Social defeat stress (SDS)*: L'uso di conflitto sociale come fattore di stress e l'uso di interazione sociale come “*endpoint*” hanno entrambi validità fenomenologica per la depressione (Heim e Nemeroff 2001). Nell'SDS (Figura 6) un roditore, definito “intruso”, viene inserito giornalmente per brevi periodi di tempo

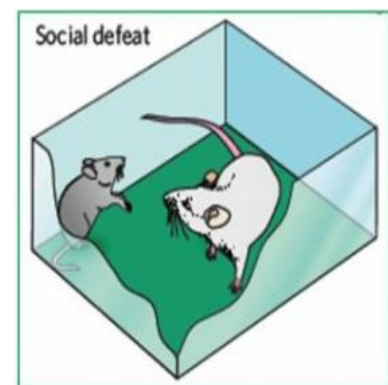


Figura 6. Social Defeat Stress

nella gabbia di altri roditori maschi subendo l'attacco e la sconfitta da parte del gruppo. Gli esperimenti sono generalmente progettati tenendo conto di fattori come il ceppo, il peso corporeo, e lo stato sociale degli animali. L'SDS riproduce il senso di sconfitta (avversione sociale) spesso riportato dagli individui depressi che hanno bassa autostima, soffrono di solitudine e provano ansia nei confronti del mondo esterno. Questo modello ha una buona validità predittiva in quanto i cambiamenti comportamentali sono invertiti dal trattamento cronico con una grande varietà di antidepressivi, ha validità fenomenologica perché riproduce molti sintomi della depressione umana, e ha validità costruttiva perché le modificazioni neurobiologiche indotte nell'animale sono paragonabili a quelle di un individuo depresso (Bjorkqvist, 2001). La

somministrazione di antidepressivi cronica ma non acuta può attenuare o anche far scomparire del tutto l'avversione sociale. Uno svantaggio del modello dell'SDS è la lunga durata dovuta alle ripetute esposizioni necessarie affinché l'intruso con il passare del tempo instauri un fenotipo depressivo-simile.

- *Maternal deprivation (MD)*: Questo modello consiste nella separazione materna nei primi giorni di vita, in cui i cuccioli vengono separati dalla madre per 1-2 ore al giorno durante le prime due settimane dopo la nascita. La separazione materna comporta un aumento dei comportamenti ansiogeni e l'insorgenza della depressione, come anche un aumento della risposta dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) in età adulta (Heim e Nemeroff, 2001; Kendler et al., 2002; Newport et al., 2002; Holmes et al., 2005).

- *Animali transgenici*: solo poche linee mutanti possono essere considerate dei modelli di depressione, per esempio i topi mancanti del recettore adrenergico α_2 , recettore glucocorticoide o della proteina cAMP (Schramm et al., 2001; O'Neil e Moore 2003).

Esistono anche dei modelli farmacologici di depressione, ma sono poco utilizzati perché il meccanismo degli aspetti depressivi non è facilmente riproducibile con la somministrazione di un unico farmaco. Tra questi vi è il modello della *sindrome reserpinica* nel quale la somministrazione nell'animale di reserpina esaurisce le riserve di catecolamine producendo una sindrome comportamentale caratterizzata da sedazione, catalessia, ptosi, ipotermia (Willner, 1989).

La bulbectomia olfattoria come modello animale di depressione

Di recente è stato messo a punto un altro modello di depressione nei roditori basato su una procedura chirurgica, la resezione dei bulbi olfattori (OBX).

Questo modello implica l'ablazione dei tubercoli olfattivi del roditore che conduce ad una alterazione del sistema limbico-ipotalamico, portando a conseguenze comportamentali, neurochimiche, neuroendocrine e neuroimmuni, che mimano molto da vicino i cambiamenti osservati nei pazienti depressi (Song e Leonard, 2005). Non è ancora chiaro come la bulbectomia olfattoria possa indurre uno stato depressivo simile, ma non si esclude che questo possa originare da uno stress cronico intenso causato dalla deprivazione sensoriale cronica.

Questo modello mostra un'alta validità predittiva perché il fenotipo depressivo viene revertito solo da trattamenti cronici, ma non acuti, con antidepressivi imitando la lenta insorgenza d'azione antidepressiva negli studi clinici su pazienti.

Il bulbo olfattivo

Il bulbo olfattivo costituisce la prima stazione di trasmissione dell'informazione olfattiva. Come altre aree cerebrali presenta tre tipi di neuroni: i neuroni afferenti, i neuroni efferenti e gli interneuroni.

I neuroni sensoriali olfattivi costituiscono le *afferenze sensoriali del bulbo olfattivo*. L'assone dei neuroni sensoriali olfattivi (NSO) è un processo sottile

(0.2 μm di diametro), amielinico, non ramificato, che dopo aver attraversato l'osso cribriforme raggiunge il bulbo olfattivo (Figura 7).

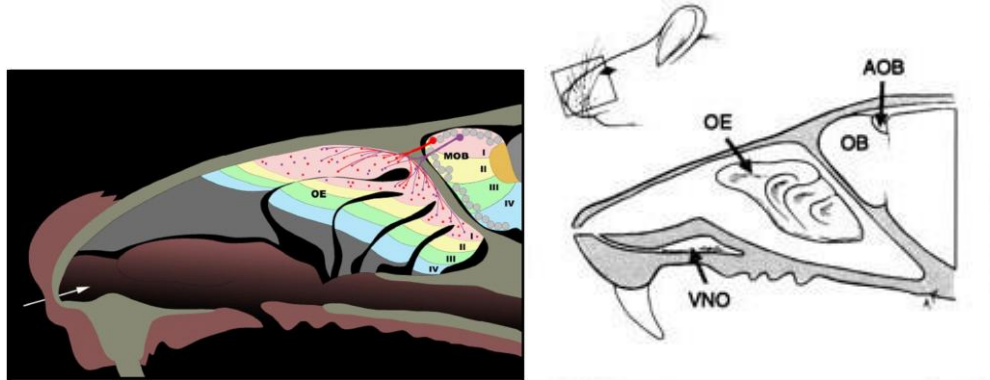


Figura 7. Rappresentazione di una sezione sagittale di naso di topo. La freccia indica il punto di ingresso dell'aria e delle molecole odorose. L'epitelio olfattivo (OE) riveste le strutture dei turbinati ed è suddiviso in quattro zone, rappresentate nei diversi colori. Gli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi proiettano al bulbo olfattivo (MOB, main olfactory bulb), dove formano i glomeruli.

Il bulbo olfattivo fa parte del prosencefalo ed è costituito da due strutture ovoidali simmetriche che si trovano immediatamente sopra le cavità nasali. Esso ha una caratteristica struttura laminare, suddivisa in: strato del nervo olfattivo (ONL), strato glomerulare (GL), strato plessiforme esterno (EPL), strato delle cellule mitrali (MCL), strato plessiforme interno (IPL) e strato delle cellule dei granuli (GCL) (Figura 8). Ognuno di tali strati contiene tipi cellulari diversi.

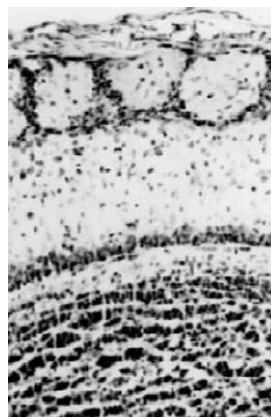


Figura 8. Sezione di bulbo olfattivo in seguito a colorazione di Nissl. E' possibile osservare i diversi strati che caratterizzano il bulbo olfattivo: lo strato dei glomeruli (GL); lo strato plessiforme esterno (EPL), che contiene i corpi cellulari delle cellule tufted; lo strato delle cellule mitrali (MCL); lo strato plessiforme interno (IPL) e lo strato delle cellule dei granuli (GCL).

Lo strato del nervo olfattivo è formato dagli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi, che attraversano la lamina basale dell'epitelio olfattivo e l'osso cribriiforme per raggiungere infine il bulbo olfattivo.

Nello strato glomerulare gli assoni dei NSO stabiliscono sinapsi eccitatorie, glutamatergiche, con i dendriti delle cellule post-sinaptiche del bulbo olfattivo (cellule mitrali, tufted e periglomerulari), dando origine ai glomeruli. I glomeruli sono strutture sferiche di neuropilo, di dimensioni variabili tra gli 80 ed i 160 μm di diametro (nel topo da 30 a 50 μm , nel coniglio e nel gatto da 100 a 200 μm), disposte su tutta la superficie, esterna dei bulbi. Sono costituiti dalla ramificazione terminale degli assoni dei NSO, che contraggono sinapsi con i dendriti delle cellule post-sinaptiche del bulbo, nonché con le cellule periglomerulari, poste tutto intorno ai singoli glomeruli. I glomeruli sono inoltre circondati dalle cellule gliali (Shipley e Ennis, 1996; Jia, 1999).

I neuroni post-sinaptici del bulbo sono rappresentati dalle cellule mitrali (MC) e dalle *cellule tufted* (TC) (vedi schema 1). Queste cellule costituiscono la *via efferente del bulbo olfattivo* e formano il tratto olfattivo laterale. Le cellule mitrali sono neuroni glutamatergici che presentano i corpi cellulari disposti a formare un unico strato, lo strato delle cellule mitrali. I corpi cellulari delle cellule tufted si trovano invece a diversi livelli nello strato plessiforme esterno ed in base a tale posizione vengono distinte in esterne, medie ed interne. Sia le cellule mitrali che le cellule tufted presentano un unico dendrite primario, che penetra in un unico glomerulo nel quale forma un'estesa arborizzazione. Presentano inoltre

dendriti secondari che decorrono orizzontalmente nell'EPL e contraggono sinapsi dendro-dendritiche con le cellule dei granuli. Gli assoni delle cellule mitrali e delle cellule tufted escono fuori dal bulbo olfattivo, formando il tratto laterale olfattorio, che trasmette l'informazione olfattiva ad altre stazioni cerebrali. Le cellule tufted esterne rientrano negli interneuroni. Anche da un punto di vista biochimico, le cellule tufted si presentano come una popolazione eterogenea, che si avvale di diversi neurotrasmettitori quali la colecitochinina (CCK), il GABA, il fattore rilasciante la corticotropina (CRF), il polipeptide intestinale vasoattivo (VIP).

Al di sotto dello strato delle cellule mitrali si trova lo strato plessiforme interno, molto sottile, costituito da pochi corpi cellulari, prevalentemente appartenenti a cellule ad assone corto e cellule dei granuli. Gli interneuroni del bulbo sono rappresentati dalle cellule periglomerulari e dalle cellule dei granuli. Le cellule periglomerulari (PG) includono diversi tipi di cellule, quali le cellule periglomerulari, le cellule ad assone corto e le cellule tufted esterne. Le cellule PG contraggono sinapsi con i dendriti delle cellule mitrali e delle cellule tufted, oltre che con i terminali assionali dei NSO. Le cellule PG sono una popolazione eterogenea non solo morfologicamente, ma anche biochimicamente. Esse infatti esprimono diversi neurotrasmettitori quali: il GABA, l'ossido nitrico, il NADPH, le dopamine ed il neuropeptide Y. Pertanto, le sinapsi che le cellule PG formano con le cellule pre- e post-sinaptiche del bulbo non hanno solamente funzione inibitoria, ma in senso più ampio modulatoria.

Le cellule dei granuli sono neuroni gabaergici, il cui corpo cellulare si trova nello strato dei granuli, che è immediatamente al di sotto dello strato plessiforme interno, ed occupa la parte centrale del bulbo olfattivo. Esse formano sinapsi

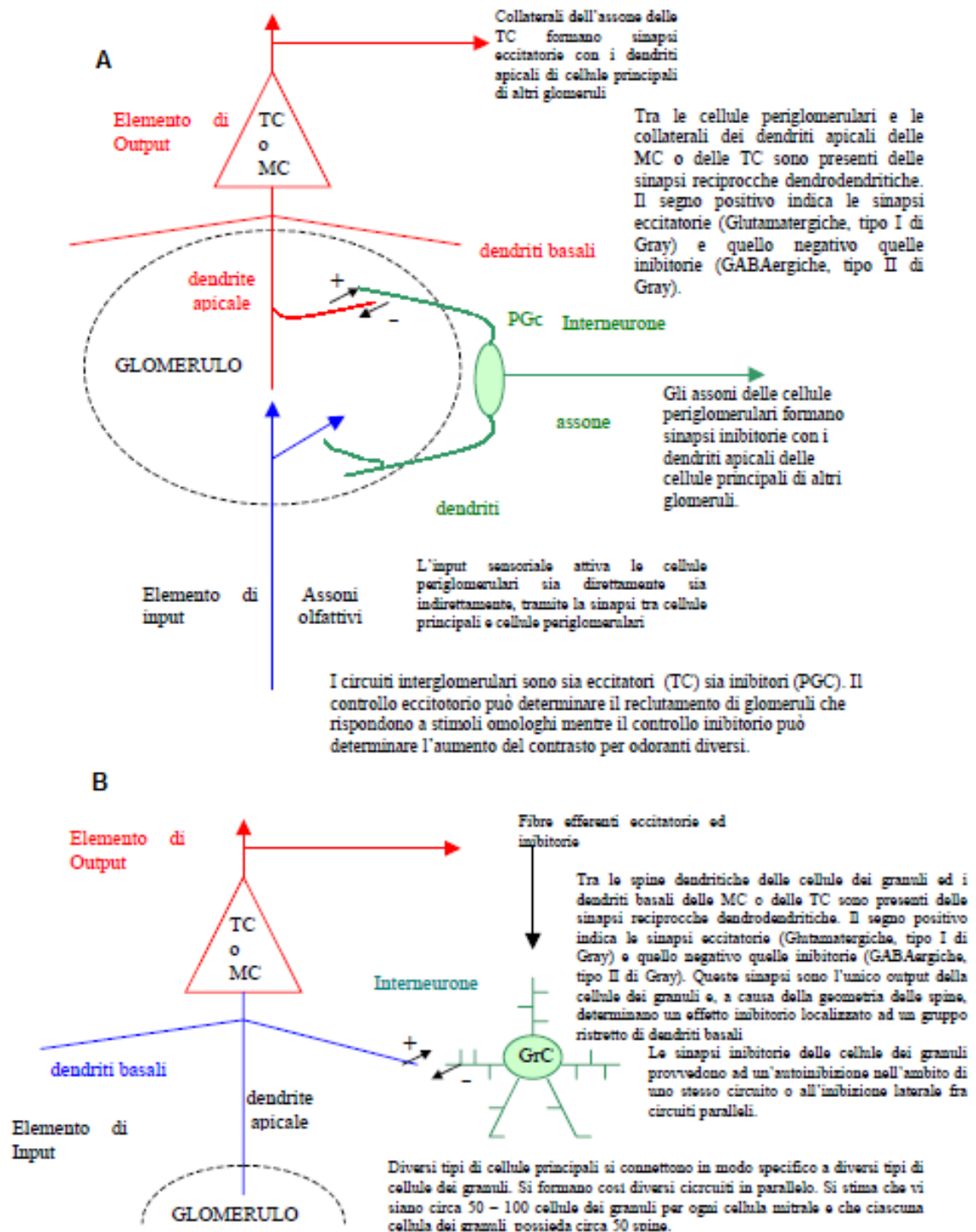
inibitorie dendro-dendritiche con i dendriti secondari delle cellule mitrali e delle cellule tufted, non hanno l' assone.

Le cellule PG e le cellule dei granuli rigenerano costantemente durante tutta la vita dell'individuo. Esse originano dalla zona sub ventricolare (SVZ) intorno ai ventricoli laterali e da qui si portano attraverso uno specifico processo di migrazione lungo la *rostral migratory stream* (RMS). Una volta giunte al bulbo olfattivo, migrano radicalmente e si differenziano in interneuroni bulbari (Shipley e Ennis, 1996; Jia, 1999). Nel ratto la rimozione dei bulbi olfattivi produce alterazioni comportamentali e modifiche dei processi di apprendimento.

Il bulbo olfattorio è una delle poche strutture dell'encefalo a ricevere neuroni neogenerati durante tutto l'arco della vita dell'animale. I precursori neuronali si originano da cellule staminali della zona subventricolare che delimita i ventricoli laterali. Le cellule progenitrici viaggiano lungo il cosiddetto percorso migratorio rostrale, "*rostral migratory stream*" (RMS), e sono destinate a diventare interneuroni del bulbo olfattorio.

Schema 1: organizzazione sinaptica del bulbo olfattivo.

A) processazione dell'input, B) controllo dell'output nello strato plessiforme



La percezione olfattiva ha inizio nei neuroni sensoriali olfattivi (NSO) presenti nell'epitelio nasale. Questi neuroni trasmettono poi il segnale al bulbo olfattivo principale e da qui passa alla corteccia cerebrale.

L'epitelio olfattivo

L'epitelio olfattivo è un epitelio colonnare pseudo stratificato che riveste strutture cartilaginee convolute dette turbinati, poste nella parte posteriore delle cavità nasali. L'epitelio olfattivo è costituito da tre tipi cellulari principali: i neuroni sensoriali olfattivi, le cellule sustentcolari di sostegno e le cellule staminali basali (Ronnett e Moon, 2002; Lledo et al., 2005).

I neuroni sensoriali olfattivi rappresentano il 70-80% della popolazione cellulare totale dell'epitelio olfattivo e rigenerano costantemente durante la vita dell'organismo con un'emivita di circa 60-90 giorni. Essi hanno una tipica morfologia bipolare, con un unico dendrite non arborizzato, che si porta verso la superficie dell'epitelio, a contatto con le cavità nasali, e l'assone amielinico che proietta al bulbo olfattivo nel cervello (Figura 9). Il dendrite termina con un'espansione globosa, detta knob, da cui si dipartono numerose cilia, estensioni filiformi che protrudono nella cavità nasale e su cui si trovano i recettori olfattivi (RO).

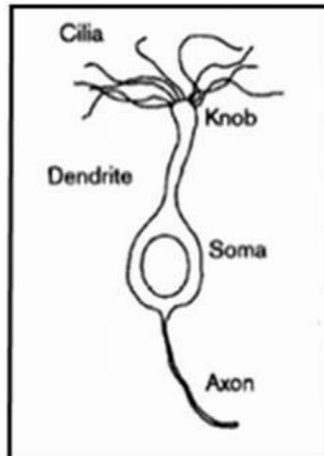


Figura 9. Rappresentazione di un neurone sensoriale olfattivo. E' possibile osservare la tipica morfologia bipolare: un unico dendrite non arborizzato che termina con un'espansione globosa (knob), da cui dipartono numerose ciglia, ed un unico assone (Menini, 1999).

Le ciglia sono immerse nel muco secreto dalle cellule sustentcolari dell'epitelio olfattivo e dalle ghiandole di Bowman (Figura 10). Si ritiene che le specifiche caratteristiche biochimiche del muco siano rivolte a creare l'ambiente ideale per la percezione degli odori. Il muco contiene proteine leganti gli odori (*olfactory binding protein*, OBP), che sono secrete dalla ghiandola nasale laterale; esse hanno la funzione di legare gli odoranti idrofobici, permettendo il loro passaggio alla soluzione acquosa che costituisce il muco. Sono presenti più forme di OBP nell'epitelio nasale, nel ratto ne sono state identificate quattro (Ronnelt e Moon, 2002). Gli odori si dissolvono nel muco dell'epitelio olfattivo per raggiungere e legarsi ai recettori olfattivi presenti sulle ciglia ed innescare una catena di segnali intracellulari, che culmina con la generazione del potenziale d'azione e la trasmissione del segnale al bulbo olfattivo nel cervello.

Le cellule sustentcolari di sostegno svolgono diverse funzioni: isolano elettricamente i neuroni sensoriali olfattivi, secernono le componenti del muco che riveste la superficie dell'epitelio olfattivo e fattori di crescita importanti per lo

sviluppo dei neuroni sensoriali olfattivi e contengono enzimi detossificanti che inattivano gli odori.

Le cellule basali di tipo globoso, che costituiscono la lamina basale al di sotto dell'epitelio olfattivo, rappresentano i precursori dei neuroni sensoriali olfattivi.

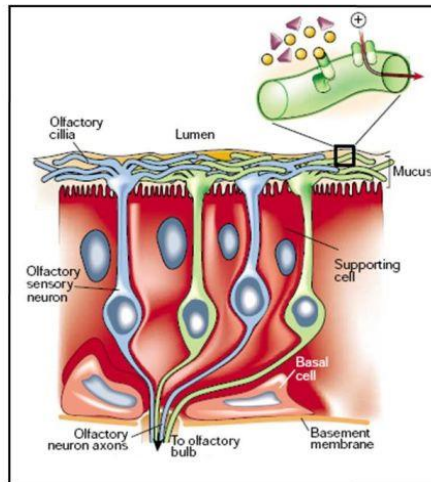


Figura 10. Rappresentazione dell'epitelio olfattivo. Si distinguono i tre tipi cellulari: i neuroni sensoriali olfattivi, le cui cilia sono esposte verso il lume della cavità nasale e sono immerse nel muco, le cellule di supporto sustentacolari, e le cellule staminali basali. Sulle cilia dei NSO sono espressi i recettori olfattivi che legano le molecole odorose e originano la cascata di trasduzione del segnale odoroso.

La trasduzione olfattiva

Nei roditori l'epitelio olfattivo appare organizzato in quattro regioni principali. I neuroni che riconoscono un dato odore sono localizzati all'interno di un'unica regione, nella quale sono però mescolati casualmente con recettori per altri odoranti.

La risposta tipica del neurone ad un odore è una depolarizzazione a cui segue l'insorgenza di potenziali d'azione nell'assone. I neuroni olfattivi mostrano una sensibilità selettiva per i vari odori. Vale a dire che per ciascun neurone si

ottiene una depolarizzazione solo presentando certi odori e non altri. Il numero complessivo di neuroni attivati è comunque determinato anche dalla concentrazione dell'odore: in presenza di molte molecole viene attivata una popolazione più ampia di neuroni. Questo può spiegare perché il medesimo odore possa essere percepito in modo diverso secondo le concentrazioni.

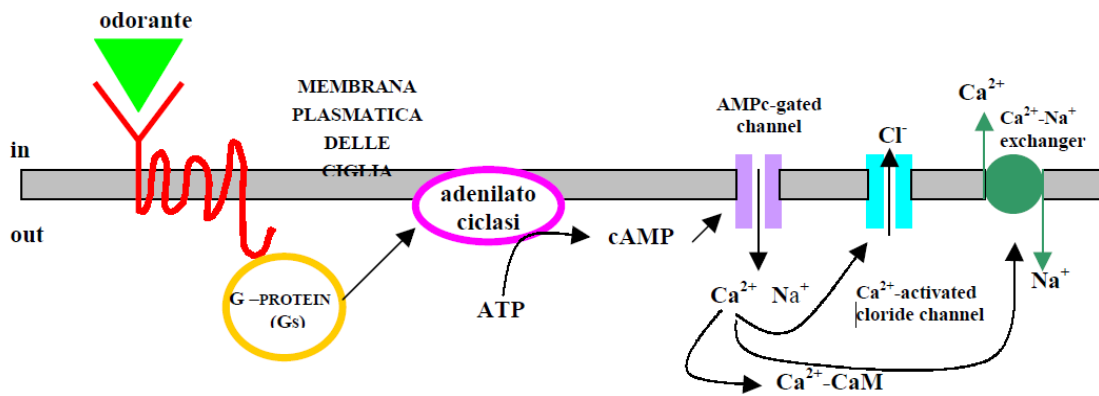


Figura 11. Schema della trasduzione olfattiva

I diversi tipi di recettori per gli odori (circa 1000) appartengono ad una grande famiglia di proteine recettoriali (proteina eterotrimerica legante GTP) (Figura 11) e che trasducono il segnale grazie all'accoppiamento con una proteina G ed hanno tutti una struttura molto simile, pur essendo distinti l'uno dall'altro a causa di piccole differenze nella sequenza amminoacidica. Come altri recettori accoppiati alle proteine i recettori per gli odori hanno regioni idrofobiche che attraversano la membrana (regioni di transmembrana). Queste regioni individuano una sorta di tasca in cui s'inserisce il ligando. Coerentemente con quest'ipotesi sono proprio queste le regioni di maggior variabilità amminoacidica nelle diverse varianti di recettori per gli odori. Il legame dell'odore con il suo recettore specifico induce un'interazione con la proteina G. Questa interazione

provoca il distacco della subunità G_{olf} la quale tiene legata una molecola di GTP. La subunità G_{olf} distaccata può stimolare a sua volta un enzima di membrana, l'adenilato ciclasi (AC-III) 7, a sintetizzare cAMP dall'ATP. Il cAMP è un messaggero intracellulare solubile. Un aumento della sua concentrazione porta all'apertura di canali ionici modulati dai nucleotidi ciclici (CNG channel). Questi canali, localizzati nella membrana delle ciglia, sono permeabili al Ca^{2+} ed al Na^+ . La loro apertura determina quindi una depolarizzazione della membrana che, trasmettendosi elettrotonicamente fino all'assone, induce l'insorgenza di un potenziale d'azione. A ciò si aggiunge successivamente il contributo di un canale ionico permeabile al cloro attivato dall'aumento del calcio intracellulare (canale Cl/Ca^{2+} attivato).

Nei neuroni olfattori la concentrazione del cloro è insolitamente alta (40 mM) e, in condizioni fisiologiche, i canali Cl/Ca^{2+} attivati portano Cl^- dal lume cigliare al muco. L'aumento del calcio intracellulare indotto dalla corrente cationica primaria determina quindi l'insorgenza di un'ulteriore corrente depolarizzante portata dal Cl^- "feedback positivo". Quest'ultima, anche se temporalmente secondaria, può portare dal 50 all'80% della corrente totale del recettore. Il calcio accumulatosi in seguito alla trasduzione sensoriale viene riportato ai livelli di riposo grazie ad uno scambiatore ionico ($3Na^+/1Ca^{2+}$) presente nei dendriti e forse anche nelle ciglia.

Scopo dello studio

In letteratura è stato ampiamente dimostrato come ci sia una correlazione tra un soggetto depresso e l'utilizzo di droghe, quali la Cannabis. Il principale scopo di questo studio è stato quindi quello di valutare se un animale con un fenotipo-depressivo simile si auto-somministri più o meno cannabinoidi degli animali non depressi. A tale scopo abbiamo quindi studiato l'effetto dell'agonista sintetico del recettore cannabinoide CB₁, WIN 55,212-2, nel modello animale di depressione della bulbectomia olfattiva (OBX), utilizzando il protocollo di auto-somministrazione endovenosa cronica di cannabinoidi nel ratto (*self-administration*) come precedentemente descritto in letteratura (Fattore et al., 2001, 2007). Abbiamo quindi verificato se gli animali bulbectomizzati mostrassero una maggiore o minore assunzione di cannabinoidi rispetto agli animali di controllo (SHAM) durante le varie fasi del protocollo di auto-somministrazione (acquisizione, mantenimento ed estinzione).

Il passo successivo è stato quello di verificare se l'auto-somministrazione di WIN nei ratti OBX venisse modificato dal trattamento acuto con un agonista serotoninergico. Poiché il recettore 5-HT_{1B} è stato visto recentemente coinvolto nella modulazione della depressione e del consumo di droghe, abbiamo utilizzato l'agonista CGS-12066B, scelto non solo sulla base della sua alta selettività per il recettore 5-HT_{1B} ma anche perché è stato dimostrato in grado di ridurre l'auto-somministrazione di anfetamina e alcool nei ratti (Fletcher e Korth, 1999; Tomkins e O'Neill, 2000; Czachowski et al., 2005).

L'auto-somministrazione di cannabinoidi nel ratto è associata ad un significativo aumento di dopamine (DA) nella subregione *shell* del nucleus accumbens

(Fadda et al., 2006). Abbiamo quindi condotto uno studio neurochimico utilizzando la microdialisi cerebrale *in vivo* per misurare i livelli di DA negli animali normali (SHAM) e simil-depressi (OBX) dopo una somministrazione acuta endovenosa dell'agonista cannabinoide WIN 55,212-2. La dose utilizzata negli esperimenti di microdialisi è stata di 0.3 mg/kg, in quanto rappresenta la quantità media di cannabinoide che gli animali si auto-somministrano giornalmente durante le sessioni di auto-somministrazione (Fattore et al., 2010).

Infine, per meglio interpretare i dati comportamentali abbiamo condotto in parallelo uno studio di autoradiografia su animali OBX e SHAM *naive*, mai entrati cioè in contatto con alcun farmaco, per valutare la densità recettoriale di base del CB₁ nei due gruppi sperimentali.

Materiali e Metodi

Animali

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti maschi adulti del ceppo Lister Hooded del peso di 250-270 grammi all'inizio dell'esperimento, (Harlan-Nossan, Italia), stabulati quattro per gabbia nello stabulario del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Cagliari. I ratti hanno avuto a disposizione acqua e cibo e sono stati mantenuti a un ciclo luce/buio di dodici ore (luce alle 7 p.m.), con una temperatura costante di $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidità del 60%. I protocolli sperimentali sono approvati dal Comitato per la Cura degli Animali da laboratorio del Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli studi di Cagliari, Italia.

Farmaci e Trattamenti

Per il training di auto-somministrazione endovenosa cronica abbiamo utilizzato:

- WIN 55,212-2(R)-(+) - [2,3-diidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzossazin-6-il]-1-naftalenilmetanone.

La soluzione di WIN (RBI, USA) è stata preparata fresca utilizzando una goccia di Tween 80 per sciogliere il WIN, e successivamente diluendo in soluzione salina eparinizzata (1%) alla dose di $12.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ per infusione (volume di infusione $100 \mu\text{l}$) (Fattore et al., 2001). Per assicurare la massima sterilità, la soluzione di WIN è stata filtrata con una siringa (filtro di $0,22 \mu\text{m}$) prima dell'utilizzo.

Per gli esperimenti di microdialisi, la soluzione di WIN è stata preparata come precedentemente descritto e somministrata in vena alla dose di 0.3 mg/kg non appena l'animale ha mostrato dei livelli basali di DA stabili (volume di iniezione: 1 ml/kg). Questa dose è stata selezionata sulla base delle richieste di WIN giornaliere tipicamente autosomministrate dai ratti maschi Lister Hooded nelle stesse condizioni sperimentali (Fattore et al., 2001, 2007; Deiana et al., 2007; Spano et al., 2010). È stata scelta questa dose di WIN, perché oltre a mimare le richieste giornaliere della sostanza da parte dei ratti, ha mostrato portare un aumento significativo dei livelli di dopamina (DA) nella shell del nucleus accumbens (NAc) dei ratti Lister Hooded (Tanda et al., 1997).

- CGS-12066B7-trifluorometil-4(4-metil-1-piperazinil)-pirrolo[1,2-a] chinosalina dimaleato (CGS).

Il CGS, acquistato presso R&D systems (Abingdon, Oxon, UK), è stato disciolto in soluzione salina e somministrato per via intraperitoneale (IP) in dosi variabili da 2.5 a 15 mg/kg (volume di iniezione: 2 ml/kg), 20 minuti prima dell'inizio della sessione.

Le dosi di questo farmaco sono state selezionate sulla base della loro abilità di ridurre acutamente il comportamento di auto-somministrazione nei ratti in modo dose-dipendente (Parsons et al., 1996). Gli animali hanno ricevuto ciascuno una dose di farmaco e salina. Ciascun animale è stato testato una volta con ciascuna dose di farmaco e di salina in maniera controbilanciata, seguendo un disegno "Latin Square" e separando ciascun test con tre sessioni giornaliere consecutive al fine di consentire all'animale di mantenere stabile il suo

comportamento di auto-somministrazione. Tutti gli antibiotici e anestetici sono acquistati come soluzioni sterili dai fornitori locali.

- ^3H ICP-55,940(1 α ,2 β -(R)-5 α]-5-(1,1-dimethyleptyl)-2[5hydroxy-2-(3 hydroxypropyl) cyclohexyl] phenol).

Il radioattivo è stato acquistato dalla Perkin-Elmer Life Sciences Inc (Boston, MA, USA); il (-)-CP55,940 dalla Tocris (Ballwin, MO, USA).

La bulbectomia olfattoria (OBX)

All'inizio degli esperimenti neurochimici e di comportamento, i ratti son stati suddivisi in due gruppi: ratti bulbectomizzati (OBX) e ratti di controllo (SHAM). La resezione bilaterale del bulbo olfattivo è stato effettuato come descritto da Kucerova et al. (2012).

Gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano al 2%. Il cranio è stato inciso superficialmente a livello della linea mediana frontale e tamponato con soluzione antisettica, dopo di che è stato forato con il trapano eseguendo due buchi del diametro di 2 mm nell'asse frontale, 7 e 7.5 mm anteriormente al bregma, e 1.5 e 2 mm lateralmente dalla sutura del bregma per animali con un peso medio di 230 \pm 10 e 260 \pm 10 g rispettivamente. Nei ratti OBX entrambi i bulbi olfattivi son stati rimossi con il contributo dell'aspirazione di una pompa Vacuum, facendo particolare attenzione a non danneggiare la corteccia prefrontale. Per prevenire la fuoriuscita di sangue la cavità aperta è stata otturata con del cotone emostatico. La lesione sulla pelle è stata poi suturata.

Infine è stata applicata la Rifamicina sodica e Bacitracina polvere per prevenire eventuali infezioni batteriche e cicatrizzare la parte lesa.

I ratti SHAM hanno subito la stessa anestesia e procedura chirurgica ma i bulbi olfattivi sono stati lasciati intatti.

Gli animali OBX sono stati lasciati a riposo dopo l'operazione per un periodo di 20 giorni e per consentire lo sviluppo della sindrome depressivo-simile, Durante questo periodo gli animali sono stati manipolati giornalmente per pochi minuti per prevenire l'aggressività che poteva altrimenti presentarsi (Leonard e Tuite, 1981; Song e Leonard, 2005).

Prima dell'inizio della sessione giornaliera di auto-somministrazione di WIN e degli esperimenti di microdialisi, abbiamo verificato lo stato anedonico degli animali OBX attraverso il test della preferenza al saccarosio, e la presenza di iperattività motoria in risposta a un ambiente nuovo nell'open field (Song e Leonard, 2005).

Test della preferenza al saccarosio

Trascorsi 20 giorni dalla chirurgia della bulbectomia olfattoria, gli animali OBX e SHAM sono stati trasferiti dentro singole gabbie con libero accesso al cibo. Sono state utilizzate due bottiglie per determinare il consumo di saccarosio di entrambi i gruppi sperimentali. Durante le 24h di abituamento tutti i ratti sono stati messi in gabbie singole con a disposizione due bottiglie d'acqua posizionate ai lati di ciascuna gabbia. Dopo la fase di abituamento una delle due bottiglie è stata sostituita con un'altra contenente soluzione saccarina al 2%, una concentrazione nota per dare una robusta preferenza al saccarosio (Muscat e Willner, 1989). Alle 4 e 24 h le bottiglie son state rimosse ed è stato

misurato il quantitativo di liquido rimasto in ciascuna bottiglia. Dopo aver effettuato la prima delle due misurazioni (4 ore), le posizioni delle due bottiglie sono state invertite per evitare che l'animale si abituasse alla posizione della bottiglia e di conseguenza assicurarsi che ricercasse effettivamente la soluzione di saccarosio. Il quantitativo della soluzione di saccarosio è stato calcolato sulla percentuale di soluzione di saccarosio ingerita relativa al liquido totale consumato prima e dopo ciascun test.

$$\frac{\text{Consumo di saccarosio (g)} \times 100}{\text{Liquido totale assunto (g)}}$$

Test di attività motoria

Un giorno dopo la conclusione del test della preferenza al saccarosio, è stato condotto un test di attività motoria per verificare che gli animali OBX mostrassero iperattività motoria in un ambiente nuovo e avversivo. I ratti sono stati testati individualmente per l'attività locomotoria usando l'apparato "Digiscan Animal Activity Analyser" (Omnitech Electronics, USA) come precedentemente descritto (Castelli et al., 2013). Ciascuna gabbia operante di dimensioni 42X30X60 cm è munita di due set di 16 fotocellule localizzate agli angoli destri. Le fotocellule proiettano raggi infrarossi orizzontali di 2.5 cm e di 2 cm sopra il pavimento della gabbia. Le quattro pareti del box sono state coperte esternamente con fogli di alluminio e due lampadine di 90-W sono state disposte diagonalmente in angoli opposti per creare una luce intensa fortemente avversiva per i ratti.

Il giorno del test i ratti sono stati disposti al centro del box e sono stati lasciati liberi di esplorare il box per 10 minuti, e l'attività locomotoria è stata calcolata dopo la libera esplorazione del ratto attraverso la conta delle interruzioni dei raggi infrarossi.

Durante i 10 minuti di test i parametri misurati sono:

- ✓ ATTIVITA' ORIZZONTALE: numero totale di interruzioni dei raggi infrarossi che originano dai sensori orizzontali.
- ✓ ATTIVITA' VERTICALE: numero totale di interruzioni dei raggi infrarossi che originano dai sensori verticali; questa misura fornisce un indice del tempo in cui l'animale rimane sollevato sulle zampe posteriori (numero di episodi di innalzamento).
- ✓ DISTANZA TOTALE: distanza orizzontale percorsa dall'animale (dipende dalla traiettoria dell'animale).

Alla fine del test ogni animale è stato riportato nella propria gabbia e i box puliti con H₂O₂ per evitare stimoli odorosi per gli altri gruppi sperimentali.

Preparazione chirurgica per l'auto-somministrazione endovenosa di farmaco

Una volta terminato il test dell'attività motoria gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano 2%. Sotto condizioni sterili è stato impiantato un catetere permanente in silastic nella vena giugulare dell'atrio destro. Dopo la chirurgia, ciascun animale è stato stabulato in gabbia singola con libero accesso ad acqua e cibo. Per 6/7 giorni post-operatori gli animali ricevono un infusione intravenosa di gentamicina (0.16 mg/kg) con 0.1 ml di eparina, per prevenire

eventuali infezioni e occlusione del catetere. Durante il ricovero sono stati monitorati il peso e, in generale, il comportamento sociale degli animali. Prima di iniziare il training di auto-somministrazione, gli animali sono stati messi in condizioni di restrizione alimentare, lasciando loro a disposizione circa 20 g/die di pellets immediatamente dopo ciascuna sessione di auto-somministrazione.

Auto-somministrazione endovenosa di farmaco

L'auto-somministrazione di WIN è stata condotta utilizzando 12 gabbie operanti (29.5X32.5X23.5 cm, Med Associates, Vermont, USA) con un protocollo di rinforzo FR-1, secondo il quale ad ogni richiesta da parte dell'animale (pressione della leva attiva) corrisponde una infusione endovenosa di WIN. Ciascun box è munito di una luce, un suono attenuato e ventilazione costante per evitare il surriscaldamento del box durante la sessione sperimentale. Ciascuna gabbia è provvista di un pannello con due leve retraibili larghe 4 cm e distanti 12 cm l'una dall'altra, 8 cm dalla griglia e estendibili per 1.5 cm all'interno del box. Sopra ciascuna leva si trova uno stimolo luminoso rosso (*cue light*), e una luce guida bianca (*home light*) situata nella parete opposta alle leve rimane accesa dall'inizio alla fine della sessione sperimentale. Il protocollo di auto-somministrazione è monitorato attraverso un apposito software (Med Associates, Vermont, USA).

Prima di iniziare ogni sessione, il catetere dell'animale viene collegato alla pompa di infusione attraverso un sistema di tubi in silastic. La pressione di una delle due leve, definita come ATTIVA, risulta nell'accensione della *cue light* per 15 secondi e nello spegnimento della *home light*. In contemporanea, le due leve si retraggono e si ha l'attivazione della pompa di infusione per 5.8 secondi

durante i quali l'animale riceve una infusione endovenosa di (0.1 ml) della soluzione di cannabinoide. Nei dieci secondi immediatamente successivi a ciascuna infusione è stato introdotto il cosiddetto *time-out* (TO), periodo durante il quale le due leve rimangono retratte. Terminato il TO le due leve si ri-estendono dentro la gabbia, la *cue light* si spegne e rimane accesa solo la *home light*. La pressione dell'altra leva, definita come INATTIVA, non porta a nessuna infusione, ma viene registrata come indice dei livelli dell'attività basale e dell'eventuale presenza di effetti aspecifici indesiderati. La raccolta dei dati e la valutazione del protocollo sono stati programmati usando il pacchetto "software MED Associates". Durante ciascuna fase, l'attività locomotoria è monitorata attraverso una serie di fotocellule disposte a 3.5 cm sul pavimento della gabbia, registrando in generale l'attività locomotoria.

Le sessioni di auto-somministrazione hanno avuto una durata di 120 minuti, e sono state condotte giornalmente a settimana tra le 9 a.m. e le 12 p.m. durante la fase di buio.

Nel protocollo di auto-somministrazione si distinguono tre fasi che si sviluppano nell'arco di circa 30 giorni: acquisizione; mantenimento e d'estinzione.

- *Acquisizione*

Nel "training" di acquisizione, l'animale impara a discriminare tra leva attiva e passiva. La fase di acquisizione dura in media 8-10 giorni e si considera raggiunta quando l'animale stabilizza l'assunzione di cannabinoide, compie cioè un numero di pressioni sulla leva attiva >15 e con una variazione della media $<20\%$ per tre giorni consecutivi. Solo i ratti che hanno sviluppato un pattern stabile dell'assunzione del WIN hanno proseguito il protocollo di auto-

somministrazione fino a 30° giorno. I ratti che non hanno soddisfatto questo criterio sono stati esclusi dalle fasi successive della sperimentazione.

Una volta che l'animale ha imparato l'associazione tra la pressione della leva e l'infusione del WIN ha proseguito il training di auto-somministrazione (fase successiva).

- *Mantenimento*

Una volta raggiunta l'acquisizione, il training di auto-somministrazione è continuato per altri 7 giorni durante i quali gli animali hanno mostrato una stabile assunzione giornaliera di WIN. Al termine di questa fase gli animali sono passati nell'ultima fase, ossia la fase di estinzione.

- *Estinzione*

Nella fase di estinzione gli animali non hanno più avuto accesso libero al WIN, ma il cannabinoide è stato sostituito con il veicolo (1% di Tween 80 in soluzione salina). Tutti gli altri parametri sono stati lasciati invariati pertanto, perciò con la pressione della leva attiva è risultata in una infusione di (0.1 ml) di veicolo accompagnato da uno stimolo luminoso che precedentemente si accendeva durante l'infusione di WIN.

Il comportamento di auto-somministrazione del cannabinoide viene considerato estinto quando il massimo numero di risposte sulla leva attiva risultava ≤ 10 e il numero totale della pressione delle due leve (attiva e inattiva) in una singola sessione ≤ 20 .

Procedure chirurgiche e sperimentali per la microdialisi cerebrale *in vivo*

In gruppi separati di ratti maschi sono stati condotti gli esperimenti della microdialisi cerebrale *in vivo*. I ratti sono stati anestetizzati con isoflurano al 2% e posizionati su uno stereotassico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Sul cranio esposto è stato praticato un piccolo foro sul lato destro dell'encefalo per permettere l'inserimento di una fibra di microdialisi, preparata nei nostri laboratori, con un superficie dializzante di due millimetri di lunghezza ((AN69AF; Hospal-Dasco, Bologna, Italy; cut-off 40,000 Da). La fibra è stata inserita verticalmente in corrispondenza della shell del nucleo accumbens (NAc) secondo le seguenti coordinate a partire dal bregma (in accordo con l'atlante anatomico di Paxinos e Watson, 1986): AP: +1.7; L: ± 0.7 ; V: -8.2. Durante la stessa sessione chirurgica, agli animali è stato inserito un catetere permanente in silastic nella vena giugulare destra, come precedentemente descritto, per permettere successivamente la somministrazione di WIN per via endovenosa. Gli esperimenti sono iniziati 24h dopo l'intervento chirurgico.

Prima e durante l'esperimento, la fibra da dialisi è stata continuamente perfusa con liquido cerebrospinale artificiale (NaCl 147mM, CaCl₂ 1.5mM, KCl 4mM, pH 6-6.5), alla velocità costante di 2.5 μ l/min, utilizzando una pompa di microiniezione CMA/100 (Carnegie Medicine, Svezia).

I campioni (50 μ L) sono stati prelevati ogni 20 minuti e sottoposti immediatamente ad analisi in Cromatografia ad Alta Pressione Liquida (HPLC) per la valutazione quantitativa dei livelli di DA. L'apparato HPLC utilizzato è dotato di una pompa isocratica ESA (modello 580), di un iniettore (Rheodyne 7125), di una colonna a fase inversa (LC 18 DB Supelco 4.6 x 150 mm)

mantenuta a temperatura costante (30 °C) tramite termostato (Agilent), e di un rivelatore elettrochimico (ESA) con un primo elettrodo a +400 mV ed il secondo elettrodo a -180mV. Per l'analisi della DA la fase mobile aveva la seguente composizione: acetato di sodio 50mM, acido etilendiamminotetraacetico di sodio (Na₂EDTA) 0.07mM, acido 1-octanosulfonico (OSA) 0.35mM, metanolo 12%, pH 4.21 con acido acetico, flusso 1ml/min. Una volta ottenuti i livelli basali (tre campioni consecutivi che non differiscano di oltre il 10%), il WIN è stato somministrato per via intravenosa attraverso il catetere.

Il corretto posizionamento della fibra è stato determinato istologicamente al termine degli esperimenti tramite sezioni coronali di cervello (50 µm) colorate con cresyl-violetto. Sono stati inclusi nell'analisi statistica solo gli animali in cui il controllo istologico ha confermato un corretto posizionamento della fibra dialitica nella shell del NAc.

Trattamento cronico passivo di WIN

Successivamente, abbiamo voluto verificare se la stimolazione prolungata dei recettori CB₁ da parte dell'agonista WIN potesse influenzare il fenotipo depressivo degli animali OBX. A tale scopo, un gruppo separato di animali ha ricevuto un trattamento cronico (14 giorni) di WIN o di veicolo (0.5 mg/kg, IP). La dose di WIN è stata selezionata sulla base di precedenti studi, in cui questo agonista cannabinoide si è mostrato attivo dal punto di vista comportamentale (effetto antidepressivo) (Segev et al., 2014). Il volume di infusione è stato di 10 ml/kg.

Studi di autoradiografia [³H]CP-55,940

Gli esperimenti di autoradiografia [³H]CP-55,940 per l'individuazione anatomica dei recettori CB₁ sono stati effettuati utilizzando il protocollo sperimentale descritto precedentemente da Castelli et al (2007). Le aree cerebrali considerate ed analizzate in questi esperimenti (Figura 12), secondo l'Atlante Paxinos e Watson (1997), sono state :

A: corteccia cingolata 3 e 1 (Cg1 e Cg3) (AP: +3.2)

B: caudato putamen (CPu), nucleus accumbens core (Nac Core) e shell (Nac Shell) (AP: +1.60)

C: corno d'Ammon 1, 2, 3 dell'ippocampo (CA1, CA2, CA3) e giro dentato (DG) (AP: -2.14)

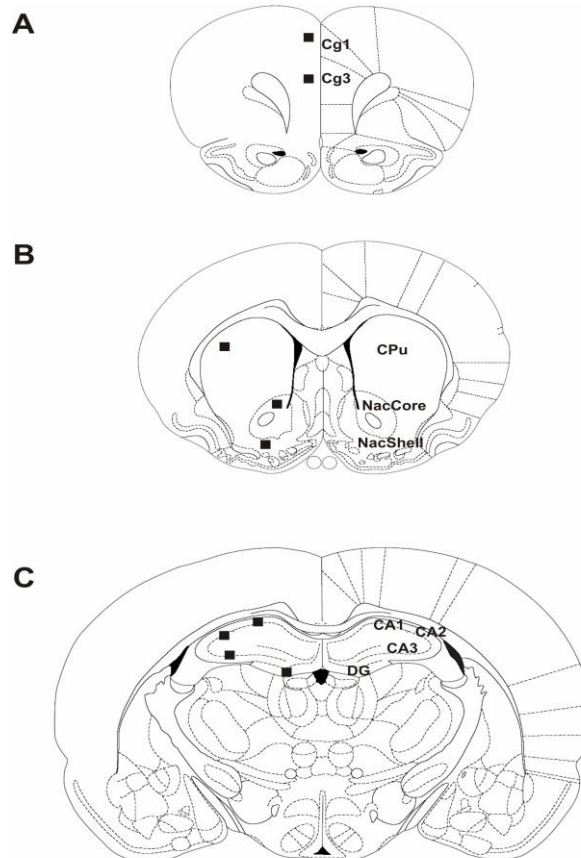


Figura 12. Rappresentazione schematica delle aree cerebrali studiate. (A) corteccia prefrontale; (B) caudato putamen; (C). ippocampo. I quadrati neri indicano approssimativamente la localizzazione dell'area analizzata per l'autoradiografia recettoriale CB1. Cg3 e Cg1: area 3 e 1 della corteccia cingolata (AP: +3.2); CPu: caudato putamen, NAc: nucleus accumbens (AP: +1.60); CA1, CA2, CA3: regioni 1, 2 e 3 del Corno di Ammone, DG: giro dentato dell'ippocampo (AP: -2.14).

Gli animali sono stati sacrificati per decapitazione, i cervelli, dopo esser stati prelevati, sono stati congelati rapidamente in isopentano a -20 °C e successivamente conservati fino all'uso a -80 °C. Le sezioni coronali di cervello (16 µm) sono state tagliate utilizzando un criostato (T costante 20 °C) e sono state adese su vetrini Superfrost e conservate a -20 °C. Le sezioni sono state incubate a 37 °C per 2.5 ore in tampone 50 mM Tris-HCl (Ph 7.4) contenente 5% siero di albumina bovina (BSA) e 10 nM di [³H]CP-55,940. Il binding non specifico è stato determinato in presenza di 10 µM di CP-55,940 non marcato. Al termine dell'incubazione, le sezioni sono state lavate per due volte consecutive in tampone Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) con 1% BSA ed una volta (5 min) in 50 mM Tris-HCl a 4 °C. Infine, l'ultimo lavaggio è stato effettuato in acqua milliQ a 4 °C e le sezioni di tessuto sono lasciate asciugare prima dell'analisi delle immagini.

Analisi delle immagini

Le sezioni di tessuto completamente asciutte sono state posizionate insieme agli standard [³H]micro-scales (RPA 501 and 505, Amersham) per il [³H](-)-CP55,940 nella cassetta Fujifilm BAS ed esposte con la lastra autoradiografica BAS-5000. Le immagini ottenute sono state acquisite ed analizzate con il sistema Fujifilm-BAS 5000 (AIDA, Raytest, USA). Le densità ottiche sono state trasformate nei livelli di radioattività legata (fentomoli per mg di proteine) tramite

i valori di grigio generati dalla co-esposizione degli standard per il [³H]. I dati corrispondono alla densità, sono espressi come media (\pm SEM) e analizzati all'interno di ciascuna area cerebrale attraverso lo student t-test.

Analisi Statistica

Alla fine dello studio, i ratti sono stati anestetizzati mediante inalazione di isoflurano e decapitati. I loro cervelli sono stati prelevati per eseguire il controllo istologico e confermare la corretta ablazione dei bulbi olfattori. Solo i ratti che presentavano una corretta rimozione di entrambi i bulbi olfattori, senza danneggiamento della corteccia prefrontale o di aree limitrofe, sono stati inclusi nell'analisi statistica.

Le differenze nel comportamento di auto-somministrazione tra i ratti OBX e SHAM in relazione al tempo sono state analizzate utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) a una via o due vie per misure ripetute. Nell'ANOVA a due vie, le misure riportate dai due gruppi di ratti sono state inserite come fattore tra i gruppi con il tempo come misura ripetuta all'interno dei soggetti.

Le variazioni temporali (nell'arco dei 30 giorni) e le differenze tra i gruppi OBX e SHAM durante il protocollo di auto-somministrazione dopo il trattamento con l'agonista del recettore 5-HT_{1B}, CGS-12066B, sono state analizzate utilizzando l'ANOVA a due vie.

I risultati della microdialisi sono stati analizzati utilizzando l'ANOVA a due vie (trattamento X tempo), seguita dal *post-hoc* test di Tukey's o Bonferroni. Una $p < 0.05$ è stata considerata significativa.

Le analisi statistiche sono state eseguite usando GraphPad Prism 5.

Risultati

Caratterizzazione del fenotipo depressivo-simile

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'iperattività in risposta a un nuovo ambiente luminoso e uno stato anedonico sono due elementi caratterizzanti dei ratti bulbectomizzati ampiamente descritti in letteratura (Kelly et al., 1997; Song e Leonard, 2005; Romeas et al., 2009).

Per verificare lo sviluppo del fenotipo depressivo simile, pertanto, sono stati misurati la preferenza al saccarosio e l'attività locomotoria in animali lesionati OBX e osservate le differenze comportamentali tra SHAM e OBX.

La **figura 13** mostra come i ratti OBX consumino una soluzione di saccarosio al 2% in quantità significativamente più bassa rispetto agli SHAM ($p < 0.001$) dopo averla avuta a disposizione in due intervalli di tempo prestabiliti (4 e 24 ore). Gli animali di controllo hanno consumato una soluzione di saccarosio doppia sia alle 4 che alle 24 ore rispetto agli animali lesionati, confermando così la ridotta risposta edonica degli OBX come conseguenza dell'ablazione dei bulbi olfattori. Le differenze tra le due variabili dipendenti sono state analizzate usando lo Student t-test.

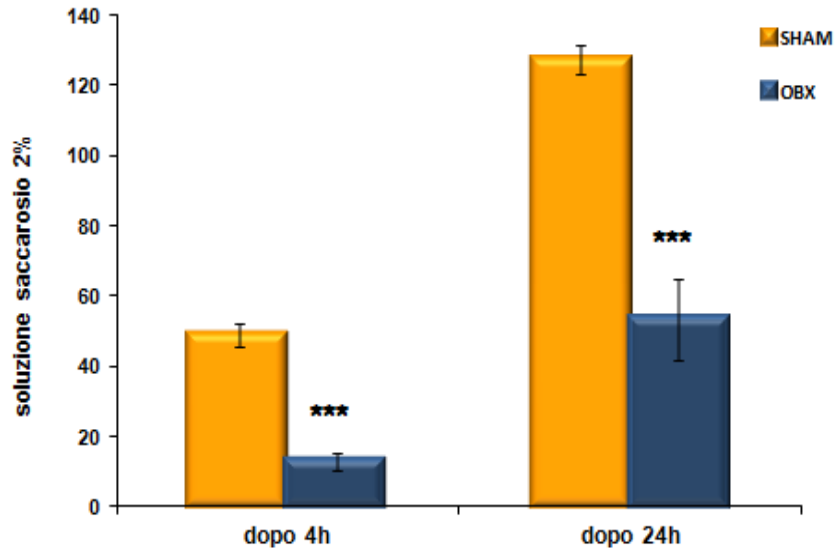


Figura 13. Test della preferenza al saccarosio nei ratti SHAM (n=6) e OBX (n=7). I ratti OBX mostrano un'assunzione di soluzione di saccarosio significativamente ridotta (anedonia). I dati sono espressi come percentuale (\pm SEM) di soluzione di saccarosio consumata a 4 e dopo 24 ore dall'inizio del test (***) $p < 0.001$). Le analisi statistiche sono state seguite con lo Student t-test.

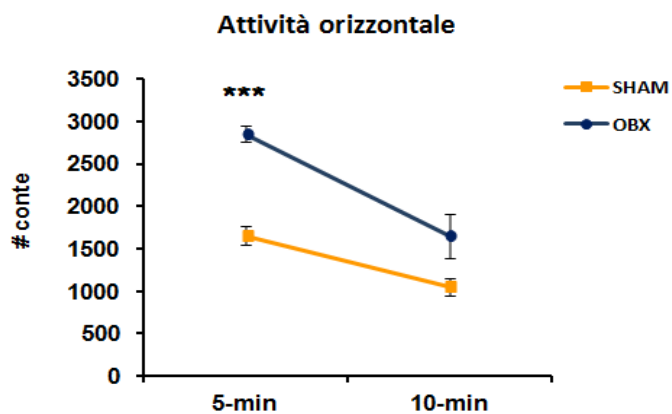
La **figura 14** mostra i risultati ottenuti nel test di attività locomotoria in un ambiente nuovo e molto luminoso. I tre parametri motori analizzati sono: l'attività orizzontale (a); l'attività verticale (b) e la distanza percorsa (c).

I due gruppi di ratti hanno mostrato differenze significative in tutti e tre i parametri durante i primi 5 minuti dall'inizio della sessione (0'-5'), tempo nel quale viene valutata la risposta ad un ambiente nuovo (attività orizzontale, $p < 0.001$; attività verticale, $p < 0.05$; distanza percorsa, $p < 0.01$). Invece, nei 5 minuti successivi (5'-10'), dove l'effetto dell'ambiente "nuovo" è praticamente assente, è stata evidenziata tra i due tipi di ratti una differenza significativa solo nel parametro dell'attività verticale ($p = 0.032$).

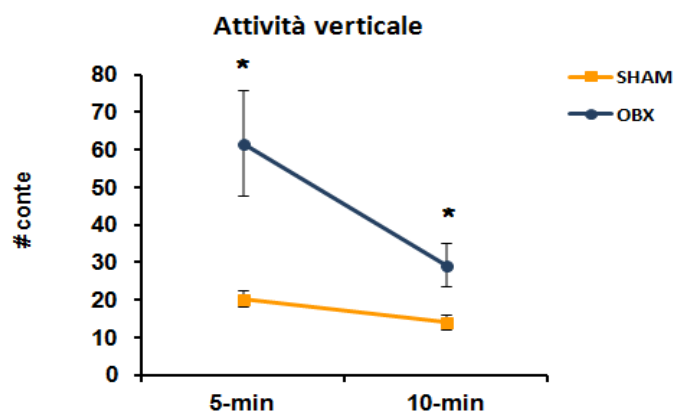
In generale, gli animali lesionati hanno mostrato un'attività motoria decisamente più alta rispetto agli animali SHAM in tutti i tre parametri analizzati.

Le differenze tra le due variabili indipendenti sono state analizzate usando lo Student t-test.

a



b



c

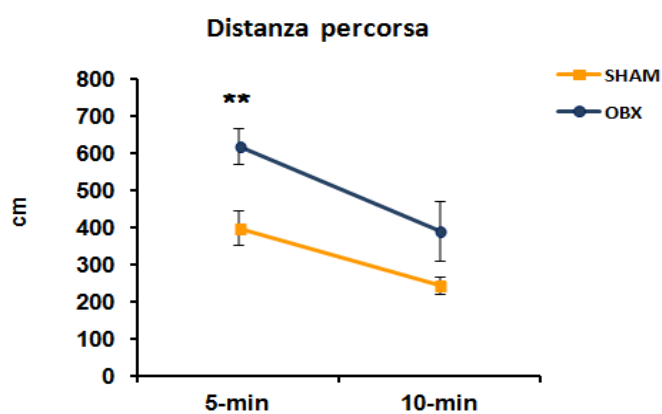


Figura 14. L'attività orizzontale (a) e verticale (b) in ratti SHAM (n=6) e OBX (n=7) è espressa come media delle conte dei raggi infrarossi interrotti, mentre la distanza percorsa (c) è espressa in centimetri. I dati sono stati espressi come medie (\pm SEM) a due tempi prestabiliti (misure a 5 e 10 minuti). I ratti OBX mostrano iperattività nei confronti di un ambiente nuovo e avverso nei primi 5 minuti. (* p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.001). Le analisi statistiche sono state seguite con lo Student t-test.

Auto-somministrazione endovenosa cronica di WIN 55,212-2

Nel protocollo di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 sono state analizzate tre fasi: acquisizione, mantenimento e d'estinzione (Fattore et al., 2001). In ogni fase sono stati messi a confronto gli animali OBX con gli SHAM giorno dopo giorno per un totale di 30 giorni.

La figura 15a mostra le risposte dei due gruppi sperimentali OBX e SHAM sulla leva attiva durante la fase di acquisizione.

L'analisi statistica eseguita con ANOVA a due vie mostra come non vi siano differenze significative nel numero di pressioni sulla leva attiva tra i due gruppi di ratti per i primi 8 giorni di training. Tuttavia dal 9° giorno in poi si evidenzia una differenza significativa tra i due gruppi, con gli OBX che mostrano rispetto agli SHAM un numero di pressioni significativamente più elevato sulla leva attiva (misure ripetute ANOVA: $p < 0.001$).

In contrasto, il numero di pressioni effettuate sulla leva non è significativamente diversa nei due gruppi sperimentali, in quanto non si evidenzino delle differenze statisticamente significative durante i 30 giorni di training, con una media di pressioni della leva inattiva al di sotto di 6 in entrambi i gruppi, dopo la prima settimana di training (*Figura 15b*). L'assenza di differenze significative di comportamento nei confronti della leva inattiva, indica che l'aumento delle risposte attive osservate negli animali OBX non è un effetto aspecifico, come anche confermato dall'assenza di differenze significative tra i due gruppi nell'attività motoria basale durante le sessioni giornaliere di auto-somministrazione.

L'attività motoria è stata misurata dalla media di interruzioni dei raggi delle fotocellule localizzate all'interno dello Skinner box (attività media nella fase di mantenimento: 989 ± 41 e 1005 ± 27 per il gruppo OBX e SHAM, rispettivamente).

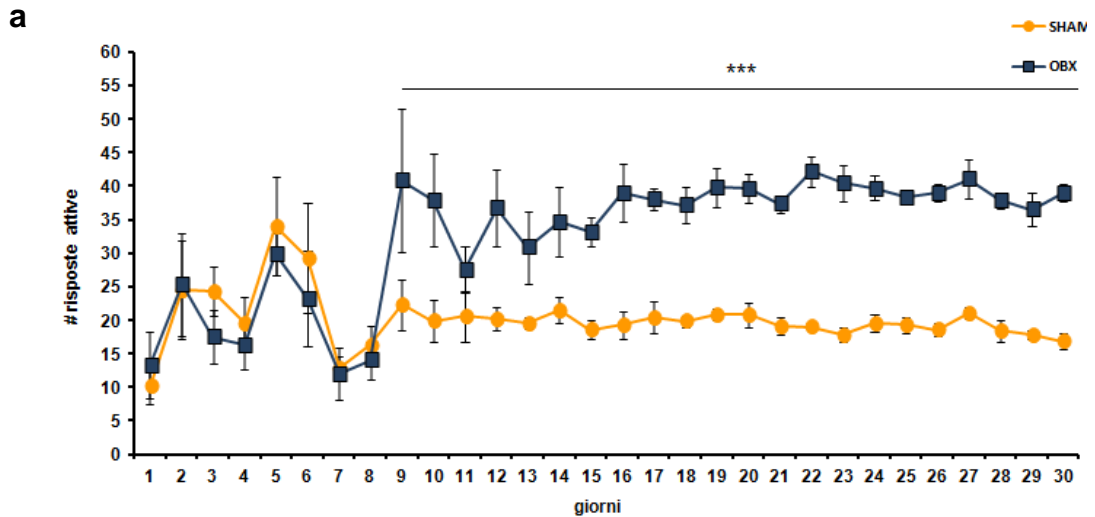


Figura 15a. Fase di acquisizione nei ratti SHAM e OBX durante l'auto-somministrazione di WIN 55,212-2. I dati sono espressi come medie (\pm SEM) del numero di pressioni sulla leva attiva in ratti SHAM (n=6) e OBX (n=7). L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA (***) $p < 0.001$).

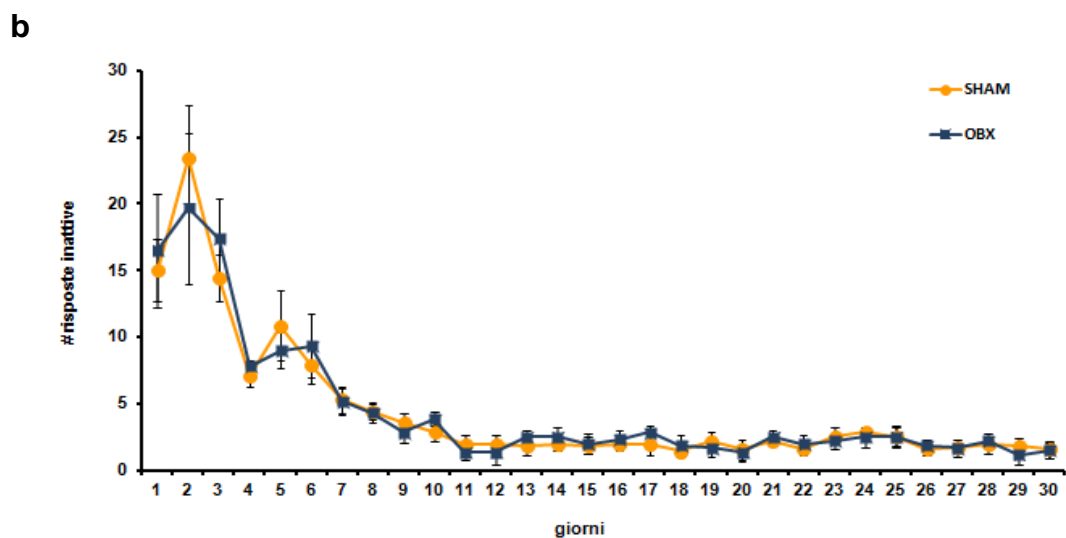


Figura 15b. Numero di pressioni effettuata dai ratti SHAM (n=6) e OBX (n=7) sulla leva inattiva, durante le sessioni giornaliere di auto-somministrazione di WIN. Le risposte inattive sono espresse come medie (\pm SEM).

La **Figura 15c** mostra il consumo effettivo di WIN durante la fase di mantenimento nei gruppi OBX e SHAM. La quantità media di WIN che viene assunta giornalmente da ciascun animale in maniera pressoché costante, dopo i primi 7 giorni di training è risultato essere significativamente più alta negli OBX (+105%) rispetto agli animali di controllo SHAM (misure ripetute ANOVA: $p < 0.001$). Tuttavia, la percentuale di animali OBX e SHAM che hanno acquistato una stabile auto-somministrazione di WIN è risultata essere del tutto simile (85.5% e 86.8%, rispettivamente).

c

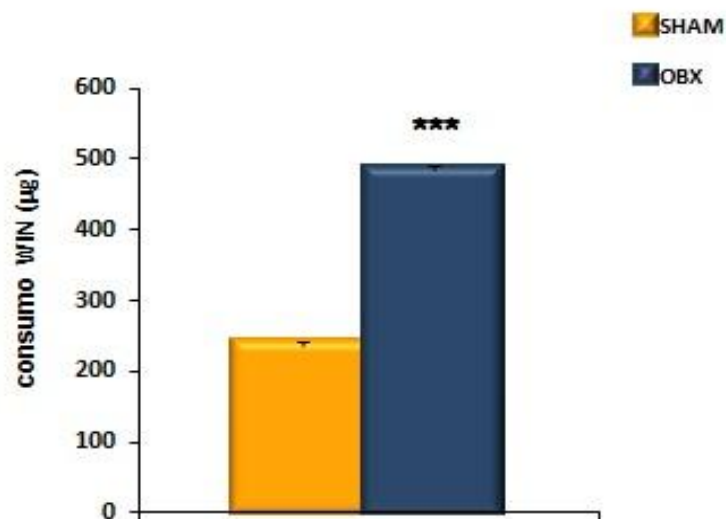


Figura 15c. Quantità di cannabinoide assunta dai ratti SHAM (n=6) e OBX (n=7) durante la fase di mantenimento nei durante l'auto-somministrazione del cannabinoide WIN 55,212-2. I dati sono espressi come media del consumo di WIN negli ultimi 7 giorni della fase di acquisizione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA (** $p < 0.001$).

La **Figura 15d** mostra l'ultima fase del protocollo di auto-somministrazione, la fase di estinzione quando il WIN viene sostituito con soluzione salina, durante la quale gli animali OBX e SHAM hanno evidenziato delle differenze significative, durante il loro comportamento. L'ANOVA a due vie ha evidenziato

che il numero di risposte sulla leva attiva è statisticamente diversa tra i due gruppi sperimentali ($p=0.012$ dal 1° giorno al 7°; $p=0.004$ dal 8° al 14° giorno $p=0.001$ dal 15° al 28° giorno).

In particolare nel primo giorno di estinzione gli OBX e SHAM hanno risposto alla sostituzione del WIN con la salina aumentando il numero di risposte attive da una media di 39 a 78.5 e da 16.86 a 45.17, rispettivamente, che corrispondono a +101% e 168% rispetto all'ultimo giorno (30°) di auto-somministrazione di WIN. Dopo la prima settimana di estinzione i due gruppi sperimentali hanno ridotto le richieste di auto-somministrazione passando a -41% gli OBX e a -65% gli SHAM. Dopo due e tre settimane di estinzione le differenze di risposta sulla leva attiva tra OBX e SHAM risultano decisamente ridotte (OBX: -65% e -79%; SHAM: -78% e -90%, rispettivamente).

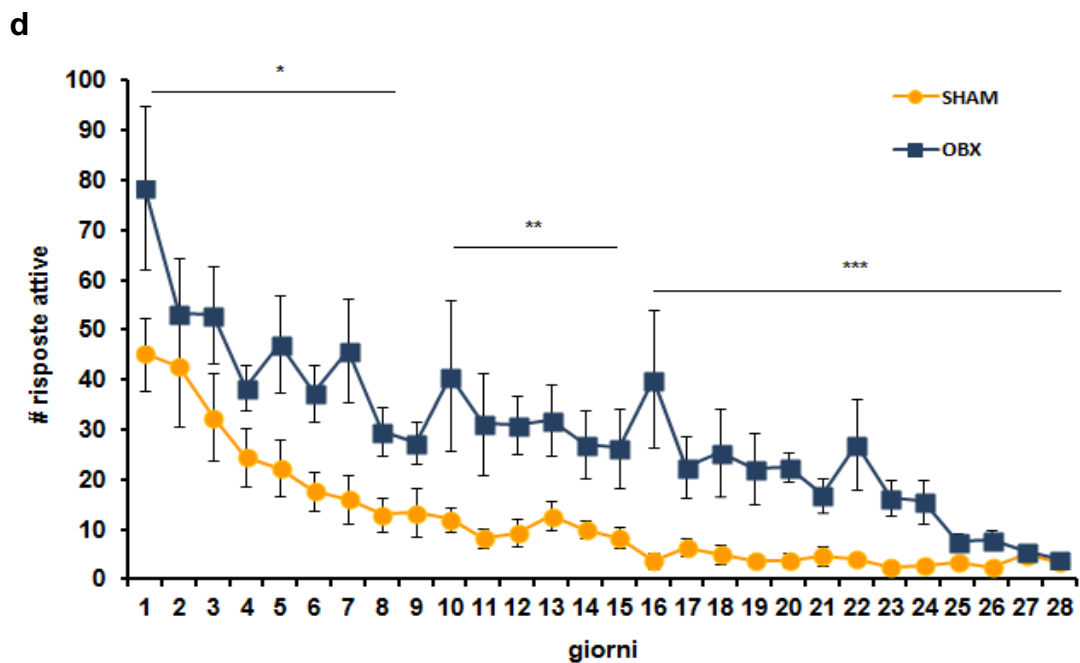


Figura 15d. Fase di estinzione dell'auto-somministrazione di WIN. I dati sono espressi come medie (\pm SEM) del numero di pressioni della leva attiva in ratti SHAM ($n=6$) e OBX ($n=7$). L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$).

E' stato analizzato anche il tempo impiegato ciascun animale per premere per la prima volta la leva attiva, ossia il parametro della "latenza" (**Figura 16**). È stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi sperimentali. In particolare, la latenza risulta essere più breve nei ratti bulbectomizzati che in quelli di controllo dal nono giorno in poi (misure ANOVA: $p=0.029$ dal 9° al 16° giorno; $p<0.001$ dal 17° al 30°). Questo suggerisce che dopo l'esposizione iniziale al WIN i ratti OBX potrebbero essere più motivati, degli SHAM a ottenere l'infusione del WIN.

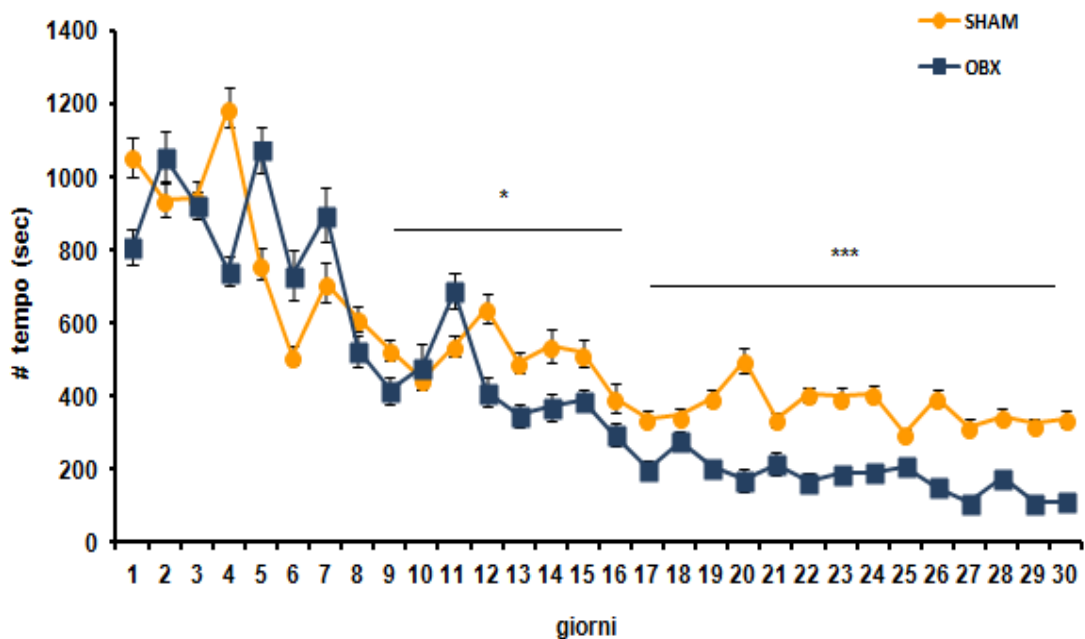


Figura 16. Latenza alla prima risposta sulla leva attiva; espresso, in secondi (sec) in ratti SHAM (n=6) e OBX (n=7). I dati sono espressi come medie (\pm SEM) e analizzati mediante ANOVA (* $p<0.05$ e *** $p<0.001$).

La **Figura 17** evidenzia l'analisi temporale dei pattern individuali di risposta degli OBX e SHAM. Le differenze sono emerse solo a livello quantitativo (numero di richieste di WIN) ma non a livello qualitativo.

I pattern sono stati analizzati durante l' auto-somministrazione nelle due ore di sessione giornaliera in entrambi i gruppi sperimentali.

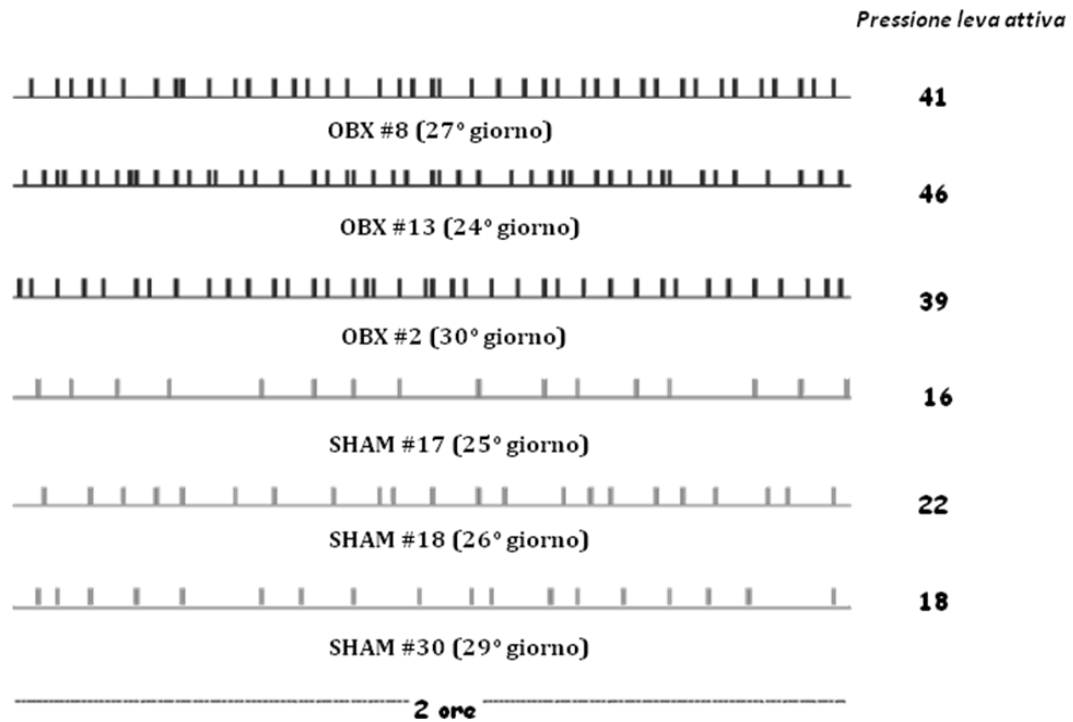


Figura 17. L'analisi dei pattern individuali di risposta al WIN evidenzia differenze quantitative ma non qualitative tra i ratti SHAM e OBX. Le prime tre linee schematizzano le risposte cumulative della pressione della leva attiva, durante la fase di mantenimento di tre ratti OBX rappresentativi, nell'arco delle 2h di sessione sperimentale. Gli ultimi tre patterns mostrano le risposte nei ratti SHAM. I numeri cumulativi delle pressioni effettuate sulla leva attiva sono riportate sulla destra dei patterns corrispondente.

Effetto del pre-trattamento acuto con CGS-12066B sull'auto-somministrazione di WIN

L'effetto di una somministrazione acuta dell'agonista del recettore serotoninergico 5-HT_{1B}, il CGS-12066B (CGS), è stato valutato solo dopo che gli animali hanno acquistato un comportamento stabile di WIN.

Complessivamente non sono stati trovati dei cambiamenti significativi nell'auto-somministrazione dopo trattamento con il CGS nei ratti OBX e SHAM.

La **Figura 18** mostra i cambiamenti in percentuale della media del numero di pressioni sulla leva attiva rispetto ai valori basali in risposta al trattamento acuto con CGS (2.5, 5 e 10 mg/kg). L'ANOVA non ha mostrato effetti significativi del trattamento acuto per ciascun gruppo (*post-hoc*: SHAM: 2.5 mg/kg, $p=0.241$; 5 mg/kg, $p=0.071$; 10 mg/kg, $p=0.128$; OBX: 2.5 mg/kg, $p=0.963$; 5 mg/kg: $p=0.652$; 10 mg/kg, $p=0.523$).

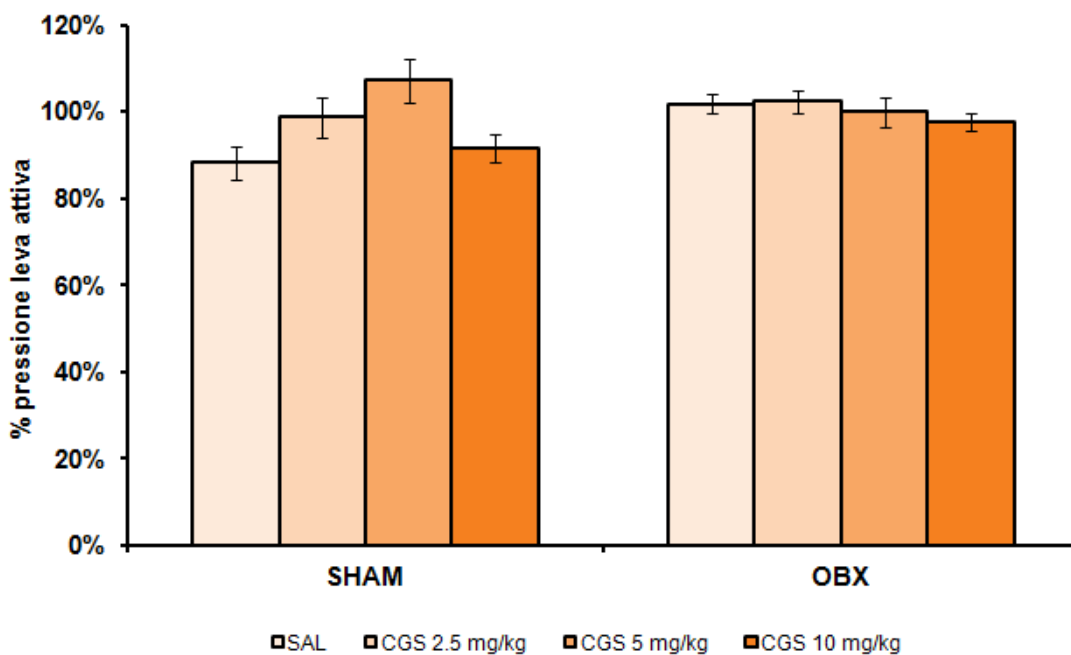


Figura 18. Effetto del pre-trattamento acuto con CGS-12066B durante l'auto-somministrazione di WIN in ratti SHAM (n=6) e OBX (n=7). Il trattamento con CGS non mostra effetti significativi nell'auto-somministrazione di WIN. I dati sono espressi come cambiamenti percentuali del numero di pressioni sulla leva attiva, rispetto ai precedenti 6 giorni di auto-somministrazione di WIN (assunto come 100%).

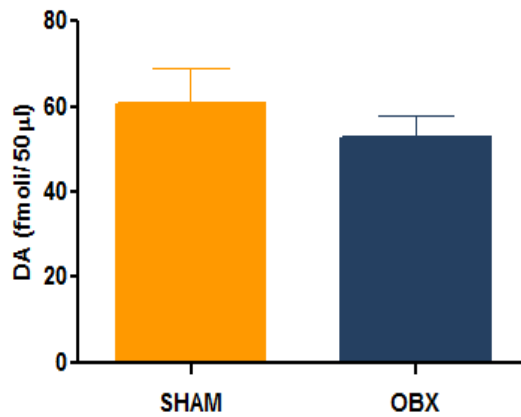
Misurazione dei livelli di dopamina nella shell del nucleus accumbens nei ratti OBX e SHAM

La **Figura 19** mostra il risultato di esperimenti di microdialisi cerebrale *in vivo* condotti allo scopo di misurare i livelli di dopamina extracellulare nella shell del NAc dei ratti SHAM e OBX in seguito a somministrazione intravenosa di 0.3 mg/kg di WIN. È stata scelta questa dose di WIN perché rappresenta la quantità media che tipicamente i ratti si autosomministrano giornalmente (Deiana et al., 2007; Fattore et al., 2007; Spano et al., 2010) ed in grado di aumentare i livelli di dopamina nella shell del NAc (Tanda et al., 1997).

Durante il periodo di pre-trattamento i valori basali extracellulari di dopamina nella shell del NAc non hanno mostrato delle differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali (**Figura 19a**). Dopo la somministrazione intravenosa di WIN (**Figura 19b**), sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi sperimentali, e precisamente un aumento (+40%) dei livelli extracellulari di dopamina nei ratti SHAM rispetto ai loro livelli basali durante i primi 40 minuti dalla somministrazione della sostanza (ANOVA: $F_{(8,24)} = 4.997$, $p=0.0010$). Tuttavia il WIN non ha aumentato i livelli di dopamina negli OBX, e in questo gruppo i valori non sono stati variati statisticamente rispetto a quelli basali durante le 2 ore di misurazione (ANOVA a una via: $F_{(8,24)} = 0.3730$, $p=n.s.$).

I risultati sono stati espressi come variazione percentuale della media (\pm SEM) dei livelli basali. L'ANOVA a due vie ha rivelato un effetto significativo dell'interazione tempo X trattamento [$F_{(8,48)} = 3.07$, $p=0.0071$; ** $p<0.01$ * $p<0.05$, post-test Bonferroni].

a



b

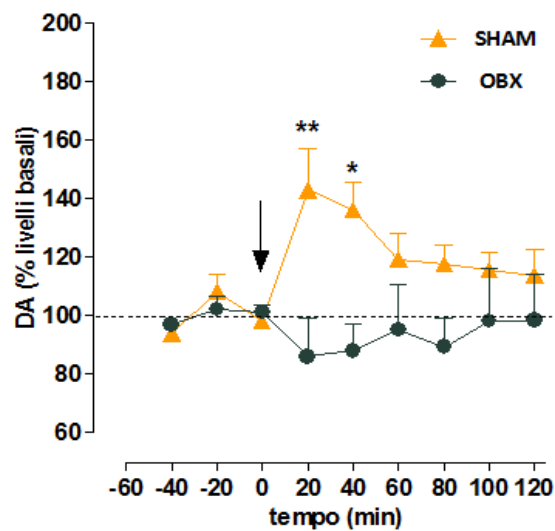


Figura 19. Valutazione dei livelli di dopamina nella shell del nucleus accumbens. (a) I livelli basali extracellulari (fmol/μl di dializzato) di dopamina (DA) espressi come media (\pm SEM) in ratti SHAM (n=4) e OBX (n=4) non mostrano differenze significative tra i due gruppi sperimentali. ANOVA a una via, $p=0.45$. I ratti OBX non mostrano cambiamenti dei livelli di DA dopo somministrazione acuta di WIN. (b) Effetto di una somministrazione di WIN 0.3 mg/kg sul rilascio di dopamina nella shell del nucleus accumbens di ratti SHAM (n=4) e OBX (n=4). ANOVA a due vie seguito dal test di Bonferroni (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$).

Effetto del trattamento cronico passivo con WIN 55,212-2

L'effetto del trattamento cronico passivo con WIN 55,212-2 (0.5 mg/kg, IP) è stato valutato in animali SHAM e OBX mediante valutazione dell'attività locomotoria e il "Forced Swimming Test".

La **Figura 20** mostra i risultati ottenuti nel test di attività locomotoria condotto in un ambiente nuovo e molto luminoso in seguito al trattamento cronico con WIN. I tre parametri analizzati sono stati: l'attività orizzontale (a); l'attività verticale (b) e la distanza percorsa (c) in ratti SHAM (n=3) e OBX (n=6). I risultati sono stati analizzati con l'ANOVA a due vie (*between-within*) in cui le misure dei due gruppi di ratti sono state inserite come fattore tra i soggetti, ed il fattore tempo come misura ripetuta all'interno dei soggetti. I due gruppi di ratti non hanno mostrato differenze statisticamente significative nell'attività orizzontale e verticale nell'arco di 30 minuti. Tuttavia, pur non raggiungendo una significatività statistica si evidenzia un trend positivo se si confrontano gli OBX con gli SHAM, e gli OBX trattati con il WIN rispetto a quelli trattati con il veicolo. L'ANOVA a due vie invece ha mostrato un risultato statisticamente significativo nella distanza percorsa dagli animali, in cui gli SHAM trattati con il WIN differiscono in modo significativo dagli animali OBX trattati con il veicolo ($p < 0.05$). Anche nella distanza percorsa si è notato un trend positivo tra gli animali OBX trattati con il WIN e quelli trattati con il veicolo.

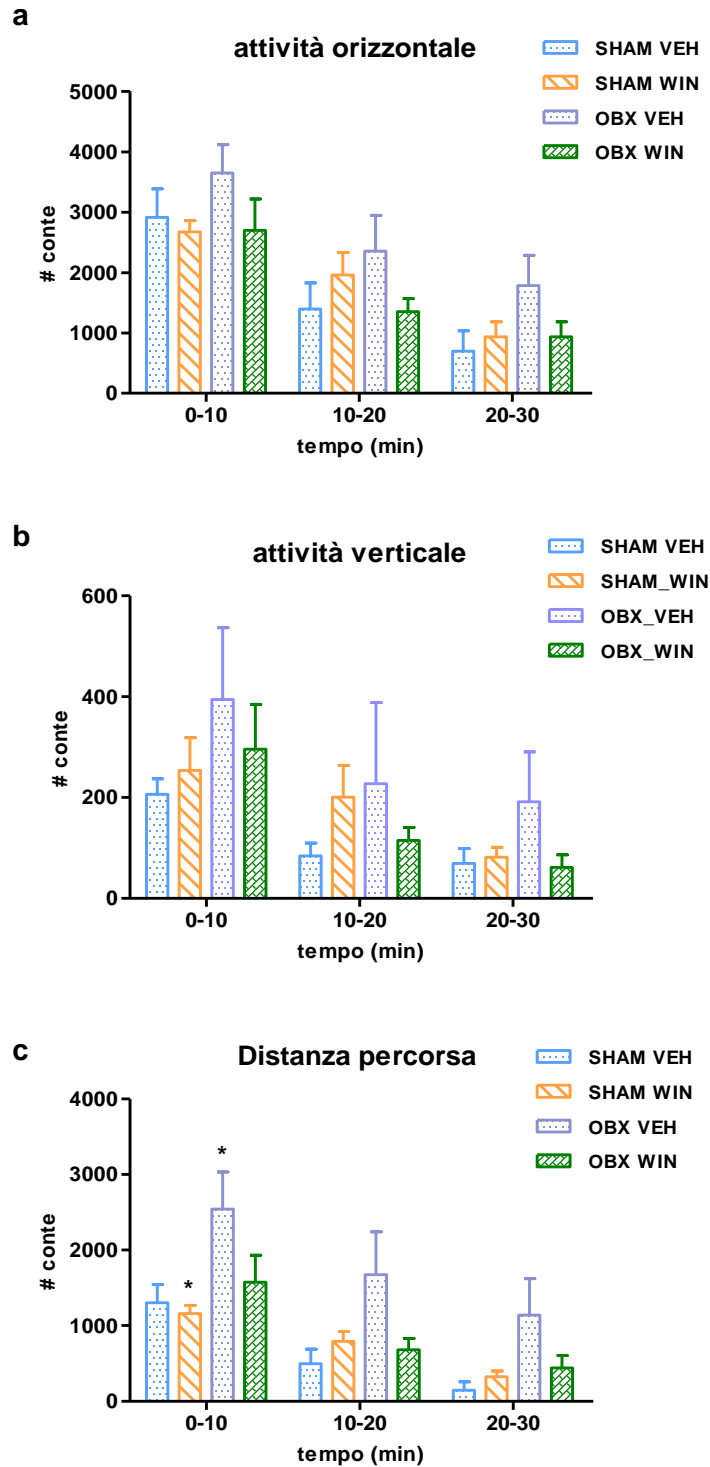


Figura 20. Effetto del trattamento con WIN 55,212-2 in ratti SHAM (n=3) e OBX (n=6). Sono stati analizzati tre parametri: l'attività orizzontale (a), verticale (b) e la distanza percorsa (c) espressa in centimetri. L'analisi statistica è stata eseguita con il metodo ANOVA a due vie seguito dal test di Bonferroni. I dati sono espressi come media (\pm SEM) delle conte dei raggi infrarossi interrotti ad intervalli di tempo di 10 minuti (0-30 minuti). In (a) e (b) è possibile osservare un trend tra OBX VEH e SHAM VEH e tra animali OBX trattati con il WIN e con il veicolo. In (c) si ha una differenza statisticamente significativa tra gli SHAM trattati con il WIN e quelli trattati con il veicolo ($p < 0.05$).

La **Figura 21** mostra i 4 parametri del Forced Swimming test: Immobility (a), Swimming (b), Climbing (c) e Diving (d) analizzati in un tempo di 15 minuti. L'analisi è stata eseguita utilizzando l'ANOVA a due vie (between-between) in cui il trattamento ed i due gruppi di ratti sono stati inseriti come fattori tra i soggetti. Gli OBX (n=5) e gli SHAM (n=3) di base non hanno mostrato delle differenze, ma con il trattamento di WIN si è evidenziato un trend tra gli animali OBX e quelli SHAM l'immobilità, lo swimming ed il diving. Non si può escludere a priori che aumentando il numero di campioni (n) si raggiunga una differenza statisticamente significativa. Nel climbing, le differenze si notano tra i due gruppi di ratti che avevano ricevuto il veicolo e non il WIN. Gli animali OBX, solo nel diving hanno mostrato una differenza statisticamente significativa quando hanno ricevuto il veicolo o il WIN ($p < 0.05$).

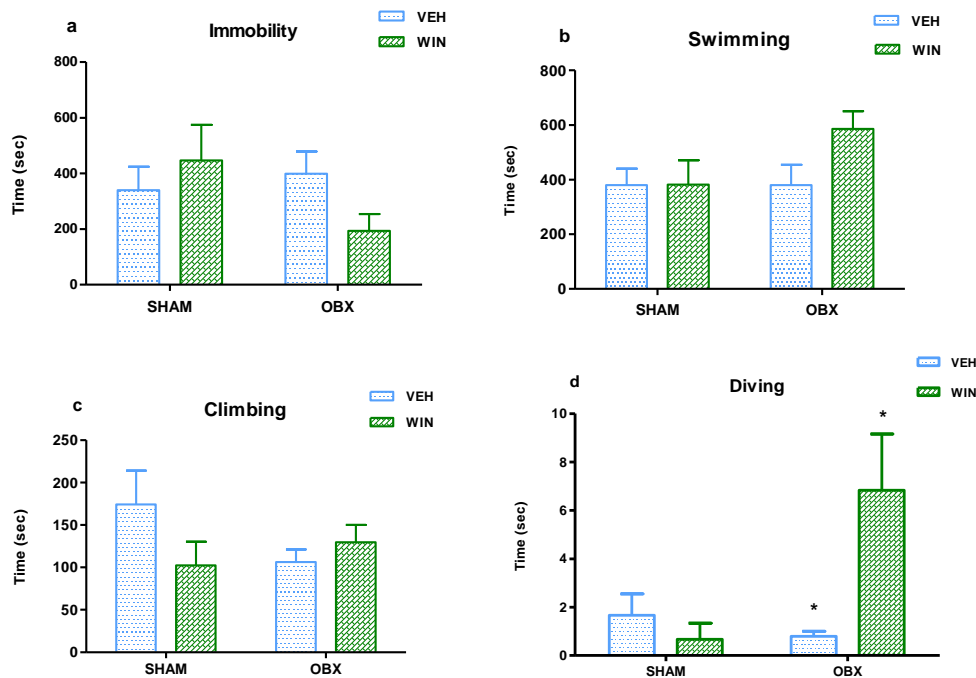


Figura 21. Effetto del trattamento con WIN 55,212-2 in ratti OBX (n=5) e SHAM (n=3). I dati sono espressi come media (\pm SEM). L'immobility (a), lo swimming (b) e il diving (d) mostrano un trend significativo tra gli OBX e gli SHAM. Il climbing (c) mostra un trend tra i due gruppi trattati con il veicolo. In (d) i ratti OBX trattati con il WIN rispetto a quelli trattati con il veicolo mostrano delle differenze statisticamente significative. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a due vie seguito dal test di Bonferroni ($*p<0.05$).

Studi di autoradiografia [3 H]CP-55,940

Allo scopo di verificare se i due gruppi di ratti OBX e SHAM presentassero anche una differente densità dei recettori CB₁ abbiamo effettuato, in aree cerebrali selezionate, l'autoradiografia con [3 H]CP-55,940. Come si vede in **Figura 22** i recettori CB₁ sono significativamente diminuiti nel caudato putamen (Cpu) e nel core del nucleus accumbens (NAc) nei ratti OBX (n=3) rispetto agli SHAM (n=3) ($p<0.05$). Nessuna differenza significativa è presente in altre aree cerebrali analizzate (vedi **Tabella 1**).

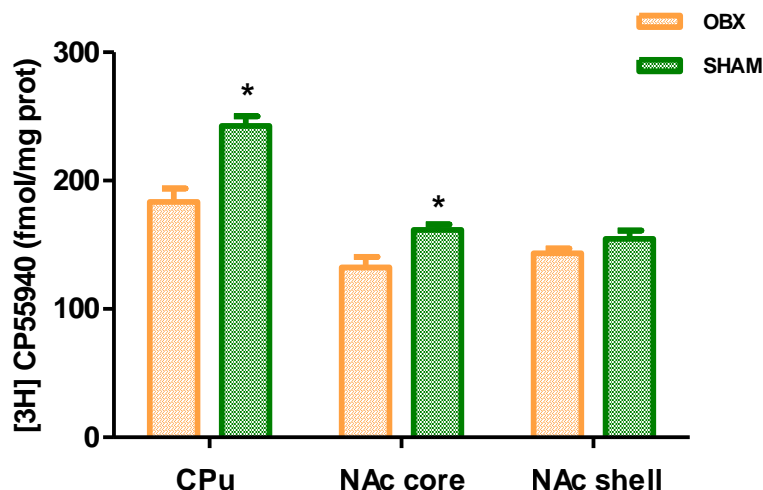


Figura 22. Autoradiografia [3 H]CP-55,940 su ratti OBX (n=3) e SHAM (n=3) in CPU, NAc core e shell. I ratti OBX presentano una diminuzione significativa rispetto agli SHAM. I dati sono espressi come media (\pm SEM), l'analisi è stata eseguita con lo student t-test ($*p<0.05$).

Tabella 1. Autoradiografia del recettore CB₁ in diverse aree cerebrali di animali OBX e SHAM

Regione cerebrale	OBX	SHAM
Caudate Putamen (CPu)	183.3±10.59	242.7±7.53
Nucleus Accumbens (NAc core)	132.3±8.41	161.7±4.01
Nucleus Accumbens (NAc shell)	143.3±3.84	154.7±6.44
Ippocampo (CA ₁)	292.4±4.50	272.2±15.30
Ippocampo (CA ₂)	263.8±5.33	254.6±14.60
Ippocampo (CA ₃)	242.4±1.29	247.8±12.89
Giro dentato dell'ippocampo (DG)	297.6±6.37	281.8±13.48
Corteccia cingolata (Cg ₁)	117.8±3.12	125.4±5.05
Corteccia cingolata (Cg ₃)	118.8±2.92	128.4±4.80

I dati rappresentano la media (\pm SEM) delle densità ottiche (sei sezioni di tessuto per ciascun area cerebrale per ogni animale OBX e SHAM), espresse in fmol/mg di proteine

Discussione

I risultati ottenuti nel nostro studio hanno dimostrato che i ratti bulbectomizzati: (1) mostrano una predisposizione ad assumere maggiore quantità di WIN 55,212-2, agonista del recettore cannabinoide CB₁, rispetto agli animali di controllo, (2) non variano l'assunzione del consumo di WIN dopo pretrattamento acuto con CGS-12066B, agonista del recettore 5-HT_{1B}, (3) diversamente dagli SHAM, non aumentano i livelli di dopamina nella shell del nucleus accumbens dopo somministrazione acuta di una dose di WIN.

Auto-somministrazione di WIN in ratti OBX e SHAM

Sono stati condotti precedentemente e riportati in letteratura degli esperimenti nei ratti OBX e SHAM sull'auto-somministrazione di diverse sostanze, come la nicotina (Vieyra-Reyes et al., 2008), anfetamina (Holmes et al., 2002) e metanfetamina (Kucerova et al., 2012). Diverse evidenze cliniche hanno dimostrato una associazione tra il consumo di cannabis e la depressione maggiore (Horwood et al., 2012; Len-Rav et al., 2013). Tuttavia, il comportamento di auto-somministrazione di cannabinoidi nei ratti depressi non era mai stato studiato in un modello animale di depressione.

Gli agonisti dei recettori cannabinoidi CB₁ vengono autosomministrati dai ratti, topi e scimmie (Martellotta et al., 1998; Fattore et al., 2001; Justinova et al., 2003). Il numero delle risposte attive nel protocollo di auto-somministrazione dipende dalle condizioni sperimentali, dalla dose di sostanza messa a disposizione all'animale (Martellotta et al., 1998), dal regime di restrizione del

cibo (Fattore et al., 2001) e dal tipo di protocollo sperimentale (Deiana et al., 2007). In questo studio, abbiamo utilizzato tutti i parametri e le condizioni sperimentali note in letteratura per indurre un robusto comportamento di ricerca e consumo di cannabinoidi in ratti del ceppo Lister Hooded.

Prima dell'inizio del training di auto-somministrazione e degli esperimenti di microdialisi, abbiamo verificato lo sviluppo del fenotipo depressivo-simile negli animali lesionati (OBX) valutando la presenza dello stato anedonico e dell'iperattività motoria nei confronti di un ambiente nuovo, due parametri caratterizzanti questo modello animale di depressione (Kelly et al., 1997; Song e Leonard, 2005; Romeas et al., 2009). Solo gli animali che hanno mostrato questi due parametri sono stati utilizzati per i successivi esperimenti comportamentali e neurochimici.

I ratti OBX si differenziano significativamente dagli animali di controllo SHAM in quanto mostrano un numero di risposte sulla leva attiva più elevata sia durante l'iniziale fase di acquisizione che durante la fase di mantenimento. Infatti, anche se i ratti OBX e gli SHAM hanno avuto bisogno di un numero di sessioni di training simile per acquisire un comportamento stabile di auto-somministrazione, il numero di pressioni della leva attiva durante la fase di mantenimento è marcatamente più alto negli OBX che negli SHAM. Di conseguenza, la quantità di WIN consumata dagli OBX nell'arco dei 30 giorni, risulta maggiore che negli SHAM.

Queste conte, nella fase di acquisizione, indicano che i ratti OBX richiedono lo stesso tempo dei ratti SHAM per stabilizzare il loro "intake" di WIN e suggeriscono che lo sviluppo del fenotipo depressivo-simile non comporta deficit memonici o di apprendimento, e che non è in grado di incidere

sull'acquisizione, anche se è stato riportato in letteratura che gli animali OBX hanno un ridotto apprendimento spaziale (Song e Leonard, 2005). Dall'altra parte, l'elevato consumo di cannabinoidi da parte degli animali OBX, durante la fase di mantenimento, suggerisce che gli animali bulbectomizzati rispondono ai cannabinoidi in maniera differente rispetto agli SHAM. In linea con la teoria dell'auto-medicazione, il maggior consumo di cannabinoidi da parte degli animali OBX potrebbe alleviare i sintomi della depressione (Gruber et al., 1996; Ogborne et al., 2000).

Precedenti studi in letteratura evidenziano come diverse sostanze d'abuso siano utilizzate per migliorare molti sintomi dei disordini psichiatrici. Infatti quando l'ipereccitabilità, l'irritabilità o sintomi depressivi diventano intollerabili, i soggetti potrebbero ricorrere all'uso di alcool o cannabis per le loro proprietà ansiolitiche e sedative; per elevare il tono dell'umore (Strakowski e DelBello, 2000). Coerentemente con questo, Morrison (1974) aveva mostrato che l'insorgenza della depressione, in soggetti non alcolisti, avveniva ad un'età media di 23 anni mentre in quelli con un precedente storia di abuso di alcool, la depressione incominciava a manifestarsi ad un'età media di 28 anni. Sonne e collaboratori (1994) avevano intervistato 25 soggetti bipolari con una precedente storia di abuso di sostanze e scoprirono che 24 di loro (96%) utilizzavano le sostanze d'abuso (alcool, cannabis, cocaina) per migliorare il loro umore. Inoltre, si è visto come i soggetti depressi consumano le sostanze d'abuso soprattutto quando i sintomi negativi tendono ad essere più accentuati (Weiss e Mirin, 1987).

I nostri risultati sono in linea con la letteratura che ha precedentemente riportato come gli animali OBX differiscano nelle risposte comportamentali in seguito a

somministrazione di altre sostanze d'abuso, quali la metanfetamina (Kucerova et al., 2012), l'alcool (Chiang et al., 2008), la nicotina (Vieyra-Reyes et al., 2008), la cocaina (Calcagnetti et al., 1996; Chambers et al., 2004) e l'anfetamina (Holmes et al., 2002). L'aumento del consumo di cannabinoidi da parte degli OBX non è dovuto a cambiamenti dell'attività locomotoria durante la sessione giornaliera di training. Infatti, entrambi i gruppi sperimentali hanno registrato un'attività motoria simile, come confermato dal numero di interruzioni dei raggi infrarossi delle fotocellule all'interno del box, durante la sessione giornaliera di training.

Abbiamo anche riscontrato delle differenze nella pressione della leva attiva quando l'agonista cannabinoide è stato sostituito con il veicolo, cioè durante l'estinzione. Infatti, il numero di pressioni sulla leva attiva da parte dei ratti OBX è notevolmente più alta rispetto a quella degli SHAM non solo quando il cannabinoide è disponibile, ma anche quando questo è assente (estinzione). Un meccanismo neurobiologico che potrebbe contribuire a capire l'incapacità degli OBX di estinguere le risposte quando queste non vengono più "rinforzate" (in assenza di ricompensa) è rappresentato da una disfunzione del circuito neuronale antero-corticale coinvolto nell'inibizione di un'attività in corso al momento della sospensione delle proprietà di rinforzo della sostanza (Jentsch e Taylor, 1999). Questa ipotesi è supportata dalla scoperta che gli animali OBX (i) sono incapaci di adattarsi a cambiamenti ambientali mostrando delle risposte motorie iperattive (Van Riezen e Leonard, 1990), (ii) mostrano tratti simil-impulsivi (Kamei et al., 2007), e (iii) evidenziano un aumento significativo nella densità e funzionalità del recettore cannabinoide CB₁ nella corteccia prefrontale (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009).

Effetto della stimolazione acuta del recettore 5-HT_{1B} durante l'auto-somministrazione di WIN

Nel tentativo di valutare un possibile meccanismo per comprendere le differenze dell'auto-somministrazione di cannabinoidi tra i ratti OBX e SHAM, abbiamo valutato l'effetto di un agonista del recettore 5-HT_{1B} sul consumo di cannabinoidi. Questa scelta si basa sul fatto che i recettori 5-HT_{1B} corticali e ippocampali sono ampiamente coinvolti nella dipendenza da etanolo e che la loro attivazione nelle aree limbiche potrebbe attenuare l'auto-somministrazione di anfetamina (Miszkiel et al., 2012). Inoltre è stata osservata una ipofunzionalità dei recettori 5-HT_{1B} nei pazienti depressi (Murrough et al., 2011), ed è stato trovato un collegamento tra un polimorfismo del gene del recettore 5-HT_{1B} e l'alcolismo (Lappalainen et al., 1998). L'agonista del recettore 5-HT_{1B}, CGS-12066B, è stato riportato in grado di indurre in maniera selettiva una diminuzione delle risposte attive nell'auto-somministrazione di etanolo (Czachowski, 2005). Questo composto è un agonista totale con alta selettività per il recettore 5-HT_{1B} (Neale et al., 1987), ed in minore misura per il recettore 5-HT_{1A}. L'intervallo di dosi scelto per il CGS-12066B per questo studio risulta essere efficace in acuto per modificare il comportamento aggressivo (De Boer e Koolhaas, 2005) e sessuale (Maciag et al., 2006) nei ratti, ma anche i comportamenti relativi al "reward", il rinforzo mediato dalla dopamina (Parson et al., 1996). Il CGS ha mostrato degli effetti selettivi sull'auto-somministrazione, come una diminuzione dell'alcool (Grant et al., 1997; Maurel et al., 1999; Tomkins and O'Neill, 2000, Czachowski, 2005) e dell'anfetamina (Fletcher e Korth, 1999). Tuttavia, il CGS-12066B non ha effetti nell'auto-somministrazione

di cocaina (Parson et al., 1996), in linea con nostri risultati sull'auto-somministrazione di cannabinoide.

I risultati del nostro studio non escludono la possibilità che un trattamento cronico, piuttosto che acuto, dell'agonista del recettore serotoninergico 5-HT_{1B} potrebbe alterare l'auto-somministrazione di cannabinoidi nei ratti.

È stato riportato in letteratura che sia il CGS (Horowitz et al., 1997; Uphouse et al., 2002; Miryala et al., 2013) che il comportamento di auto-somministrazione del cannabinoide abbiamo un effetto diverso correlato con il tipo di ceppo di ratti e con le procedure e parametri utilizzati.

Effetto di una infusione endovenosa di WIN sul rilascio di dopamina nella shell del nucleus accumbens nei ratti OBX

I cambiamenti nell'auto-somministrazione di WIN potrebbero essere collegati ad una disfunzione nel sistema di ricompensa "*reward*" che molto probabilmente si verifica negli animali OBX. La lesione infatti potrebbe indurre delle alterazioni molecolari e chimiche inducendo delle modificazioni dei sistemi neurotrasmettitoriali, incluso il sistema dopaminergico, uno dei maggiori componenti del sistema di "*reward*" celebrale (Masini et al., 2004; Sato et al., 2010).

In letteratura si è visto che la somministrazione acuta di cannabinoide aumenta i livelli di dopamina extracellulari nel nucleus accumbens in un ratto libero di muoversi (Gardner e Lowinson, 1991; Cheer et al., 2004; Polissidis et al., 2013). Inoltre i livelli di dopamina nella shell del nucleus accumbens, rispetto ai

valori basali, aumentano notevolmente durante l'auto-somministrazione di cannabinoide (Fadda et al., 2006).

In accordo con questo studio, gli animali SHAM aumentano i livelli di dopamina in seguito ad una somministrazione acuta endovenosa di cannabinoide 0.3 mg/kg, in maniera analoga a quanto precedentemente osservato durante l'auto-somministrazione di WIN. La stessa dose di cannabinoide è in grado di indurre un aumento di dopamina nella shell del nucleus accumbens anche in ratti del ceppo Sprague Dawley (Tanda et al., 1997). Tuttavia, non abbiamo riscontrato significative variazioni dei livelli di dopamina nei ratti bulbectomizzati.

Per spiegare questi risultati ci potrebbe essere d'aiuto considerare la multipla disregolazione che la bulbectomia olfattoria induce nel sistema endocannabinoide. Studi di auto-radiografia [³⁵S]GTPγ e [³H]CP-55,94 dimostrano come ci siano delle variazioni a livello dei recettori CB₁ negli animali bulbectomizzati. Infatti la densità recettoriale dei cannabinoidi CB₁ è significativamente aumentata negli animali OBX nella corteccia medio prefrontale (mPFC) e nell'amigdala mentre non cambia nel caudato-putamen, nell'ippocampo e nel nucleo dorsale del raphe (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009). La funzionalità del recettore CB₁ è aumentata nella mPFC degli animali OBX rispetto agli animali di controllo, ma non in altre regioni del cervello con l'eccezione di un piccolo, non significativo, aumento nell'amigdala (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009). In accordo con questo, altri studi dimostrano un aumento dei recettori mRNA CB₁ (Hillard et al., 2006; Bortolato et al., 2007) e della densità dei CB₁ (Hill et al., 2008) nella PFC quando i ratti sono esposti al chronic mild stress (CMS), un altro valido modello di depressione.

Tuttavia, la bulbectomia olfattoria non altera i recettori dopaminergici D₁ e D₂ nel nucleus accumbens (Sato et al., 2010). I livelli di dopamina nel nucleus accumbens sono stati studiati *in vivo* nel modello animale di depressione FSL (Flinders sensitive line) nel ceppo Sprague-Dawley (SD) prima e dopo un trattamento cronico con l'antidepressivo desipramina. Si è visto come nel modello FSL i livelli basali extracellulari di dopamina sono più bassi del 40% rispetto agli animali di controllo prima del trattamento antidepressivo. I livelli si sono normalizzati in seguito al trattamento, tornando ai valori basali degli animali di controllo (Zangen et al., 2001).

Anche Lavi-Avnon e collaboratori (2008) hanno visto nello stesso modello di depressione FSL in ratte "*post-partum*", come i livelli di dopamina nel nucleus accumbens siano bassi rispetto alle ratte che interagiscono con i propri piccoli.

Quando nel modello del CMS si è valutata la percentuale dei recettori dopaminergici D₂ nel NAc in ratti del ceppo Wistar Han dopo due settimane si è osservata una differenza tra il gruppo di animali stressati e quelli resistenti allo stress. Questi ultimi tendevano ad avere una espressione dei recettori D₂ superiore agli altri due gruppi, controlli e stressati (Żurawek et al., 2013).

Di recente è stato condotto uno studio su ratte femmine del ceppo Long Evans, sulle alterazioni del sistema dopaminergico in seguito ad esposizione delle ratte a uno stress cronico sociale (SDS) e somministrazione intraperitoneale di cocaina. I livelli di dopamina nel nucleus accumbens tendevano ad aumentare nelle ratte sensibili allo stress rispetto a quelle più resistenti (Shimamoto et al. 2015).

I potenziali cambiamenti del numero o della funzione dei recettori CB₁ o dei recettori dopaminergici in seguito alla bulbectomia potrebbero giustificare

l'assenza dell'effetto del cannabinoide sul rilascio di dopamina nel nucleus accumbens dei ratti.

D'altra parte non è chiaro se il rilascio di dopamina nel sistema di "reward" dipenda prevalentemente o solo esclusivamente dai recettori dopaminergici.

Infatti è risaputo che gli endocannabinoidi, agendo in maniera retrograda, sono in grado di influenzare le proiezioni glutammatergiche e GABAergiche regolando così gli input eccitatori e inibitori del circuito del "reward" (Melis e Pistis, 2007). I sistemi glutammatergico e GABAergico sono tra i primi, fra altri ad essere sregolati nel modello della bulbectomia. Questa disregolazione potrebbe contribuire ad una differente reattività del sistema mesolimbico dopaminergico nei ratti OBX. Studi futuri mireranno a valutare se un trattamento cronico con WIN alla dose di 0.3 mg/kg, oppure a dosi superiori se con un trattamento acuto, potrebbe aumentare i livelli di dopamina nella shell del nucleus accumbens.

Riassumendo, questo studio dimostra che i ratti bulbectomizzati si auto-somministrano più cannabinoide rispetto agli animali di controllo SHAM e che l'assunzione del cannabinoide non dipende dalla stimolazione acuta del recettore 5-HT_{1B}. La stretta correlazione anatomica e funzionale tra i bulbi olfattivi ed il sistema limbico potrebbe aiutarci a capire perché i ratti OBX differiscono nel comportamento di auto-somministrazione con i ratti SHAM. I neuroni dei bulbi olfattivi sono largamente interconnessi con altre aree del cervello, tra le quali le aree corticali ed i nuclei limbici (Song e Leonard, 2005). La rimozione dei bulbi olfattivi potrebbe alterare, se non distruggere, l'attività di questi circuiti cerebrali, in particolare influenzare il sistema dopaminergico che

ha un ruolo critico nel comportamento di ricerca e di consumo della droga. Siccome i ratti OBX, contrariamente agli SHAM, non evidenziano un aumento significativo dei livelli di dopamina nella shell del nucleus accumbens dopo una somministrazione endovenosa acuta di cannabinoide, si potrebbe ipotizzare che uno stato depressivo-simile alteri la percezione degli effetti rinforzanti delle droghe.

In conclusione, i nostri risultati mostrano che il modello di depressione degli OBX ha notevoli effetti sull'auto-somministrazione dell'agonista del recettore cannabinoide CB₁, inducendo verosimilmente una riduzione degli effetti di "*reward*" che viene compensata dall'animale attraverso un aumento del consumo di cannabinoide. Una diminuzione della trasmissione della dopamina nella shell del nucleus accumbens potrebbe contribuire a questo comportamento compensatorio.

Referenze bibliografiche

- Aalto-Setälä T, Marttunen M, Tuulio-Henriksson A, Poikolainen K, Lonnqvist J (2001). One-month prevalence of depression and other DSM-IV disorders among young adults. *Psychol Med* 31(5), 791-801.
- Ameri A (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58, 315-348.
- Bakken K, Landheim S, Vaglum P (2003). Primary and secondary substance misusers: do they differ in substance-induced and substance-independent mental disorders?. *Alcohol & Alcoholism* 38, 54-59.
- Barnes NM, Sharp T (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.
- Berglund M, Thelander S, Salaspuro M, Franck J, Andréasson S, Öjehagen A (2003). Treating alcohol and drug abuse: An evidence based review. *Alcohol Clin Exp Res* 27, 1645-1656.
- Bjorkqvist K (2001). Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav* 73, 435-442.
- Boess FG, Martin IL (1994). Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33, 275-317.
- Bogliolo V, Garzia A, Serra G, Malesa R, Mavuli G, Puggioni E, Serra G (2010). Effetto antidepressivo-simile del rimonabant nel FST: un falso positivo. XVII Congresso Nazionale SINF Cagliari 22-25 Sett, 2010.
- Bonnin A, Torii M, Wang L, Rakic P, Levitt P (2007). Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nat Neuroscience* 10, 588-597.

Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2007) Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry* 62, 1103-1110.

Bradshaw HB, Walker JM (2005) The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *Br J Pharmacol* 144(4), 459-465.

Brooner RK, King VL, Kidorf M, Schmidt CW Jr, Bigelow GE (1997). Psychiatric and substance use comorbidity among treatment-seeking opioid abusers. *Arch Gen Psychiatry* 54(1), 71-80.

Bruinvels AT, Palacios JM, Hoyer D (1993). Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT1D compared to 5-HT1B binding sites in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347(6), 569-582.

Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Probst A, Palacios JM, Hoyer D (1994). A comparative autoradiographic study of 5-HT1D binding sites in human and guinea-pig brain using different radioligands. *Brain Res Mol Brain Res* 21(1-2), 19-29.

Cai X, Kallarackal AJ, Kvarita MD, Goluskin S, Gaylor K, Bailey AM, Lee HK, Haganir RL, Thompson, SM (2013). Local potentiation of excitatory synapses by serotonin and its alteration in rodent models of depression. *Nat Neurosci* 16, 464-472.

Calcagnetti DJ, Quatrella LA., Schechter MD (1996). Olfactory bulbectomy disrupts the expression of cocaine-induced conditioned place preference. *Physiol Behav* 59, 597-604.

Carai MA, Colombo G, Maccioni P, Gessa GL (2006). Efficacy of Rimonabant and other cannabinoid CB1 receptor antagonists in reducing food intake and body weight: preclinical and clinical data. *CNS Drug Rev Summer* 12(2), 91-99.

Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton, R (2003). Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301(5631), 386-389.

Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD (2011). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8: Unit 8.10A.

Castelli MP, Piras AP, Melis T, Succu S, Sanna F, Melis MR, Collu S, Ennas MG, Diaz G, Mackie K, Argiolas A (2007). Cannabinoid CB1 receptors in the paraventricular nucleus and central control of penile erection: immunocytochemistry, autoradiography and behavioral studies. *Neuroscience* 147(1), 197-206.

Castelli MP, Fadda P, Casu A, Spano MS, Casti A, Fratta W, Fattore L (2014). Male and Female Rats Differ in Brain Cannabinoid CB1 Receptor Density and Function and in Behavioural Traits Predisposing To Drug Addiction: Effect of Ovarian Hormones. *Curr Pharm Des* 20(13), 2100-2113.

Chambers RA, Sheehan T, Taylor JR (2004). Locomotor sensitization to cocaine in rats with olfactory bulbectomy. *Synapse* 52, 167-175.

Cheer JF, Wassum KM, Heien ML, Phillips PE, Wightman RM (2004). Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats. *J Neurosci* 24, 4393-4400.

Chiang CY, Yeh KY, Lin SF, Hsuchou H, Tai MY, Ho YJ, Tsai YF (2008). Effects of alcohol on the mouse-killing behavior of olfactory bulbectomized rats. *Chin J Physiol* 51, 408-413.

Czachowski CL (2005). Manipulations of serotonin function in the nucleus accumbens core produce differential effects on ethanol and sucrose seeking and intake. *Alcohol Clin Exp Res* 29(7), 1146-1155.

Dalton GL, Lee MD, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG (2006). Serotonin 1B and 2C receptor interactions in the modulation of feeding behaviour in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 185(1), 45-57.

De Boer SF, Koolhaas, JM (2005). 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol* 526, 125-139.

Deiana S, Fattore L, Spano MS, Cossu G, Porcu E, Fadda P, Fratta W (2007). Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology* 52, 646-654.

Devane WA, Dysarz FA III, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.

Fadda P, Scherma M, Spano MS, Salis P, Melis V, Fattore L, Fratta W (2006). Cannabinoid self-administration increases dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroreport* 17, 1629-1632.

Fattore L, Cossu G, Martellotta CM, Fratta W (2001). Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 156, 410-416.

Fattore L, Spano MS, Altea S, Angius F, Fadda P, Fratta W (2007). Cannabinoid self-administration in rats: sex differences and the influence of ovarian function. *Br J Pharmacol* 152, 795-804.

Fattore L, Spano MS, Altea S, Fadda P, Fratta W (2010). Drug- and cue-induced reinstatement of cannabinoid-seeking behaviour in male and female rats: influence of ovarian hormones. *Br J Pharmacol* 160, 724-735.

Fattore L, Melis M, Fadda P, Pistis M, Fratta W (2010). The endocannabinoid system and nondrug rewarding behaviours. *Exp Neurol* 224(1), 23-36.

Fernández-Guasti A, Rodríguez-Manzo G (1992). Further evidence showing that the inhibitory action of serotonin on rat masculine sexual behavior is mediated after the stimulation of 5-HT_{1B} receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 42(3), 529-533.

Fletcher PJ, Korth, KM (1999). Activation of 5-HT_{1B} receptors in the nucleus accumbens reduces amphetamine-induced enhancement of responding for conditioned reward. *Psychopharmacology (Berl)* 142, 165-174.

Flynn PM, Luckey JW, Brown BS, Hoffman JA, Dunteman GH, Theisen AC, Hubbard RL, Needle R, Schneider SJ, Koman JJ 3rd (1995). Relationship between drug preference and indicators of psychiatric impairment. *Am J Drug Alcohol Abuse* 21(2), 153-166.

Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83(3), 1017-1066.

Gaoni Y Mechoulam R (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86, 1646-1647.

Gardner EL, Lowinson JH (1991). Marijuana's interaction with brain reward systems:update 1991. *Pharmacol Biochem Behav* 40, 571-580.

Garzia A, Bogliolo V, Loi F, De Montis F, Cubeddu A, Serra G. L'agonista del recettore CB1, HU-210, ma non l'antagonista rimonabant, antagonizza la sindrome reserpinica nel ratto. XVII Congresso Nazionale SINF Cagliari 22-25 Sett, 2010.

Grant BF (1995). Comorbidity between DSM-IV drug use disorders and major depression: results of a national survey of adults. *J Subst Abuse* 7(4), 481-497.

Grant KA, Colombo G, Gatto GJ (1997). Characterization of the ethanol-like discriminative stimulus effects of 5-HT receptor agonists as a function of ethanol training dose. *Psychopharmacology (Berl)* 133, 133-141.

Gruber AJ, Pope HG, Jr, Brown ME (1996). Do patients use marijuana as an antidepressant? *Depression* 4, 77-80.

Harrison AA., Parsons LH, Koob GF, Markou A (1999). RU 24969, a 5-HT_{1A/1B} agonist, elevates brain stimulation reward thresholds: an effect reversed by GR 127935, a 5-HT_{1B/1D} antagonist. *Psychopharmacology (Berl)* 141, 242-250.

Heim C, Nemeroff CB (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49, 1023-1039.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1932-1936.

Hillard CJ, Hill MN, Carrier EJ, Shi L, Cullinan WE, Gorzalka BB (2006). Regulation of cannabinoid receptor expression by chronic unpredictable stress in rats and mice. *Soc Neurosci Abstr* 746, 19.

Hill MN, Gorzalka BB (2005). Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol* 15, 593-599.

Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB (2008). Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem* 106(6), 2322-2336.

Holmes PV, Masini CV, Primeaux SD, Garrett JL, Zellner A, Stogner KS, Duncan AA, Crystal JD (2002). Intravenous self-administration of amphetamine is increased in a rat model of depression. *Synapse* 46, 4-10.

Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C (2005). Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 29(8), 1335-1346.

Howlett AC (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 619-631.

Horowitz JM, Kristal MB, Torres G (1997). Differential behavioral responses to cocaine of Long-Evans and Sprague-Dawley rats: role of serotonin. *Synapse* 26, 11-21.

Horwood LJ, Fergusson, DM, Coffey C, Patton, GC, Tait R, Smart D, Letcher P, Silins E, Hutchinson DM (2012). Cannabis and depression: an integrative data analysis of four Australasian cohorts. *Drug Alcohol Depend* 126, 369-378.

Iversen L (2003). Cannabis and the brain. *Brain* 126(6), 1252-1270.

Jentsch JD, Taylor JR (1999). Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 146, 373-390.

Jia C, Chen WR, Shepherd GM (1999). Synaptic organization and neurotransmitters in the rat accessory olfactory bulb. *J Neurophysiol* 81(1), 345-355.

Johnson MR, Rice KC, Howlett A, Melvin LS, Herkenham M (1992). The cannabinoid receptor pharmacologic identification, anatomical localization and cloning. *NIDA Res Monogr* 119, 86-90.

Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR (2003). Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 169, 135-140.

Kaiyala KJ, Vincow ES, Sexton TJ, Neumaier JF(2003). 5-HT_{1B} receptor mRNA levels in dorsal raphe nucleus: inverse association with anxiety behavior in the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 75(4), 769-776.

Kamei J, Hirose N, Oka T, Miyata S, Saitoh A, Yamada M (2007). Effects of methylphenidate on the hyperemotional behavior in olfactory bulbectomized mice by using the hole-board test. *J Pharmacol Sci* 103, 175-180.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (1981a). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 5(2), 247-251.

Katz RJ, Roth KA, Schmaltz K (1981b). Amphetamine and tranylcypromine in an animal model of depression: Pharmacological specificity of the reversal effect. *Neurosci Biobehav Rev* 5(2), 259-264.

Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Grasso D, Lipschitz D, Houshyar S, Krystal J H, Gelernter J (2006). Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. *Biol Psychiatry* 59(8), 673-680.

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156(6), 837-841.

Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA (2002). Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. *Am J Psychiatry* 159(7), 1133-1145.

Keller MC, Neale MC, Kendler KS (2007). Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. *Am J Psychiatry* 164(10), 1521-1529.

Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE (1997). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther* 74, 299-316.

Kessler RC (1997). The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48, 191-214.

Kucerova J, Pistovcakova J, Vrskova D, Dusek L, Sulcova A (2012). The effects of methamphetamine self-administration on behavioural sensitization in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 15, 1503-1511.

- Laurent A, Goillard JM, Cases O, Lebrand C, Gaspar P, Ropert N (2002). Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. *J Neurosci* 22, 886-900.
- Lappalainen J, Long JC, Eggert M, Ozaki N, Robin RW, Brown GL, Naukkarinen H, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D (1998). Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT_{1B} receptor gene in 2 populations. *Arch Gen Psychiatry* 55, 989-994.
- Lavi-Avnon Y, Weller A, John PM, Finberg I, Herman G, Kinor N, Stern Y, Schroeder M, Gelber V, Bergman SY, Overstreet DH, Yadid G (2008). The reward system and maternal behavior in an animal model of depression: a microdialysis study. *Psychopharmacology* 196, 281-291.
- Leonard BE, Tuite M (1981). Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int Rev Neurobiol* 22, 251-286.
- Lev-Ran S, Roerecke M, Le Foll B, George TP, McKenzie K, Rehm J (2014). The association between cannabis use and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Psychol Med* 44(4), 797-810.
- Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev* 85(1), 281-317.
- Lin D, Parsons LH (2002). Anxiogenic-like effect of serotonin(1B) receptor stimulation in the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 71(4), 581-587.
- Lin L, York DA (2005). 5-HT_{1B} receptors modulate the feeding inhibitory effects of enterostatin. *Brain Res* 1062(1-2), 26-31.

- Maciag D, Coppinger D, Paul IA (2006). Evidence that the deficit in sexual behavior in adult rats neonatally exposed to citalopram is a consequence of 5-HT₁ receptor stimulation during development. *Brain Res* 1125, 171-175.
- Mackie K (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* (168), 299-325.
- Manwell LB, Czabala JC, Ignaczak M, Mundt MP (2004). Correlates of depression among heavy drinkers in Polish primary care clinics. *Int J Psychiatry Med* 34(2), 165-178.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998). Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18, 135-174.
- Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W (1998). Self administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience* 85, 327-330.
- Martin P, Soubriè P, Puech AJ (1990). Reversal of helpless behavior by serotonin uptake blockers in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 101(3), 403-407.
- Martin BR, Compton DR, Thomas BF, Prescott WR, Little PJ, Razdan RK, Johnson MR, Melvin LS, Mechoulam R, Ward SJ (1991). Behavioral, biochemical, and molecular modelling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav* 40, 471-478.
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002). Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 159(4), 379-387.

Masini CV, Holmes PV, Freeman, KG, Maki AC, Edwards GL (2004). Dopamine overflow is increased in olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Physiol Behav* 81, 111-119.

Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1992). Cannabinoid receptors: which cells, where, how, and why? *NIDA Res Monogr* 126, 48-56.

Maurel S, De Vry J, Schreiber R (1999). 5-HT receptor ligands differentially affect operant oral self-administration of ethanol in the rat. *Eur J Pharmacol* 370, 217-223.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC Bonner TI (1990). Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.

McGee R, Williams S, Poulton R, Moffitt T (2000). A longitudinal study of cannabis use and mental health from adolescence to early adulthood. *Addiction* 95, 491-503.

McLennan W (1997). Mental Health Wellbeing: Profile of Adults, Australia. In: Statistics ABo, E. Canberra: Australian Government.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50,83-90.

Melis M, Pistis M (2007). Endocannabinoid signaling in midbrain dopamine neurons: more than physiology? *Curr Neuropharmacol* 5, 268-277.

Mengod G, Nguyen H, Le H, Waeber C, Lübbert H, Palacios JM (1990). The distribution and cellular localization of the serotonin 1C receptor mRNA in the

rodent brain examined by in situ hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. *Neuroscience* 35(3), 577-591.

Menini A (1999). Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9(4), 419-426.

Miszkiel J, Adamczyk P, Filip M, Przegalinski E (2012). The effect of serotonin 5HT1B receptor ligands on amphetamine self-administration in rats. *Eur J Pharmacol* 677, 111-115.

Moret C, Briley M (2000). The possible role of 5-HT(1B/D) receptors in psychiatric disorders and their potential as a target for therapy. *Eur J Pharmacol* 404, 1-12.

Morrison JR (1974). Bipolar affective disorder and alcoholism. *A J Psychiatry* 131, 1130-1133.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.

Murrough JW, Henry S, Hu J, Gallezot JD, Planeta-Wilson B, Neumaier JF, Neumeister A (2011). Reduced ventral striatal/ventral pallidal serotonin1B receptor binding potential in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 213, 547-553.

Muscat R, Willner P (1989). Effects of dopamine receptor antagonists on sucrose consumption and preference. *Psychopharmacology (Berl)* 99, 98-102.

Miryala CS, Hiegel C, Uphouse L (2013). Sprague-Dawley and Fischer female rats differ in acute effects of fluoxetine on sexual behavior. *J Sex Med* 10, 350-361.

Neale RF, Fallon SL, Boyar WC, Wasley JW, Martin LL, Stone GA, Glaeser BS, Sinton CM, Williams M (1987). Biochemical and pharmacological

characterization of CGS 12066B, a selective serotonin-1B agonist. *Eur J Pharmacol* 136, 1-9.

Neisewander, JL, Cheung TH, Pentkowski NS (2013). Dopamine D3 and 5-HT receptor dysregulation as a result of psychostimulant intake and forced abstinence: Implications for medications development. *Neuropharmacology* 76, 301-319.

Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB (2002). Parental depression: Animal models of an adverse life event. *Am J Psychiatry* 159(8), 1265-1283.

Nicol X, Muzerelle A, Rio JP, Metin C, Gaspar P (2006) Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. *J Neuroscience* 26, 862-872.

Nielsen CK, Arnt J, Sánchez C (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behav Brain Res* 107(1-2), 21-33.

Nunes EV, Levin FR (2004). Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: a meta-analysis. *JAMA* 291(15), 1887-1896.

Ogborne AC, Smart RG, Weber T, Birchmore-Timney C (2000). Who is using cannabis as a medicine and why: an exploratory study. *J Psychoactive Drugs* 32, 435-443.

Oleson EB, Cheer JF (2012). A brain on cannabinoids: the role of dopamine release in reward seeking. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1,2(8), 1-13.

O'Neil MF, Moore NA (2003) Animal models of depression: are there any? *Hum Psychopharmacol* 18, 239-254.

Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A (2002). Cannabinergic ligands. *Chem Phys Lipids* 121, 3-19.

Parsons LH, Weiss F, Koob GF (1996). Serotonin1b receptor stimulation enhances dopamine-mediated reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 128, 150-160.

Pentkowski NS, Cheung TH, Toy, WA, Adams MD, Neumaier JF, Neisewander JL (2012). Protracted withdrawal from cocaine self-administration flips the switch on 5-HT1B receptor modulation of cocaine abuse-related behaviors. *Biol Psychiatry* 72, 396-404.

Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74, 129-180.

Pertwee RG (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6, 635-664.

Pertwee RG (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 76(12), 1307-1324.

Piomelli D (2004) The endogenous cannabinoid system and the treatment of marijuana dependence. *Neuropharmacology* 47, 359-367.

Prins J, Olivier B, Korte SM (2011). Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. *Expert Opin Investig Drugs* 20, 1107-1130.

Polissidis A, Galanopoulos A, Naxakis G, Papahatjis D, Papadopoulou-Daifoti Z, Antoniou, K (2013). The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 393-403.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977a). Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229 (2), 327-336.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977b). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266 (5604), 730-732.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47 (4), 379-391.

Pytliak M, Vargova V, Mechirova V, Felsoci M (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* 60, 15-25.

Ramboz S, Saudou F, Amara DA, Belzung C, Segu L, Misslin R, Buhot MC, Hen R (1996). 5-HT_{1B} receptor knock out--behavioral consequences. *Behav Brain Res* 73(1-2), 305-312.

Rhoades RW, Nett-Clarke CA, Shi MY, Mooney RD (1994). Effects of 5-HT on thalamocortical synaptic transmission in the developing rat. *J Neurophysiology* 72, 2438-2450.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350 (2,3), 240-244.

Rodriguez-Gaztelumendi A, Rojo ML, Pazos A, Diaz A (2009). Altered CB₁ receptor-signaling in prefrontal cortex from an animal model of depression is reversed by chronic fluoxetine. *J Neurochem* 108, 1423-1433.

Romeas T, Morissette MC, Mnie-Filali O, Pineyro G, Boye SM (2009). Simultaneous anhedonia and exaggerated locomotor activation in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 205, 293-303.

Ronnett GV, Moon C (2002). G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol* 64, 189-222.

Rotenberg VS (1994). The revised monoamine hypothesis: mechanism of antidepressant treatment in the context of behavior. *Integr Physiol Behav Sci* 29, 182-188.

Rounsaville BJ, Luthar SS (1993). Substance misuse and comorbid psychopathology in a high-risk group: a study of siblings of cocaine misusers. *Int J Addict* 28(5), 415-434.

Sato A, Nakagawasai O, Tan-No K, Onogi H., Nijima F, Tadano T (2010). Influence of olfactory bulbectomy on maternal behavior and dopaminergic function in nucleus accumbens in mice. *Behav Brain Res* 215, 141-145.

Schramm NL, McDonald MP, Limbird LE (2001). The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. *J Neurosci* 21(13), 4875-4882.

Segev A, Rubin AS, Abush H, Richter-Levin G, Akirav I (2014). Cannabinoid receptor activation prevents the effects of chronic mild stress on emotional learning and LTP in a rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* 39(4), 919-933.

Selley DE, Rorrer WK, Breivogel CS, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR, Sim-Selley LJ (2001). Agonist efficacy and receptor efficiency in heterozygous CB1 knockout mice: relationship of reduced CB1 receptor density to G-protein activation. *J Neurochem* 77, 1048-1057.

Sherman AD, Sacquitne JL, Petty, F (1982). Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 16(3), 449-454.

Shearman LP, Rosko KM, Fleischer R, Wang J, Xu S, Tong XS, Rocha BA (2003). Antidepressant-like and anorexic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behav Pharmacol* 14, 573-582.

- Shipleigh MT, Ennis M (1996). Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30(1), 123-176.
- Sonne SC, Brady KT Morton WA (1994). Substance abuse and bipolar affective disorder. *Nervous and Mental Disease* 182, 349-352.
- Spano MS, Fadda P, Fratta W, Fattore L (2010). Cannabinoid-opioid interactions in drug discrimination and self-administration: effect of maternal, postnatal, adolescent and adult exposure to the drugs. *Curr Drug Targets* 11, 450-461.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85(3), 367-370.
- Strakowski SM, DelBello, MP (2000). The co-occurrence of bipolar and substance use disorders. *Clin Psychol Rev* 20, 191-206.
- Song C, Leonard BE (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 627-647.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995). 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Comm* 215, 89-97.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276, 2048-2050.
- Tatarczynska E, Klodzinska A, Stachowicz K, Chojnacka-Wojcik E (2004). Effects of a selective 5-HT_{1B} receptor agonist and antagonists in animal models of anxiety and depression. *Behav Pharmacol* 15, 523-534.

- Tomkins DM, O'Neill MF (2000). Effect of 5-HT_{1B} receptor ligands on self administration of ethanol in an operant procedure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* (66), 129-136.
- Tzavara ET, Davis RJ, Perry RW, Li X, Salhoff C, Bymaster FP, Witkin JM, Nomikos GG (2003). The CB₁ receptor antagonist SR141716 selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol* 138, 544-553.
- Uphouse L, Maswood S, Jackson A, Brown K, Prullage J, Myers T, Shaheen F (2002). Strain differences in the response to the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 533-542.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* 310 (5746), 329-332.
- Van Riezen H, and Leonard BE (1990). Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther* 47, 21-34.
- Vieyra-Reyes P, Mineur YS, Picciotto MR, Tunez I, Vidaltamayo R, Drucker-Colin R (2008). Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *Brain Res Bull* 77, 13-18.
- Weiss RD, Mirin SM (1987). Substance abuse as an attempt at self-medication. *Psychiatric Medicine* 3, 357-367.
- Willner P (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83(1), 1-16.

- Willner P (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134, 319-329.
- Wise, Wise RA (1996). Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* 19, 319-340.
- Wohl Me, Ades J (2009). Depression and addictions: links and therapeutic sequence. *Rev Prat* 59, 484-487.
- Zangen A, Nakash R, Overstreet DH, Yadid G (2001). Association between depressive behavior and absence of serotonin-dopamine interaction in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 155, 434-439.
- Żurawek D, Faron-Górecka A, Kuśmider M, Kolasa M, Gruca P, Papp M, Dziedzicka-Wasylewska M (2013). Mesolimbic dopamine D2 receptor plasticity contributes to stress resilience in rats subjected to chronic mild stress. *Psychopharmacology* 227, 583-593.