



Università degli Studi di Cagliari

## **DOTTORATO DI RICERCA**

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

Corso di Dottorato in Neuroscienze

Ciclo XXIII

### **Effetti dell'agonista cannabinoide HU-210 e dell'antagonista SR141716A nel forced swimming test: studio biochimico e comportamentale.**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

Bio/14

Presentata da

Roberta Loriga

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Alessandra Concas

Relatore

Prof. Walter Fratta

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

# INDICE

✓ Introduzione	3
1.1 Disturbi dell'umore: la depressione	3
1.2 Neurobiologia della depressione	7
2.1 Sistema Endocannabinoide	11
2.2 Gli endocannabinoidi	11
2.3 Recettori cannabinoidi	16
2.4 Ligandi recettoriali dei recettori CB <sub>1</sub> e CB <sub>2</sub>	19
2.5 Antagonisti selettivi dei recettori CB <sub>1</sub>	22
2.6 Agonisti inversi	23
3.1 Ruolo del sistema EC nei disturbi dell'umore	24
3.2 Effetti delle diverse manipolazioni sull' EC nei modelli animali di depressione	26
3.3 Sistema EC nei modelli animali di depressione	28
3.4 Effetto dei farmaci antidepressivi sul sistema EC	29
3.5 Studi clinici	30
✓ Obiettivo dello studio	32
✓ Materiali e metodi	33
4.1 Animali	33
4.2 Farmaci	33
4.3 Gruppi sperimentali e trattamenti farmacologici	33
5.1 Test comportamentali	34
5.2 Forced swimming test	34
5.3 Open field test	35
5.4 Analisi statistica	35
6.1 Studi di <i>binding</i> autoradiografici	36
6.2 Preparazione del tessuto cerebrale	36
6.3 Autoradiografia con [ <sup>3</sup> H](-)-CP55940	36
6.4 Binding [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S	38
6.5 Analisi delle immagini	38
6.6 Analisi statistica	39

✓ Risultati	40
7.1 Forced swimming test	40
7.2 Open field	41
7.3 Densità e funzione del recettore CB <sub>1</sub>	41
7.4 Effetto del trattamento acuto e sub-cronico con HU-210 e SR141716A sulla densità e funzionalità del recettore CB <sub>1</sub>	41
✓ Discussione	54
✓ Bibliografia	59

# Introduzione

## 1.1 Disturbi dell'umore: la depressione

I disturbi dell'umore sono una delle patologie mentali più frequenti (Nestler 2002), e fra queste la depressione, che è quella maggiormente diffusa e debilitante (Koenigs 2009), rappresenta un crescente problema socio-economico (Murray 1996, 1997). La depressione è quasi due volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini e rappresenta una delle maggiori cause di mortalità al mondo, a causa del rischio di suicidio. (Blazer 2000).

La depressione è stata descritta da diversi millenni: il termine “melanconia” è stato utilizzato per la prima volta da Ippocrate circa 400 anni a.C. (Akiskal 2000). A partire dal 1960 è stata diagnosticata come Disordine Depressivo Maggiore (MDD) in base ai criteri sintomatici stabiliti nel IV *Diagnostic and Statistical Manual* (DSMIV 2000) (Tab. 1)

### Criteria diagnostici per la Depressione Maggiore

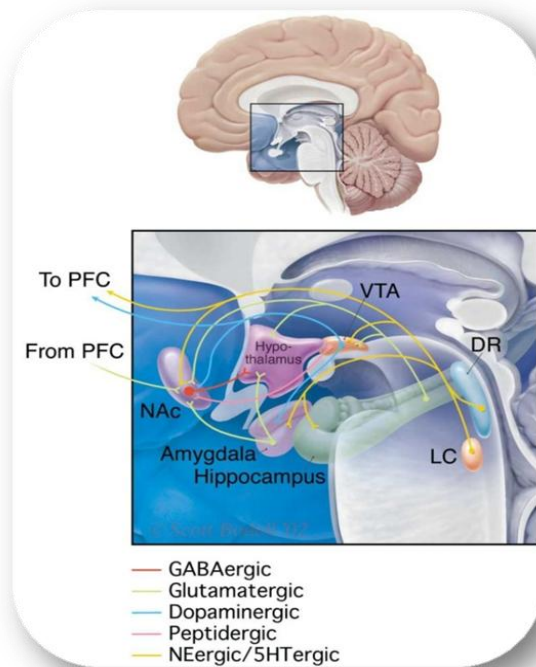
- ♣ Umore depresso
- ♣ Irritabilità
- ♣ Bassa autostima
- ♣ Sentimenti di tristezza, senso di colpa
- ♣ Decremento della concentrazione e del pensiero
- ♣ Decremento o aumento dell'appetito
- ♣ Aumento o perdita di peso
- ♣ Insonnia o ipersonnia
- ♣ Fatica, calo energetico, o agitazione
- ♣ Decremento dell'interesse agli stimoli piacevoli (e.g. cibo, sesso, interazione sociale)
- ♣ Pensieri ricorrenti di morte e di suicidio

**Tab. 1** La diagnosi di depressione maggiore viene formulata quando un certo numero dei sintomi elencati in tabella sono presenti per un periodo di tempo superiore alle due settimane e quando i sintomi disturbano le normali funzioni sociali e professionali

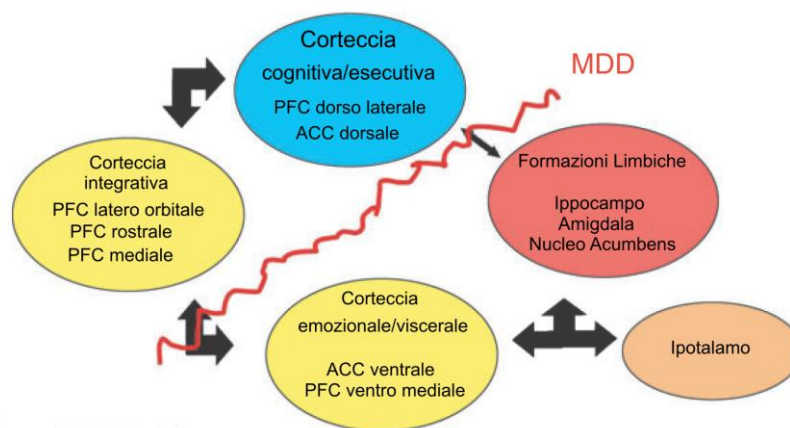
È verosimile che molte regioni cerebrali medino diversi sintomi della depressione. A sostegno di questa ipotesi, studi di *brain imaging* nell'uomo hanno evidenziato cambiamenti del flusso ematico o dei relativi parametri misurati in diverse aree cerebrali, quali le regioni della corteccia prefrontale (PFC), dell'ippocampo, dello striato, dell'amigdala e del talamo (Drevets 2001). La neocorteccia e l'ippocampo sembrano mediare i disturbi cognitivi della depressione, come il deterioramento della memoria, l'apatia, la disperazione, il senso di colpa, il desiderio di morte ed il suicidio. Lo striato, ed in particolar modo lo striato ventrale o nucleus accumbens (NAc), l'amigdala e le aree cerebrali ad esse connesse, sono ampiamente coinvolte nella memoria emozionale e sembrano mediare l'anedonia, l'ansia e la ridotta motivazione, tutti sintomi presenti nella maggior parte dei pazienti depressi. Un ruolo dell'ipotalamo è stato invece ipotizzato per i sintomi definiti neurovegetativi, quali i disturbi del sonno, dell'appetito e la diminuzione del desiderio sessuale.

Queste diverse regioni cerebrali operano in circuiti paralleli interagendo tra loro e vengono considerate facenti parte di un circuito neuronale coinvolto nella depressione (Nestler 2002) (Fig. 1).

In particolare, diverse strutture prefrontali e limbiche ed i loro circuiti sono implicati nella regolazione delle emozioni (Fig. 2). Queste aree neuroanatomiche includono la corteccia prefrontale ventromediale (VMPFC), la corteccia prefrontale latero orbitale (LOPFC), la corteccia prefrontale dorso laterale (DLPFC), la corteccia cingolata anteriore (ACC), lo striato ventrale (incluso il NAc), l'amigdala e l'ippocampo (Maletic 2007). La PFC, la cingolata, l'amigdala e l'ippocampo, fanno parte di un circuito integrato che regola non solo l'umore, ma anche la memoria contestuale e quella di lavoro. All'interno della PFC, la VMPFC regola il dolore, l'aggressività, le funzioni sessuali e il comportamento alimentare, e la LOPFC valuta il rischio e gli stati affettivi. Queste due aree hanno un collegamento reciproco con la DLPFC che, a sua volta, regola le funzioni esecutive, la capacità di concentrazione e processa la memoria di lavoro (Swanson 1987).



**Fig. 1 Circuito neuronale della depressione.** La figura mostra uno schema altamente semplificato di una serie di circuiti neuronali che possono contribuire ai sintomi depressivi. La maggior parte degli studi hanno inizialmente evidenziato il ruolo dell'ippocampo e della PFC, ma negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata anche su altre strutture subcorticali implicate nella gratificazione, nella motivazione e nella paura, quali il NAc, l'amigdala e l'ipotalamo. In figura sono illustrate l'area ventro tegmentale (VTA), che invia gli input dopaminergici al NAc, all'amigdala, alla PFC ed ad altre strutture limbiche. La noradrenalina (dal locus coeruleus, LC) e la serotonina (dal dorsal rafe, DR) innervano tutte le strutture presenti nella figura. Inoltre, esistono strette correlazioni fra l'ipotalamo e il circuito VTA o NAc. *Adattato da Nestler 2002.*



**Fig. 2 Il Disordine Depressivo Maggiore influisce sui collegamenti dinamici tra le strutture neuroanatomiche coinvolte nella regolazione dell'umore e della risposta allo stress.** Le strutture limbiche (amigdala, ippocampo e NAc) hanno connessioni reciproche con aree corticali "para-limbiche", corteccia cingolata subgenuale anteriore e la corteccia prefrontale ventromediale (VMPFC). Ipoteticamente la distruzione dei collegamenti tra le aree limbiche e paralimbiche e le formazioni rostrali prefrontali integrative determinano la compromissione della regolazione del *feedback* dell'attività limbica. Di conseguenza la rete cognitiva dorsale/esecutiva è ipoattiva mentre le aree limbiche eccessivamente attive continuano a stimolare l'ipotalamo inducendo la disregolazione neuroendocrina e l'iperattività simpatica. *Adattato da Maletic 2007.*

In pazienti con MDD, gli studi di *functional brain imaging*, attraverso la tecnica della valutazione a riposo del flusso ematico cerebrale (BF), hanno evidenziato un'iperattività nella VMPFC e nella LOPFC ed un'ipoattività nella DLPFC rispetto ai controlli (Drevets 1998). Un'alterata funzionalità di tali aree cerebrali può essere responsabile delle manifestazioni sintomatiche associate alla MDD. Infatti, l'iperattività della VMPFC è associata con l'aumento della sensibilità al dolore, all'ansia, ai pensieri depressivi, mentre l'ipoattività della DLPFC può causare rallentamento psicomotorio, apatia, deficit dell'attenzione e della memoria di lavoro (Maletic 2007). Numerosi studi post-mortem (Drevets 2001; Sheline 2003) e di *neuroimaging* (Drevets 2001; Harrison 2002) su pazienti depressi hanno evidenziato riduzioni nel volume della materia grigia e della densità gliale nella PFC e nell'ippocampo. Numerosi dati indicano che l'ippocampo, facente parte dei circuiti esecutivi/cognitivi e della regolazione neuroendocrina, alla quale partecipa anche l'asse ipotalamico-pituitario-surrenale (HPA), potrebbe essere particolarmente vulnerabile nella depressione (Maletic 2007). Studi post mortem hanno evidenziato nei soggetti affetti da MDD una diminuzione del volume dell'ippocampo rispetto ai controlli sani di pari età, verosimilmente causata da un incremento della densità delle cellule neuronali e da una significativa riduzione delle ramificazioni e delle spine dendritiche (Stockmeier 2004). Diversi studi di *imaging* in vivo hanno dimostrato che il volume ippocampale è significativamente diminuito nei pazienti con MDD rispetto ai controlli (Videbech 2004) e che il grado di riduzione è direttamente proporzionale al numero ed alla durata degli episodi depressivi non trattati (Sheline 2003).

## 1.2 Neurobiologia della depressione

Le ipotesi neurobiologiche della depressione sono essenzialmente basate sul meccanismo d'azione dei farmaci antidepressivi.

La prima ipotesi è stata proposta più di 40 anni fa in seguito alla fortunata scoperta dell'effetto antidepressivo degli inibitori delle monoaminossidasi (MAOI) e dell'imipramina. Secondo questa ipotesi, nota come ipotesi monoaminergica della depressione, la depressione è associata ad una ridotta trasmissione monoaminergica nel cervello, in particolare, alla trasmissione noradrenergica e serotoninergica (Schildkraut 1965). L'ipotesi monoaminergica della depressione ha portato allo sviluppo dei farmaci antidepressivi più recenti, quali gli inibitori selettivi della serotonina (SSRI) e della noradrenalina (SNRI): inibendo infatti la ricattura di serotonina e noradrenalina a livello presinaptico, si aumentano i loro livelli nello spazio sinaptico (Baldessarini 2006). Sebbene numerosi studi effettuati allo scopo di dimostrare una deficienza del sistema monoaminergico nei pazienti depressi abbiano riportato risultati contraddittori e inconcludenti, la datata ipotesi monoaminergica costituisce ancora oggi una base fondamentale per lo sviluppo di nuovi agenti antidepressivi.

Rimaneva però il problema di spiegare perché l'azione terapeutica dei SSRI e SNRI si manifesti solo dopo diverse settimane di trattamento, mentre l'incremento della trasmissione monoaminergica si ha immediatamente dopo le prime somministrazioni della terapia farmacologica. Tale discrepanza ha portato a pensare che l'aumento immediato della trasmissione monoaminergica indotto dagli SSRI e/o SNRI non sia sufficiente per esercitare l'effetto terapeutico il quale, molto più probabilmente, è associato alle modificazioni neurobiologiche indotte dalla loro somministrazione cronica (Sugrue 1983). La somministrazione cronica di tali agenti antidepressivi è in grado di modificare sia il numero che la sensibilità di diversi recettori monoaminergici: i.e. il trattamento cronico con SSRI o la terapia cronica elettroconvulsiva (ECT) determinano un aumento dell'attività mesolimbica dopaminergica, che svolge un ruolo essenziale nel meccanismo di gratificazione, detto



*reward*, al contrario deficitario nella depressione (Nestler 2006). Queste evidenze suggeriscono che la depressione, ed in modo particolare alcuni sintomi quali l'anedonia e la mancanza di motivazione agli stimoli piacevoli (e.g. cibo, sesso, interazione sociale), possano essere causati da un deficit della trasmissione mesolimbica dopaminergica, il cui ripristino è determinato dal trattamento cronico con antidepressivi.

Recentemente, come visto precedentemente, diversi studi clinici e di *neuroimaging* hanno riportato una diminuzione del volume dell'ippocampo nei pazienti depressi (Videbech 2004); ma non in quelli trattati con antidepressivi (Malberg 2004; Sheline 2003), suggerendo così che la depressione possa essere associata con una perdita e/o atrofia ippocampale, contrastata a sua volta da un adeguato trattamento antidepressivo. Questa ipotesi è avvalorata da recenti studi clinici che dimostrano come un trattamento cronico con agenti antidepressivi promuova la neurogenesi, la quale risulta invece ridotta nei modelli animali di depressione. Inoltre, i farmaci antidepressivi, inclusa la ECT, promuovono la proliferazione cellulare e la neurogenesi (Malberg 2004; Santarelli 2003). Per quanto riguarda il meccanismo d'azione attraverso il quale gli antidepressivi inducono la neurogenesi, l'ipotesi più convincente suggerisce che essi determinino tale effetto aumentando i livelli di fattori neurotrofici, quali il *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Nibuya 1995; Rogoz 2005).

Infine, la diminuzione del volume dell'ippocampo, osservata spesso nei pazienti depressi, ha supportato l'ipotesi generale che nella fisiopatologia della depressione abbia un ruolo anche la diminuzione dei fattori neurotrofici (Duman 1997; Monteggia 2004) e soprattutto del BDNF, il quale, abbondantemente espresso nelle strutture limbiche dell'adulto (Vaishnav 2008), è il principale fattore neurotrofico coinvolto nella neurogenesi dell'ippocampo, oltre che nell'omeostasi cellulare, nella plasticità neuronale, nella crescita e morte cellulare (Tapia 2004). Ulteriori evidenze a supporto dell'azione antidepressiva del BDNF provengono da studi post-mortem, che hanno evidenziato modificazioni simili negli ippocampi di pazienti affetti da depressione (Karege 2005), e da studi effettuati nei ratti, ai quali è stato iniettato

direttamente BDNF nell'ippocampo inducendo effetti antidepressivi (Shiryama 2002). Tali effetti non sono invece presenti in ratti *knockout*-inducibili (KO) per il gene che codifica il BDNF nelle regioni del proencefalo (Monteggia 2007; Monteggia 2004). Infine, diversi lavori suggeriscono che il trattamento cronico con farmaci antidepressivi induce *up-regulation* del circuito del cAMP (D'sa 2005), che attivando il fattore di trascrizione *cAMP element binding protein* (CREB) (Blendy 2006), aumenta l'espressione genica del BDNF (Duman 1997; Young 2002).

L'altro fattore che sembra avere un ruolo chiave nella depressione è lo stress. La depressione, infatti, è spesso descritta come un disordine correlato allo stress e ci sono chiare evidenze che gli episodi di depressione si verificano spesso in contesti di alcune forme di stress cronico. È stato ipotizzato che la depressione possa essere indotta da un meccanismo correlato ad un aumento della secrezione di corticosterone che determina una diminuzione della neurogenesi. Lo stesso meccanismo può essere implicato nella depressione associata ad una iperattività dell'asse HPA dovuto ad un deficitario meccanismo di *feedback* (Holboer 2000; Tichomirova 2005). Infatti, la maggior parte dei pazienti depressi riportano dei risultati alterati al test con il desametazone. L'iperattività dell'asse HPA determina un incremento della secrezione dei glucocorticoidi, che può essere responsabile della diminuita proliferazione cellulare (Haynes 2004; Sapolsky 2000; Wong 2004). Inoltre animali privi del recettore per i glucocorticoidi hanno un deficitario meccanismo di *feedback* e sono più suscettibili ad un comportamento simil-depresso indotto dallo stress (Ridder 2005).

A tutt'oggi, nonostante i molteplici studi preclinici e clinici, l'esatta eziopatogenesi della depressione resta elusiva e gli antidepressivi basati sulle monoamine continuano ad essere in prima linea nella terapia della depressione. Tuttavia, il loro lungo ritardo terapeutico ed il loro basso tasso di remissione (circa il 30%) (Trivedi 2006) hanno incoraggiato la ricerca di agenti terapeutici più efficaci (Berton 2006; Mathew 2008).

Recentemente, a causa del suo ruolo putativo nell'espressione dei comportamenti emozionali, della risposta allo stress, del funzionamento neurovegetativo e dei comportamenti indotti dall'emozione, il sistema endocannabinoide (EC) si è imposto all'attenzione come potenziale sistema bersaglio coinvolto nella neurobiologia e nel trattamento dei disturbi dell'umore.

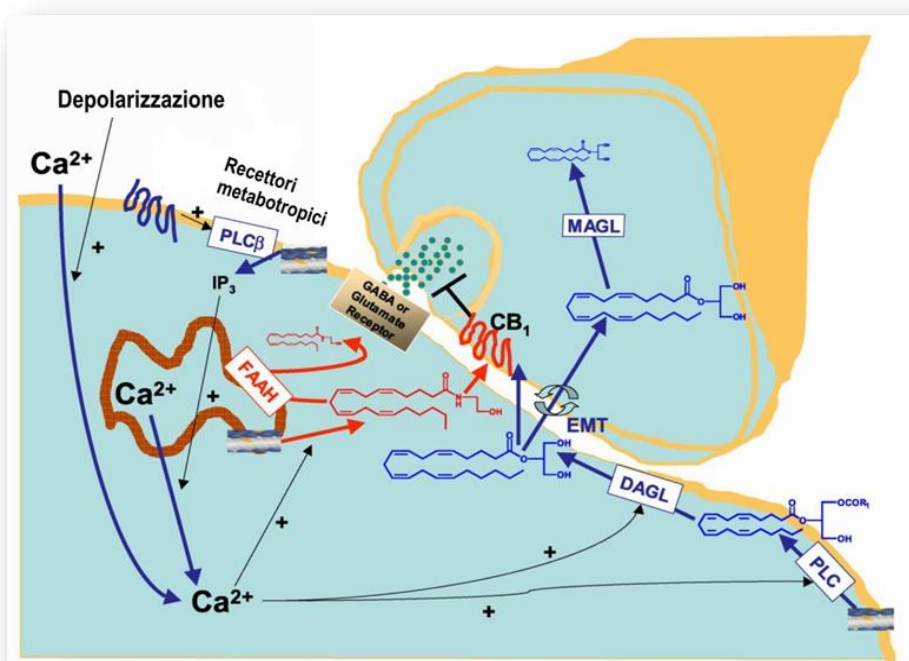
## 2.1 Sistema endocannabinoide

Il EC è stato per la prima volta caratterizzato come il sistema neuronale attraverso il quale il componente psicoattivo della *Cannabi sativa*, il  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC), il primo ad essere stato identificato nel 1964 (Goaoni 1964; Mechoulam 1963), interagisce per esercitare i suoi effetti sulla fisiologia ed il comportamento (Hill 2009 a,b). Da allora sono stati isolati dalla pianta o sintetizzati in laboratorio un numero di analoghi del  $\Delta^9$ -THC biologicamente attivi, denominati cannabinoidi per la loro azione cannabinoidemimetica. Il sistema EC è costituito dai ligandi endogeni dei recettori cannabinoidi (ECs), dai recettori cannabinoidi (CB) cui questi ligandi si legano, e dalle proteine coinvolte nella regolazione e nel metabolismo dei cannabinoidi endogeni (Vinoid 2006).

## 2.2 Gli endocannabinoidi

Gli ECs sono una classe di mediatori lipidici scoperta recentemente che includono amidi, esteri ed eteri di acidi grassi polinsaturi a catena lunga (Vinoid 2006), identificati nella corteccia cerebrale, nei gangli della base e nelle strutture limbiche, che esercitano il loro effetto principalmente attraverso i CB (Matias 2006).

Gli ECs vengono prodotti dal rimodellamento dei fosfolipidi di membrana, non sono immagazzinati all'interno di vescicole per poi essere rilasciati nella fessura sinaptica per esocitosi, ma sono prodotti "su richiesta" dell'organismo, a partire dai precursori localizzati nella membrana, e immediatamente rilasciati attraverso un meccanismo non ancora identificato per agire con modalità autocrina o paracrina (Di Marzo 2007) (Fig. 3).



**Fig. 3 Biosintesi “on demand”, rilascio, azione retrograda e degradazione dei cannabinoidi.** Non è ancora stato compreso se gli enzimi che sintetizzano l’anandamide siano pre o post sinaptici. Per gli altri enzimi la localizzazione mostrata è quella che risulta più frequente in seguito agli esperimenti di immunistochemica. I precursori dell’anandamide e del 2-AG originano dal rimodellamento dei fosfolipidi di membrana, qui mostrati come un doppio strato lipidico. Abbreviazioni: DAGL = *diacylglycerol lipase*, EMT = presunto trasportatore endocannabinoide di membrana, FAAH = *fatty acid amide hydrolase*, IP<sub>3</sub> = *inositol-tris-phosphate*, MAGL = *monoacylglycerol lipase*, PLC = *phospholipase C*, PLCβ = *phospholipase Cβ*. Le frecce in grassetto indicano la stimolazione, la trasformazione o il movimento; le frecce spuntate indicano inibizione. Le strutture chimiche grandi indicano importi inferiori a causa dei processi di inattivazione. *Adattato da Bisogno 2007.*

Il primo cannabinoide endogeno isolato dal cervello di maiale nel 1992 è l’arachidoniletanolamide (AEA) (Devane 1992) denominato anandamide, termine derivato dalla parola sanscrita “*ananda*” che significa “beatitudine interna”. L’altro endocannabinoide maggiormente studiato ad oggi è il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), originariamente isolato dall’intestino di cane (Mechoulam 1995) e nel cervello di ratto (Sugiura 1995). L’AEA si comporta come un agonista parziale sia dei CB<sub>1</sub> che dei CB<sub>2</sub> (Sugiura 2002) e come ligando endogeno per i recettori vanilloidi, mentre il 2-AG agisce come agonista completo e si lega sia ai recettori CB<sub>1</sub> che ai CB<sub>2</sub> (Sugiura 2006).

L’ AEA (Fig. 4A) ed il 2-AG (Fig. 4B) derivano dall’idrolisi a due *step* di precursori lipidici, rispettivamente la fosfatidiletanolamina ed il fosfatidilinositolo (Bambico 2009) Dato che gli enzimi che catalizzano la sintesi dell’ AEA, a partire dai precursori, sono Ca<sup>2+</sup> sensibili,

l'innesco per la sintesi, quindi il rilascio, è rappresentato dall'elevata concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare che segue sia l'ingresso del  $\text{Ca}^{2+}$  (ad esempio dopo depolarizzazione) o la mobilizzazione dai depositi intracellulari (come la stimolazione dei recettori metabotropici accoppiati alle proteine G) o entrambi (Edwards 2006; Witting 2004).

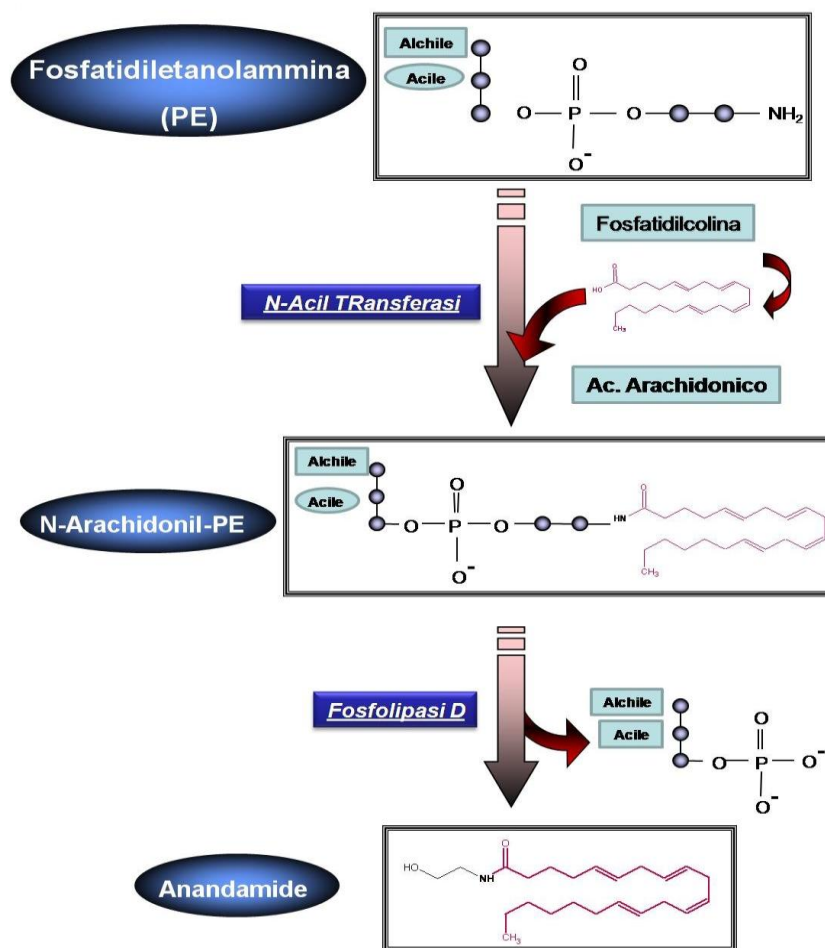
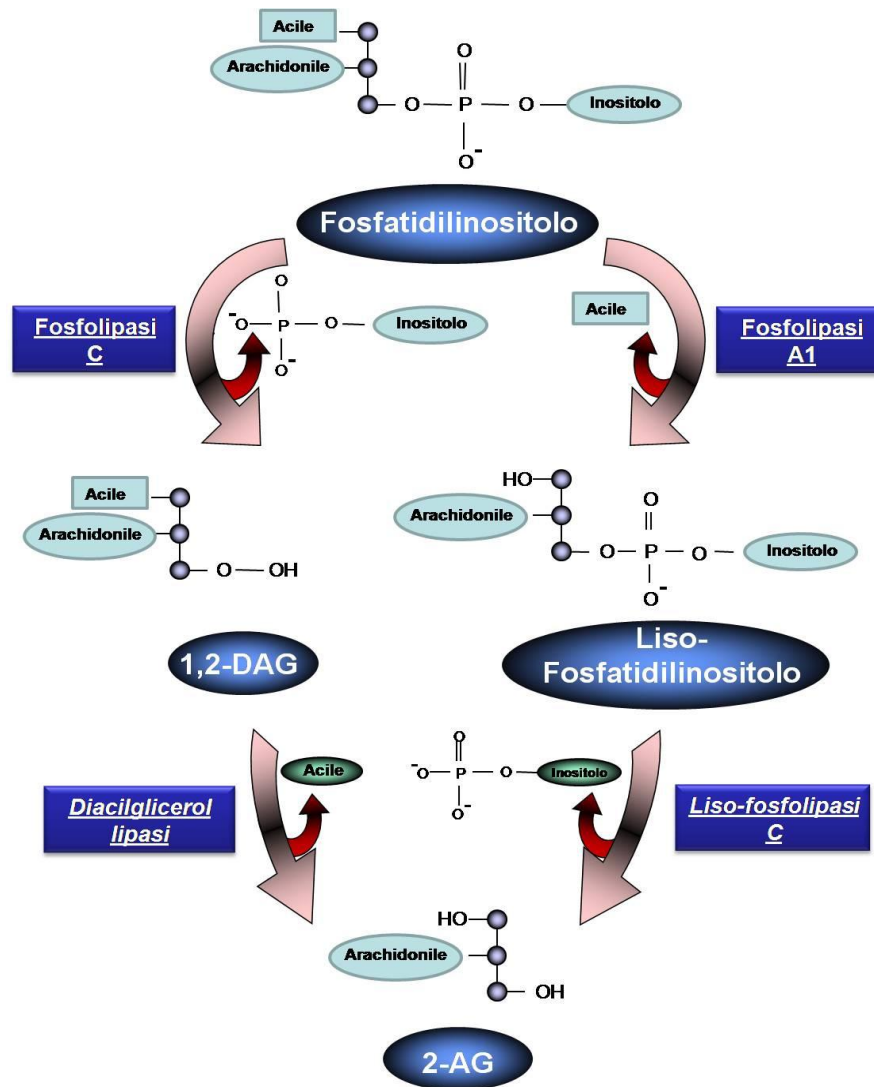


Fig. 4A Biosintesi dell'anandamide

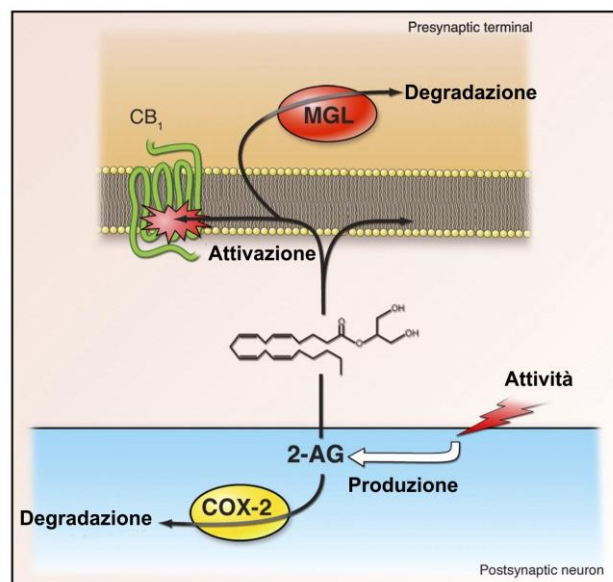


**Fig. 4B Biosintesi del 2-AG.**

A partire dalla prima descrizione nel 2001 (Kreitzer 2001; Maejima 2001), molti studi hanno evidenziato che gli ECs mediano un segnale retrogrado in varie sinapsi nel sistema nervoso centrale (SNC). Si pensa che il segnale retrogrado sia coinvolto in diverse funzioni fisiologiche e patologiche a livello cerebrale, come il controllo dell'appetito, l'assuefazione, i processi mnemonici e l'ecitotossicità (Bisogno 2007). In seguito all'attivazione dei recettori centrali CB<sub>1</sub>, infatti, gli ECs regolano la trasmissione sinaptica dei circuiti eccitatori e inibitori attraverso la modulazione del rilascio dei diversi neurotrasmettitori (Howlett 2002a,b; Wilson 2002) inclusi il GABA, il glutamato, il D-aspartato, l'acetilcolina, la dopamina, la

norepinefrina e la serotonina (Bambico 2009). In base a questo schema, l'effetto degli endocannabinoidi sembra dipendere dalla localizzazione dei recettori  $CB_1$  all'interno dei circuiti neuronali eccitatori o inibitori (Vinoid 2006).

Rilasciati nello spazio sinaptico, gli ECs sono rapidamente prelevati da una proteina trasportatrice non ancora identificata all'interno del neurone, dove l'AEA è degradata dalla *membrane-bound serine hydrolase fatty acid amide hydrolase* (FAAH), ma anche dalla ciclossigenasi-2, dalla lipossigenasi e dal citocromo P450, e la 2-AG dalla monogliceride lipase (MGL) e dalla FAAH (Pertwee 2005a). L'allontanamento dalla spazio extracellulare si ha attraverso due processi: il trasporto all'interno delle cellule e la successiva degradazione enzimatica (Fowler 2002; Hillard 2000; McFarland 2004b) (Fig. 5). Diversi analoghi strutturali dell'anandamide, come l'AM404, sono in grado di inibire la sua ricaptazione (Beltramo 1997; Piomelli 1999).



**Fig. 5 Rappresentazione schematica dell'interruzione dell'attività della 2-AG.** Questa è parzialmente degradata dalla COX-2 nel sito post sinaptico dopo la sua sintesi. Il 2-AG è rilasciato dal neurone postsinaptico ed entra all'interno della doppia membrana lipidica della terminazione presinaptica. Nella terminazione presinaptica il 2-AG attiva il recettore  $CB_1$  tramite la diffusione attraverso la doppia membrana lipidica. In quel momento, il 2-AG è degradato soprattutto dalla MGL nel citoplasma della terminazione presinaptica ed assonico.



## 2.3 Recettori cannabinoidi

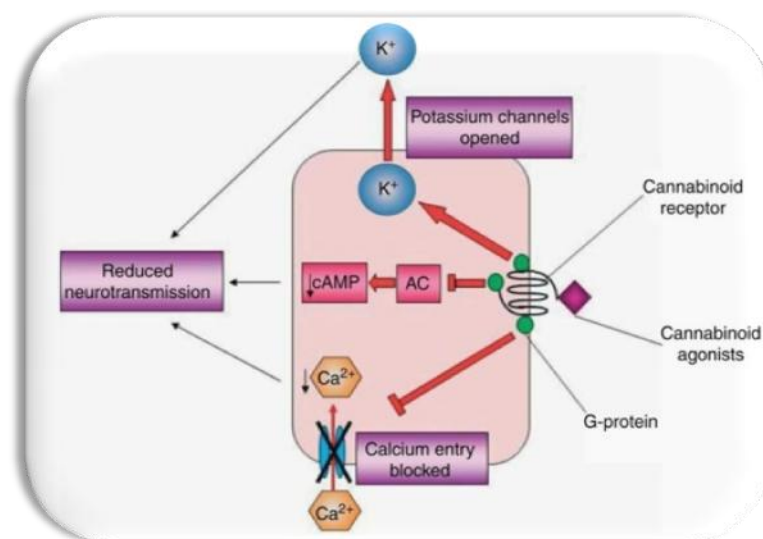
La natura dei CB venne identificata quando Howlett dimostrò che i cannabinoidi portano alla diminuzione dell'cAMP nelle colture cellulari di neuroblastoma (Howlett 1984) suggerendo la mediazione da parte di un recettore accoppiato alla proteina  $G_{i/o}$  (Howlett 1986; Howlett 1985; Howlett 1984). Il  $CB_1$  ed il  $CB_2$  sono stati descritti in molte specie animali (non solo nell'uomo, ma anche nella scimmia, nel maiale e nei roditori) e presentano una distribuzione sorprendentemente differente (Kano 2009). Inizialmente, si credeva che il recettore  $CB_1$  (recettore centrale per i cannabinoidi) fosse localizzato esclusivamente nel cervello ed il recettore  $CB_2$  (recettore periferico per i cannabinoidi) nelle cellule del sistema immunitario (Ameri 1999). Recentemente il recettore  $CB_1$  è stato individuato anche in un certo numero di tessuti periferici quali quelli del sistema cardiovascolare e riproduttivo, e nell'apparato gastrointestinale (Crocì 1998; Pertwee 1997-2001; Szabo 2001). Da studi recenti si è potuto appurare che il recettore  $CB_2$  è presente anche nel SNC nelle cellule microglia (Ashton 2006; Kearns 1997) come anche nei neuroni (Gong 2006; Skaper 1996). L'abbondanza del  $CB_1$  e la scarsità del  $CB_2$  nel SNC implica che il  $CB_1$  sia in primo luogo responsabile degli effetti psicoattivi dei cannabinoidi esogeni e delle azioni fisiologiche degli endocannabinoidi nel cervello (Elphick 2001).

Il primo recettore cannabinoide, il  $CB_1$ , è stato clonato e caratterizzato nel 1991 (Matsuda 1990) ed il secondo, il  $CB_2$ , nel 1993 (Munro 1993). Entrambi appartengono alla super famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G. Sia il  $CB_1$  che il  $CB_2$  sono accoppiati alla proteina  $G_i$  o  $G_o$ , negativamente all'adenylyl cyclase, ai canali al  $Ca^{2+}$  del tipo N e P/Q e positivamente al tipo A ed ai canali  $K^+$  che regolano la corrente in entrata ed alla *mitogen-activated protein kinase* (MAP) (Howlett 2002 a,b). Contengono un dominio extracellulare N-terminale che possiede un sito glicosilato, un dominio C-terminale intracellulare accoppiato al complesso della proteina G e sette segmenti idrofobici trans membrana connessi a *loops* alternati extracellulari ed intracellulari (Svizenska 2008).

Studi recenti hanno riportato che in aggiunta ai CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> altri due tipi di recettori sembrano essere bersaglio degli endocannabinoidi: il *transient receptor potential cation channel*, facente parte della sottofamiglia V, membro 1 (TPRV<sub>1</sub>) (Zygmunt 1999), un recettore cannabinoidale insolito, orfano, il GPR55 (Ryberg 2007) ed un recettore aggiuntivo non identificato, endoteliale e cardiaco, che potrebbe mediare gli effetti cardiovascolari indotti dai cannabinoidi (O'Sullivan 2004; Pacher 2006).

Da quando il recettore CB<sub>1</sub> è stato caratterizzato per la prima volta sugli elementi neuronali di cervello di ratto, una cospicua quantità di dati in vivo ed in vitro hanno rafforzato l'ipotesi che la maggior parte delle funzioni del sistema EC siano esplicate attraverso il controllo dell'attività neuronale (Pazos 2005).

Il recettore CB<sub>1</sub> è localizzato sulle terminazioni presinaptiche dei neuroni, il che suggerisce un segnale di trasmissione retrogrado (Howlett 2002; Pagotto 2006; Wilson 2002) attraverso il quale gli endocannabinoidi agiscono nel ridurre l'eccitabilità neuronale attraverso l'effetto inibitorio sui canali al Ca<sup>2+</sup> voltaggio dipendenti e l'attivazione di quelli per il K<sup>+</sup> (Howlett 2004) (Fig. 6).



**Fig. 6** L'attivazione del recettore cannabinoidale spesso porta alla riduzione della neurotrasmissione cellulare attraverso il blocco del Ca<sup>2+</sup> in entrata, attraverso l'iperpolarizzazione, a causa dell'attivazione dei canali al K<sup>+</sup> o per la riduzione della produzione di cAMP.

La distribuzione dei recettori cannabinoidi nel cervello è stata da principio caratterizzata nel cervello di ratto e di uomo (Glass 1997; Herkenam 1990-1991; Mailleux 1992; Tsou 1997; Wastlake 1994) attraverso l'utilizzo del ligando cannabinoide sintetico radioattivo [<sup>3</sup>H]CP55,940 (Herkenam 1991-1990; Mailleux 1992).

Il recettore CB<sub>1</sub> è stato individuato in regioni che influenzano un insieme di funzioni chiave che comprendono l'umore, la coordinazione motoria, la memoria, le emozioni e le funzioni cognitive (Svizenska 2008). In particolare, il recettore CB<sub>1</sub> è presente in modo diffuso nel bulbo olfattorio, nell'ippocampo (con densità particolarmente elevata nello strato molecolare dentato e nella regione CA3), nella pars reticolata della substantia nigra, nel globus pallidus, nel nucleo entopeduncolare e nel cervelletto. Livelli moderati si possono osservare nella corteccia cerebrale, nel setto, nell'amigdala, nell'ipotalamo ventromediale (Kano 2009). Recenti studi hanno dimostrato che i recettori CB<sub>1</sub> sono localizzati sui neuroni monoaminergici, in particolare, nel dorsal raphe (DR), nucleo che rappresenta la fonte principale di neuroni serotoninergici nel cervello (Haring 2007) e nel nucleo del locus coeruleus (LC) che è la fonte di neuroni noradrenergici (Oropeza 2007).

Numerosi studi dimostrano attraverso tecniche elettrofisiologiche e biochimiche che l'attivazione del recettore CB<sub>1</sub> sia in grado di inibire il rilascio neurotrasmettitoriale (Schlicker 2001). I neurotrasmettitori che possono essere controllati dal recettore CB<sub>1</sub> includono: glutammato (Levenes 1998), GABA (Szabo 1998), glicina (Jennings 2001), acetilcolina (Gifford 1996), norepinefrina (Ishac 1996), dopamina (Cadogan 1997), serotonina (Nakazi 2000).

Il recettore cannabinoide CB<sub>2</sub> è stato identificato nel 1993 come un recettore periferico espresso nei macrofagi (Munro 1993). In seguito, l'espressione del recettore nel cervello è stata accertata mediante diverse tecniche sperimentali quali *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR), ibridazione *in situ* ed immunistochimica. Sebbene i livelli del recettore CB<sub>2</sub> nel cervello siano molto bassi rispetto agli organi del sistema immunitario

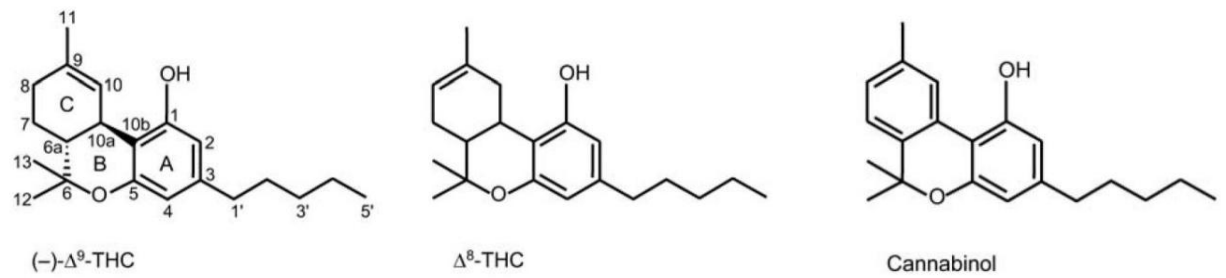
(Gong 2006), questo è stato trovato nelle cellule microglia, non negli astrociti (Ashton 2006, Nunez 2004), e la sua sintesi viene aumentata in risposta al dolore cronico (Beltramo 2006; Marsez 2005; Nunez 2004; Zhang 2003). Diversi lavori dimostrano l'espressione neuronale dei recettori CB<sub>2</sub> in varie regioni cerebrali tra cui il tubercolo olfattorio, la corteccia cerebrale, lo striato, l'ippocampo, l'amigdala, la substantia nigra (Gong 2006; Onaivi 2006) dove però sono espressi a livello del soma neuronale e nei dendriti ma non nelle terminazioni (Gong 2006; Onaivi 2006).

## 2.4 Ligandi recettoriali dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>

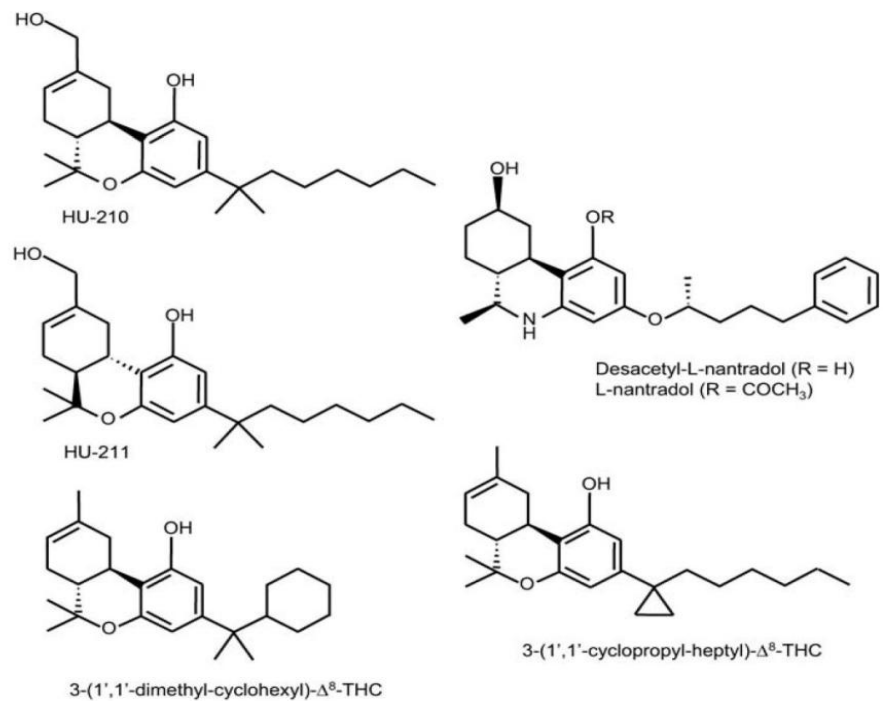
Gli agonisti dei recettori cannabinoidi ricadono essenzialmente all'interno di quattro gruppi principali: classici, non classici, aminoalchilindoli ed eicosanoidi (Howlett 2002 a,b):

- **Classici:** il gruppo comprende i derivati benzopiranic che sono sia i composti derivati dalla *C. sativa* (fitocannabinoidi) sia i loro analoghi sintetici. Ne sono esempi il fitocannabinoide  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC ed il cannabinolo. Gli analoghi sintetici comprendono l'11-hydroxy- $\Delta^8$ -THC-dimethylheptyl (HU-210), JWH-133, L-759633, L-nantradol e desacetyl-1-nantradol (Fig. 7)
- **Non classici:** questa classe comprende gli analoghi biciclici e triciclici del  $\Delta^9$ -THC che lega un anello piranico; vi appartengono per esempio il CP55940, il CP47497 e l' HU-308 (Fig. 8)
- **Aminoalchilindoli:** questo gruppo comprende composti che hanno strutture completamente differenti da quelle degli altri cannabinoidi: WIN5521-2, AM1241, JWH-015, BML190 (Fig. 9)
- **Eicosanoidi:** questi composti presentano strutture differenti dalle classi precedenti di cannabinoidi. Vi appartengono l'arachidonoiletanolamide (anandamide), l' *O*-arachidonoiletanolamina (virodamina), il 2-arachidonoil glicerolo ed il 2-arachidonoil

gliceril etere (noladin etere) (Fig. 10) ed altri diversi analoghi sintetici dell'anandamide come l'arachidonoil-2-cloroetilamide (Howlett 2002 a,b; Pertwee 1999; Porter 2002).

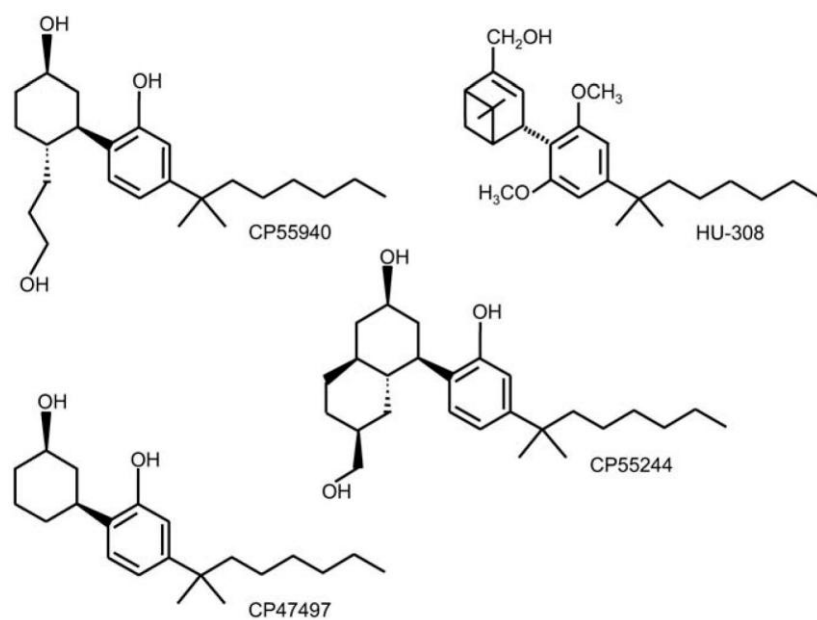


### A (Fitocannabinoidi)

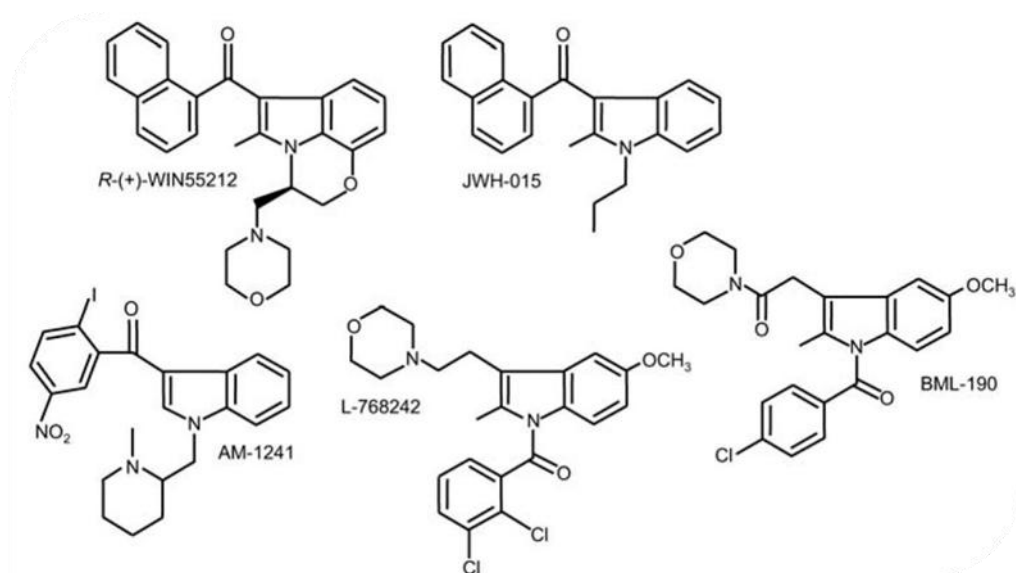


### B (Analoghi sintetici)

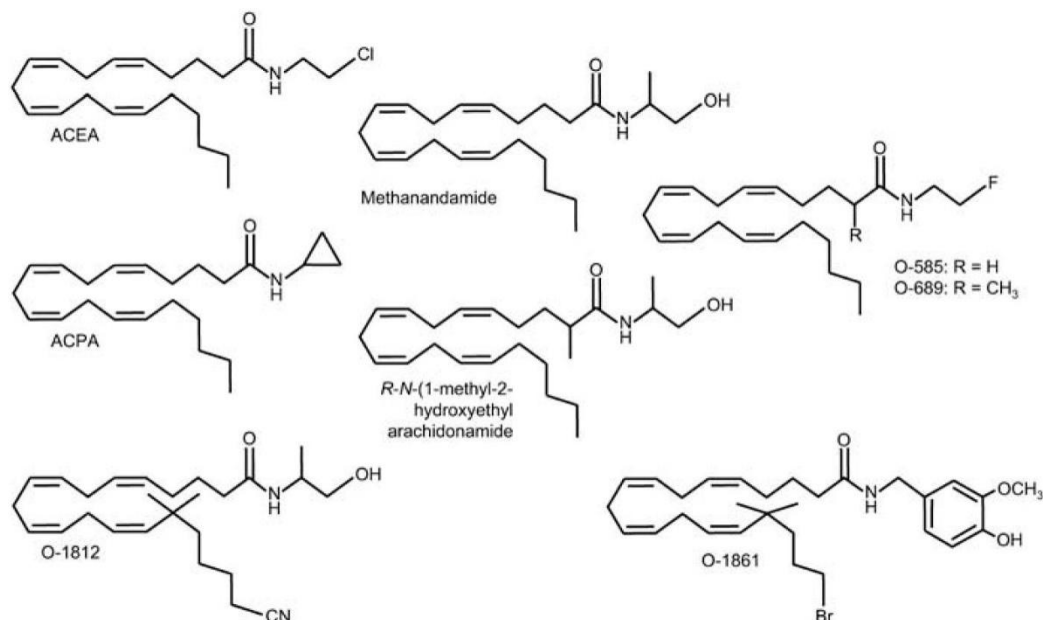
**Fig. 7 Strutture degli agonisti cannabinoidi:** (A) Fitocannabinoidi; (B) Analoghi sintetici.



**Fig. 8** Strutture di quattro cannabinoidi non classici.



**Fig. 9** Strutture degli Aminoalchilindoli

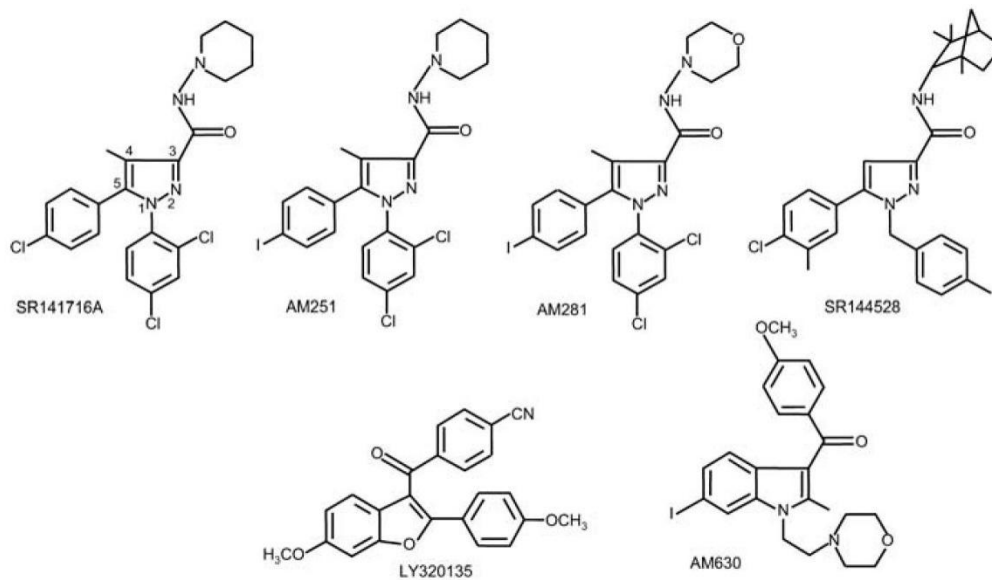


**Fig. 10** Strutture di otto analoghi strutturali dell'anandamide.

## 2.5 Antagonisti selettivi dei recettori CB<sub>1</sub>

Il primo antagonista selettivo (agonista inverso), l'SR141716A (rimonabant), sviluppato da Sanofi Ricerche (Rinaldi-Carmona 1994), previene o antagonizza rapidamente gli effetti indotti dai cannabinoidi sui recettori CB<sub>1</sub> sia in vitro che in vivo (Howlett 2002b; Pertwee 1997). Questo composto è un antagonista puro a basse concentrazioni (nanomolare), presentando una considerevole potenza e selettività per i recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> ma si comporta da agonista inverso a concentrazioni più elevate. Sebbene l'SR141716A sia selettivo per il CB<sub>1</sub> non è specifico per il CB<sub>1</sub>, per cui a dosi sufficientemente elevate blocca entrambi i recettori (Pertwee 1999). Risultati di esperimenti di *binding* indicano che potrebbe essere ragionevole assumere che le concentrazioni di questi ligandi, in un *range* nano molare basso o medio, interagiscano principalmente con il recettore CB<sub>1</sub> quando applicate ad un tessuto che contiene sia il CB<sub>1</sub> che CB<sub>2</sub>; lo stesso non accade con le alte concentrazioni.

Altri antagonisti selettivi CB<sub>1</sub> sono tra gli altri l'AM251, l'AM281 e l'LY320135 (Fig.11).



**Fig.11** Strutture di diversi antagonisti selettivi/agonisti inversi CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>

## 2.6 Agonisti inversi

Numerosi risultati indicano che quando l'SR141716A viene somministrato in vivo o in vitro è in grado di produrre effetti cannabinomimetici inversi, opposti a quelli prodotti dall'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> (Pertwee 2003). Altri risultati mostrano che effetti inversi possono essere indotti da altri antagonisti come l'AM251 (Vasquez 2003) e l'AM281 (Cosenza 2000).

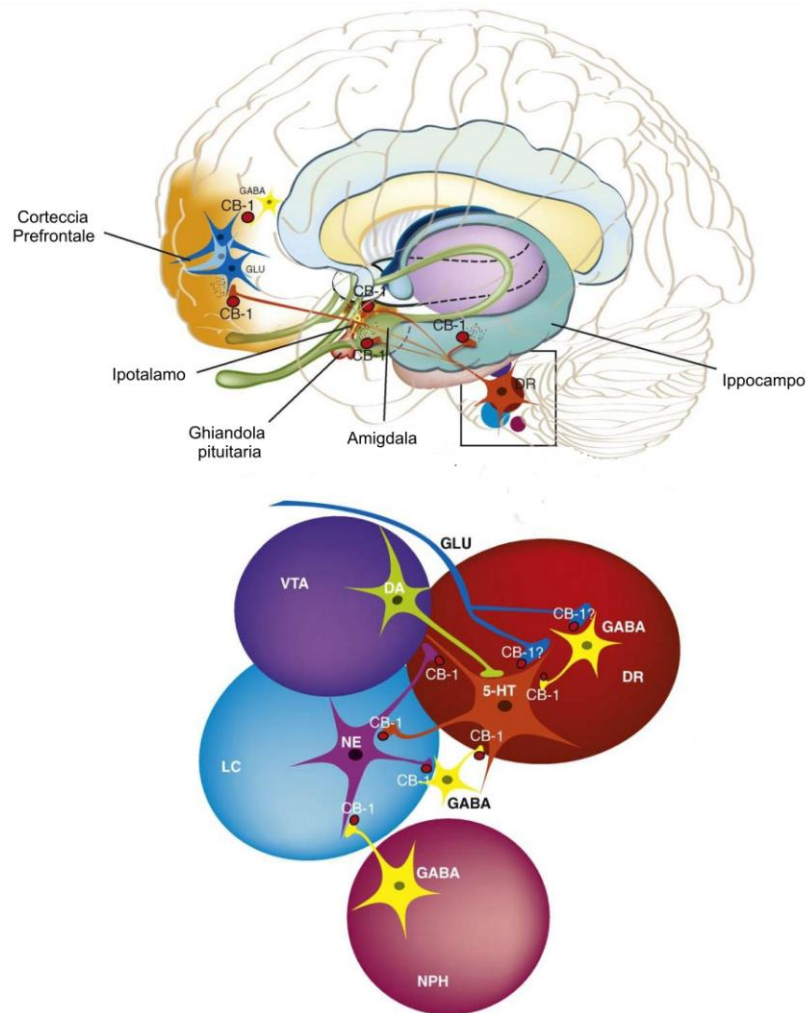


### 3.1 Ruolo del sistema endocannabinoide nei disturbi dell'umore.

Il sistema EC svolge un ruolo importante in diverse funzioni cerebrali inclusi l'apprendimento, la memoria, l'ansia, la depressione, la dipendenza, l'appetito, il comportamento alimentare, il dolore e la neuroprotezione.

L'idea che il sistema EC possa essere coinvolto nel comportamento emozionale, ed in particolare nella depressione, è supportata dal fatto che il consumo della *C. sativa* nell'uomo ha profondi effetti sull'umore. Per secoli, in tutto il mondo, diverse popolazioni hanno fatto uso della *C. sativa* per elevare l'umore ed avere effetti euforizzanti (Williamson 2000). Un ampio studio epidemiologico ha dimostrato che gli utilizzatori abituali di *C. sativa* manifestano umore meno depresso ed effetti più positivi rispetto ai non consumatori di *C. sativa* (Denson 2006). La segnalazione di singoli casi clinici supporta ulteriormente l'idea che l'uso della *C. sativa* possa esercitare effetti antidepressivi in alcuni individui clinicamente depressi (Gruber 1996).

Dal momento che gli effetti psicoattivi della *C. sativa*, in particolare quelli del suo principale costituente psicoattivo il  $\Delta^9$ -THC, sono mediati dal recettore CB<sub>1</sub>, questi dati supportano l'ipotesi che la stimolazione di tale recettore possa avere effetti antidepressivi ed, in generale, positivi sull'umore. In accordo con tale ipotesi, i recettori CB<sub>1</sub> e gli enzimi coinvolti nella sintesi e degradazione dei ligandi endocannabinoidi sono presenti in quelle regioni cerebrali implicate nella modulazione delle risposte emozionali legate all'umore, all'ansia ed alla depressione, quali la PFC, l'amigdala, l'ippocampo, l'ipotalamo ed i circuiti monoaminergici del proencefalo (Herkenham 1991) (Fig. 12). Inoltre la localizzazione dei recettori CB<sub>1</sub> nelle terminazioni presinaptiche e negli assoni glutamatergici, dopaminergici, GABAergici e colinergici (Wilson 2002) conferisce ad i recettori CB<sub>1</sub> una posizione chiave nella regolazione dell'attività dei circuiti neurali coinvolti nella fisiologia e fisiopatologia dell'umore e dell'ansia (Witkin 2005).



**Fig. 12 I recettori  $CB_1$  sono localizzati nelle aree coinvolte nel controllo dell'umore.** I neuroni piramidali glutammatergici della PFC, che esprimono i recettori  $CB_1$ , inviano i loro assoni ai neuroni serotonergici ed agli interneuroni GABAergici del DR. L'attivazione di questi incrementa l'attività elettrica dei neuroni serotonergici ed il rilascio di serotonina. I neuroni serotonergici innervano l'amigdala, la PFC e l'ippocampo, aree cerebrali strettamente coinvolte nei sintomi depressivi. L'ippocampo invia afferenze alla ghiandola pituitaria, regolando l'asse HPA che è notevolmente alterato nella depressione. I recettori  $CB_1$  sono inoltre espressi nei neuroni noradrenergici del LC che a sua volta innerva il DR, l'ippocampo, l'amigdala (afferente non mostrate in figura) I neuroni dopaminergici della VTA inviano i loro assoni al DR.

I molteplici studi condotti ad oggi per indagare e comprendere il ruolo del sistema EC nei disturbi dell'umore, hanno utilizzato agonisti e/o antagonisti del recettore  $CB_1$  e farmaci capaci di interagire a diversi livelli di tale sistema, inibendo l'attività della FAAH o il trasportatore degli endocannabinoidi. Inoltre, gli animali KO sia per il recettore  $CB_1$  che per la FAAH si sono rivelati degli ottimi mezzi per lo studio del ruolo fisiologico e fisiopatologico del sistema EC.

Gli studi clinici hanno confermato l'importanza del sistema EC nei disturbi dell'umore. Infatti, in pazienti depressi sono stati osservati livelli serici di ECs alterati e l'abuso di *C. sativa* è stato associato a psicosi ed al peggioramento del disturbo maniaco-depressivo, con resoconti aneddotici di effetti sia antidepressivi che antimaniacali dei cannabinoidi. In pazienti trattati con l'antagonista/agonista inverso dei recettori CB<sub>1</sub>, l'SR141716A si è osservato un incremento del rischio di insorgenza di episodi depressivi (Serra 2007).

### **3.2 Effetti delle diverse manipolazioni del sistema EC nei modelli animali di depressione.**

Nei modelli animali di depressione è stato dimostrato che sia l'attivazione a diversi livelli del sistema EC (Bortolato 2007; Gobbi 2005; Hill 2005a, Hill 2005c) che il blocco dei recettori CB<sub>1</sub> provoca risposte antidepressive e ansiolitiche (Griebel 2005; Shearman 2003; Steiner 2008; Witkin 2005).

Hill e Gorzalka (Hill 2005a) hanno dimostrato che l'attivazione sia diretta che indiretta del recettore CB<sub>1</sub> ha un effetto antidepressivo nel modello animale *forced swimming test* (FST). Nel FST la somministrazione dell'inibitore della ricattura della FAAH, l'AM404, e dell'agonista del recettore CB<sub>1</sub>, l'HU-210, induce un effetto antidepressivo simile a quello che si osserva dopo la somministrazione della desimipramina, antidepressivo classico. Tali effetti comportamentali sono bloccati dalla somministrazione dell'AM251 (antagonista CB<sub>1</sub>), suggerendo che la stimolazione del recettore CB<sub>1</sub> possa essere responsabile dell'effetto antidepressivo. In accordo con tale ipotesi, la somministrazione dell'URB597 (inibitore della FAAH) induce una risposta simil-antidepressiva nel FST e nel modello animale di depressione, il *mouse tail suspension* (TST). Anche questi effetti sono bloccati dall'SR141716A, confermando ulteriormente il coinvolgimento dei recettori CB<sub>1</sub> negli effetti antidepressivi della *C. sativa* (Gobbi 2005). Gli effetti indotti dall'URB597 e attenuati dall'SR141716A sembrano essere dovuti alla stimolazione dei recettori CB<sub>1</sub> da parte

dell'AEA. L'URB597, infatti, aumenta i livelli dell'AEA nell'ippocampo, nella PFC e nel mesencefalo; inoltre esso aumenta l'attività elettrica dei neuroni serotonergici nel DR e i livelli di rilascio della 5-HT nell'ippocampo, effetti compatibili con un meccanismo d'azione caratteristico degli antidepressivi. La somministrazione cronica dell'URB597 induce un effetto anti-depressivo anche nel modello di depressione *chronic mild stress* (CMS), effetto accompagnato da un aumento dei livelli di AEA nel mesencefalo, nello striato e nel talamo (Bortolato 2007). Risultati simili nel topo sono stati ottenuti con l'agonista dei recettori CB<sub>1</sub>, l'ACEA, nel FST e nell' "*head twitch response*" (Wong 2004). Tuttavia un recente lavoro riporta che topi KO per la FAAH non hanno comportamenti anti-depressivi nel FST e nel mouse TST (Naidu 2007).

In ultimo, il trattamento cronico con l'HU-210 promuove la neurogenesi nell'ippocampo di ratti adulti e determina un comportamento antidepressivo nel FST. Entrambi gli effetti sono bloccati dall'AM281 (antagonista del recettore CB<sub>1</sub>) e dall'irradiazione ippocampale che blocca la neurogenesi (Jiang 2005) suggerendo che l'effetto antidepressivo dell'agonista CB<sub>1</sub> possa essere correlato alla promozione della neurogenesi.

Tutte queste evidenze suggeriscono che l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> sia diretta, attraverso la somministrazione di agonisti, che indiretta, indotta dall'incremento dei livelli degli ECs, possa produrre un effetto antidepressivo.

Tale ipotesi però contrasta con tutte le evidenze sperimentali che dimostrano come il blocco dei recettori CB<sub>1</sub> induca un effetto simil-antidepressivo in alcuni modelli animali di depressione.

Infatti, diversi antagonisti dei recettori CB<sub>1</sub> hanno mostrato un effetto "antidepressivo" in diversi modelli: l'AM251 nel TST nel topo e nel FST nel ratto (Sherman 2003); l'SR141716A nel FST nel ratto, nel topo (Sherman 2003) e nel CMS nel topo (Griebel 2005). L'effetto dell'AM251 nel TST nel topo è bloccato dall'agonista CB<sub>1</sub>, CP55940, che di per sé

produce un effetto "depressogeno", che però non è stato osservato nei topi CB<sub>1</sub> KO (Sherman 2003).

Diverse osservazioni potrebbero, almeno in parte, rendere ragione di questi risultati contrastanti. Per esempio, l'SR141716A esercita il suo effetto solo a dosi alte (Tzavara 2003) e stimola la neurogenesi nei topi CB<sub>1</sub> KO ma non nei topi TPRV<sub>1</sub> (recettore vanilloide)-KO (Jin 2004). Inoltre, gli effetti antidepressivi dell'URB597 nel TST e nel FST, così come il comportamento antidepressivo-simile nei topi FAAH-KO, sono stati dimostrati solo in particolari condizioni sperimentali (Naidu 2007).

### **3.3 Sistema EC nei modelli animali di depressione**

I risultati sperimentali ottenuti dalla maggior parte degli studi volti ad indagare il ruolo del sistema EC nei modelli animali di depressione sembrano indicare come questi modelli risultino associati ad una diminuita funzionalità del sistema EC.

La delezione genetica del recettore CB<sub>1</sub> nel topo determina un fenotipo reminiscente del profilo sintomatologico della depressione *melanconica* (Hill 2005c) in cui si osserva: aumento dei comportamenti simil-depressivi (Steiner 2008) e ansiosi (Urigen 2004), iperattività e deficitaria inibizione dell'asse HPA (Cota 2007), diminuito comportamento alimentare (Ravinet 2004) e diminuita risposta agli stimoli gratificanti (Sanchis-Segura 2004).

I topi CB<sub>1</sub> KO sviluppano più facilmente un comportamento simil-depressivo nel CMS, mostrando una riduzione dell'assunzione di saccarosio, considerato un indice di anedonia nell'animale (Martin 2002).

L'esposizione allo stress cronico (CMS) determina una *down-regulation* del sistema EC, riducendo sia la densità dei recettori CB<sub>1</sub> che i livelli di 2-AG nell'ippocampo (Hill 2005b).

In linea con questi risultati è stato riportato un aumento e una diminuzione dei livelli di mRNA dei CB<sub>1</sub>, rispettivamente nella PFC e nel mesencefalo di ratti sottoposti a CMS (Bortolato 2007). Recentemente Hill et al. (Hill 2008b) hanno dimostrato che il CMS

modifica in maniera regione- specifica la densità dei recettori CB<sub>1</sub> con un incremento a livello della PFC e una diminuzione a livello dell'ippocampo, dell'ipotalamo e dello striato ventrale, associato ad una significativa riduzione dell'AEA in tutte le aree. Infine in animali sottoposti a bulbectomia olfattoria bilaterale (OBX), un altro modello di depressione, si è osservato una *up-regulation* della densità e della funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub> a livello della PFC e dell'amigdala (Rodriguez-Gaztelumendi 2009).

### **3.4 Effetto dei farmaci antidepressivi sul sistema EC**

I farmaci attualmente utilizzati nella terapia della depressione esplicano la loro azione terapeutica determinando un aumento della neurotrasmissione monoaminergica (noradrenergica e serotoninergica), o inibendo la ricaptazione a livello sinaptico o il metabolismo enzimatico delle monoamine, mentre trattamenti somatici, quali la terapia ECT o la stimolazione somatica del nervo vago, aumentano la trasmissione sinaptica attraverso meccanismi indiretti (Bambico 2008). Diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> incrementa la trasmissione monoaminergica e che gli agonisti cannabinoidi e gli inibitori dell'idrolisi della AEA incrementano l'attività dei neuroni del nucleo del DR, la principale fonte di neuroni serotoninergici (Bambico 2007). L'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> della PFC incrementa l'attività neuronale dei neuroni del DR attraverso un circuito multisinaptico e la risposta simil-antidepressiva evocata dall'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> nella PFC necessita del segnale serotoninergico (Bambico 2007). È stato inoltre scoperto che l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> incrementa l'attività dei neuroni del LC, la principale fonte di neuroni noradrenergici (Gobbi 2005, Muntoni 2006).

Ad oggi pochi studi hanno investigato l'effetto prodotto dalla somministrazione acuta e/o cronica dei farmaci antidepressivi sul sistema EC, riportando peraltro risultati contraddittori. Alcuni lavori hanno dimostrato che diversi trattamenti antidepressivi, quali il trattamento cronico con la desimipramina (Hill 2006), con la trianilcipromina (inibitore delle

momoaminossidasi), con la fluoxetina (inibitore selettivo del *reuptake* della 5-HT) (Hill 2008 b), con l'ECT (Hill 2007) o con la deprivazione di sonno (Chen 2005), determinano un aumento dell'espressione e della funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub>, supportando l'ipotesi che un'ipofunzionalità del sistema EC contribuisca alla eziopatogenesi della depressione e che una iperfunzionalità del sistema sia associata con un'efficace azione antidepressiva. D'altra parte, altri lavori dimostrano che una singola somministrazione di ECs (Hill 2007) ed il trattamento cronico con fluoxetina (Olivas 2005) inducono una *down-regulation* del sistema EC, suggerendo che una diminuita attività della trasmissione endocannabinoidergica possa alleviare la sintomatologia depressiva.

### **3.5 Studi clinici**

Per quanto riguarda gli studi clinici, diversi autori hanno evidenziato un'alterazione dei livelli sierici degli ECs nella depressione (Hill 2009 e; Hill 2008 a), mentre studi post-mortem hanno dimostrato un aumento dei livelli degli ECs associato ad una concomitante iperattività del recettore CB<sub>1</sub> nella PFC di suicidi (Hungund 2004; Vinod 2005). A tutt'oggi nessuno studio clinico pubblicato è stato eseguito utilizzando cannabinoidi per il trattamento dei disturbi affettivi, sebbene rapporti aneddotici abbiano descritto sia proprietà antidepressive che antipsicotiche della *C. sativa*, così come è stata documentata la capacità della *C. sativa* di indurre psicosi. Gli unici trials clinici attualmente presenti in letteratura sono quelli in cui si è utilizzato l'antagonista SR141716A (rimonabant) per valutare la sua efficacia nel trattamento dell'obesità.

Il rimonabant, infatti, approvato inizialmente in diversi paesi come farmaco per il trattamento dell'obesità, ha indotto nei pazienti un numero di episodi d'ansia e di depressione significativamente maggiore rispetto ai pazienti trattati con placebo, ed un aumento del rischio di suicidio (Nissen 2008; Van Gaal 2008). Questi gravi e preoccupanti effetti negativi hanno portato al ritiro del farmaco dal commercio sia in Nord America che in Europa (Hill 2009c).

Infine, recenti studi genetici hanno dimostrato che individui con certi aplotipi del recettore CB<sub>1</sub> presentano una maggiore vulnerabilità a sviluppare depressione in seguito ad eventi negativi della vita ed un maggior rischio di resistenza agli antidepressivi (Domschke 2008). Nel complesso, tutti questi dati supportano l'ipotesi che nell'uomo un'attività insufficiente del sistema EC sia in grado di promuovere l'insorgenza e lo sviluppo della depressione e che un deficit di tale sistema neurotrasmettitoriale sia presente in almeno un sottotipo di individui depressi (Hill 2009d).



## OBIETTIVO DELLO STUDIO

Come precedentemente menzionato studi clinici e di base suggeriscono che un decremento dell'attività del sistema EC sia associato con la depressione. Al contrario, l'antagonista del recettore CB<sub>1</sub>, l'SR141716A, ha un effetto antidepressivo-simile nel modello animale predittivo dell'efficacia antidepressiva FST, ma è stato ritirato dal commercio per la sua capacità di indurre depressione nell'uomo. Allo scopo di chiarire tale discrepanza si è rivalutato, nelle stesse condizioni sperimentali, l'effetto dell'attivazione e del blocco dei recettori CB<sub>1</sub> nel FST, trattando acutamente o sub-cronicamente dei ratti con l'agonista HU-210 e l'antagonista SR141716A. Negli stessi animali abbiamo valutato se tali trattamenti modificavano, in selezionate aree cerebrali, la densità e/o la funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub>, misurate tramite l'autoradiografia-[<sup>3</sup>H]CP55940 e il [<sup>35</sup>S]GTPγS-*binding* stimolato da CP55940.

I test comportamentali sono stati effettuati dal gruppo del Prof. Gino Serra del Dipartimento del Farmaco dell'Università degli Studi di Sassari.

# MATERIALI E METODI

## 4.1 Animali

Abbiamo utilizzato ratti maschi Sprague-Dawley (Harlan, Italia) con un peso medio di  $335 \pm 0,25$  g (alloggiati e trattati nello stabulario del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Sassari) tenuti tre per gabbia in condizioni ambientali controllate (temperatura: 23 °C; umidità: 50-60%; luce-buio; 8:00-20:00) con libero accesso a cibo ed acqua.

## 4.2 Farmaci

I composti utilizzati per gli esperimenti sono: il [ $^3\text{H}$ ]-(-)-CP55940(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ -(R)-5 $\alpha$ ]-5-(1,1-dimethyleptyl)-2-[5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl) cyclohexyl] phenol), il 5'-O-(3-[ $^{35}\text{S}$ ]thiotriphosphate) ([ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S) acquistati dalla Perkin-Elmer Life Sciences Inc. (Boston, MA, USA); GDP, GTP $\gamma$ S, (-)-CP55940 e HU-210 ((6aR)-trans-3-(1,1-Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6Hdibenzo[b,d]pyran -9-methanol) acquistati rispettivamente dalla Sigma/RBI (St. Louis, MO, USA) e dalla Tocris (Ballwin, MO, USA). L'SR141716A ([N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide]) è stato gentilmente fornito dalla Sanofi-Synthelabo (Montpellier, Francia).

## 4.3 Gruppi sperimentali e trattamenti farmacologici.

Nel nostro studio sono stati eseguiti tre set di esperimenti. Nel primo set, i ratti sono stati suddivisi in tre gruppi e trattati acutamente con: a) HU-210 (0.1 mg/kg), b) SR141716A (3 mg/kg) e c) l'appropriato veicolo.

I farmaci sono stati somministrati per via intraperitoneale 24, 6 ed 1 (acutamente) ora prima del test comportamentale, il FST. Un'ora dopo il FST, gli animali sono stati sacrificati, i loro cervelli rimossi e conservati a -80 °C per gli studi biochimici.

Nel secondo set, i ratti sono stati divisi in quattro gruppi e trattati sub-cronicamente con a) HU-210 (0.1 mg/kg), b) SR141716A (3 mg/kg), c) imipramina (20 mg/kg), quale controllo positivo e d) l'appropriato veicolo. Infine, ciascun gruppo è stato suddiviso in due sottogruppi e gli animali sono stati sacrificati 1 o 24 h dopo il FST, i cervelli rimossi e conservati a -80 °C per gli studi biochimici.

Nel terzo set, allo scopo di escludere gli aspetti aspecifici e confondenti legati all'attività motoria, abbiamo confrontato gli effetti degli stessi farmaci nel test comportamentale, l'*open field*.

## **5.1 Test comportamentali**

### **5.2 Forced swimming test**

Secondo il metodo descritto da Porsolt et al. (1978), per il pre-test gli animali sono stati posti individualmente nei cilindri di plexiglas (40 cm altezza e 18 cm diametro) contenenti 15-16 cm di acqua a 25 °C. Dopo 15 minuti, sono stati rimossi dal cilindro e asciugati in un ambiente riscaldato (30 °C) per 30 minuti. Ventiquattro ore dopo gli animali sono stati rimessi nei cilindri per 5 minuti e la sessione del test è stata registrata con una videocamera. Gli esperimenti sono stati condotti tra le 13:00 e le 17:00. I video registrati sono stati osservati e analizzati da sperimentatori che ignoravano il trattamento ricevuto dall'animale esaminato. I dati sono stati analizzati con la tecnica del campionamento temporale: ogni 5 secondi, per un totale di 60 campionamenti in 5 minuti, il comportamento è stato classificato secondo 4 categorie possibili e mutualmente esclusive: *swimming*, *climbing*, (i.e. tentativi di arrampicarsi sulla parete del cilindro), *diving* ( immersione sotto il livello dell'acqua) ed

immobilità. I ratti sono considerati immobili quando galleggiano ed effettuano solo i movimenti necessari per mantenere le narici fuori dall'acqua. Una diminuzione del tempo di immobilità è considerato un effetto antidepressivo-simile. In aggiunta al tempo di immobilità (il tempo effettivo, misurato in sec, durante il quale il ratto rimane immobile) è stata misurata anche la latenza al primo episodio di immobilità (i.e. il tempo che intercorre dal momento dell'immissione dell'animale nell'acqua al primo episodio di immobilità).

### **5.3 Open field test**

L'open field consiste in un quadrato bianco (cm 100x100x20 h) diviso da strisce nere in 25 settori (20x20 cm). Gli animali venivano messi nel settore centrale e la loro attività motoria registrata per un periodo di 5 minuti tramite una videocamera. Quando l'animale attraversa il bordo del settore con tutte e quattro le zampe viene considerata una conta di mobilità. Sono stati inoltre contati il numero degli episodi di rearing (i.e. quando il ratto rimane sollevato sulle zampe posteriori).

### **5.4 Analisi statistica**

I risultati sono stati analizzati con l'analisi della varianza ad 1 via (ANOVA 1 via) seguita dal test Newman-Keuls. Gli scores per il *diving* non sono invece stati analizzati dal momento che soltanto pochi animali manifestavano in maniera occasionale tale comportamento.

## **6.1 Studi di binding autoradiografici**

### **6.2 Preparazione del tessuto cerebrale**

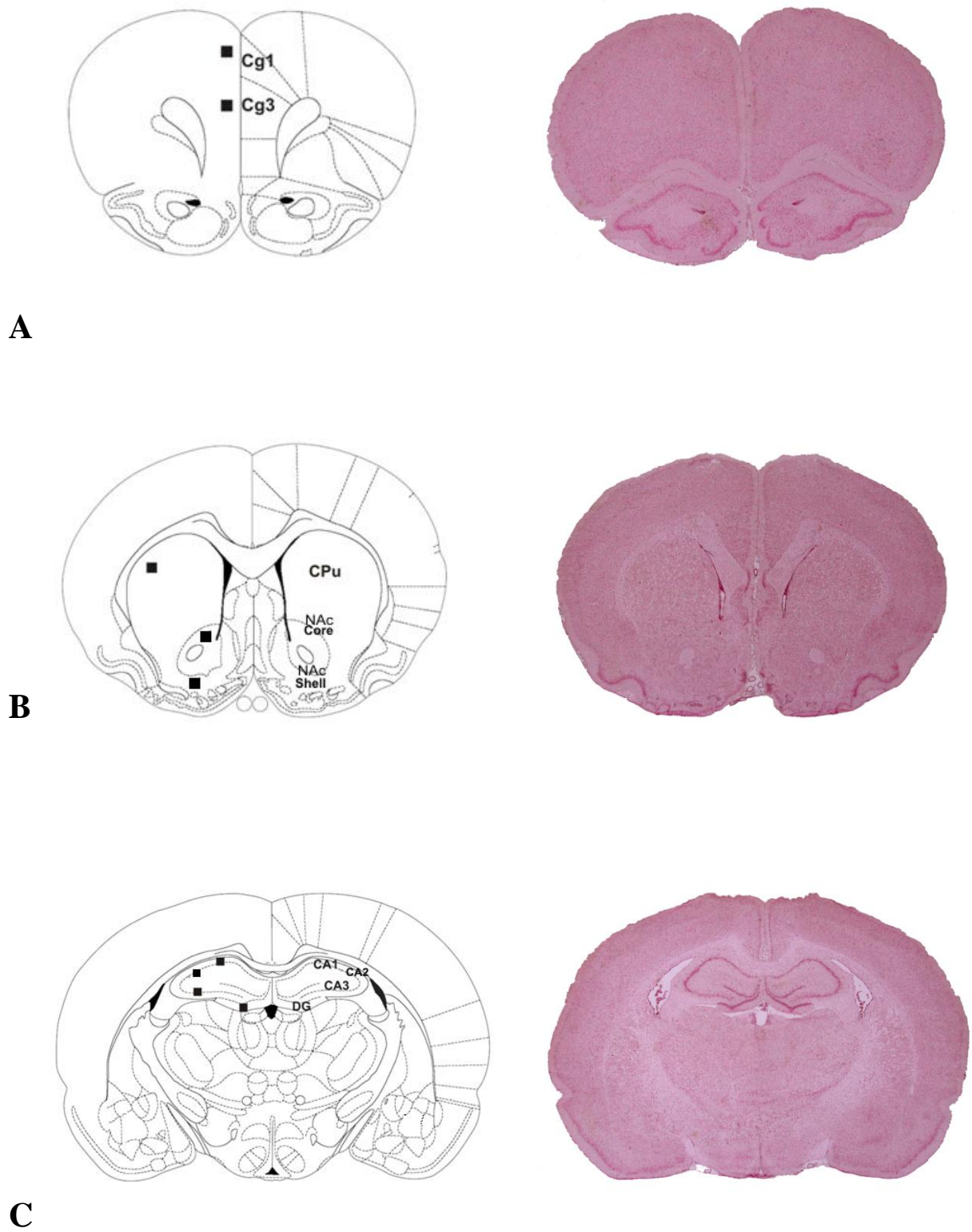
I ratti sono stati sacrificati tramite decapitazione 1 h o 24 h dopo l'esecuzione del FST. I cervelli sono stati rapidamente rimossi, immersi in isopentano e conservati a -80 °C prima di essere preparati per gli studi autoradiografici.

### **6.3 Autoradiografia con [<sup>3</sup>H](-)-CP55940**

Sezioni coronali di cervello dello spessore di 12-16 µm sono state tagliate con il criostato alla temperatura di -20 °C e successivamente montate su vetrini Superfrost Plus slides (BDH, Lutterworth, UK).

Le regioni cerebrali individuate per l'analisi, in accordo con l'Atlante Paxinos e Watson (1997) corrispondono a: corteccia cingolata 3 e 1 (AP+3.2), caudato putamen (CPu), nucleus accumbens core (NAc Core) e shell (NAc Shell) (AP+1.60 ), le aree CA1, CA2, CA3 dell'ippocampo ed il giro dentato (DG) dell'ippocampo (AP -2.14, -3.14) (Fig. 15).

Gli esperimenti di autoradiografia recettoriale per il CB<sub>1</sub> sono stati effettuati come descritto precedentemente da Castelli et al (2007). 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 [<sup>3</sup>H]CP55940 (attività specifica: 139.6 Ci/mmol; Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Il binding non specifico è stato determinato in sezioni cerebrali adiacenti in presenza di CP55940 non marcato alla concentrazione di 10 µM. 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. L'ultimo lavaggio è stato effettuato in acqua deionizzata a 4 °C e le sezioni sono state fatte asciugare all'aria.



**Fig. 15** Rappresentazione schematica, affiancata dalla sezione colorata con la metodica del rosso neutro, 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 CB<sub>1</sub> ed il binding [<sup>35</sup>S]GTPγS stimolato da CP55940. Cg3 e Cg1: area 3 e 1 della corteccia cingolata (AP+3.2); CPu: caudato putamen, NAc:nucleus accumbens; NAcC: core; NAcS: shell (AP+1.60); le regioni CA1, CA2, CA3: regioni 1, 2 e 3 del Corno di Ammone; DG: giro dentato dell'ippocampo (AP -2.56).

## 6.4 Binding [<sup>35</sup>S]GTPγS stimolato da CP55940 in autoradiografia

Gli esperimenti sono stati effettuati secondo il protocollo descritto precedentemente da Mateos et al. (2010). Le sezioni sono state preincubate in tampone (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 7.4) a 25 °C per 10 min. e preincubate con 3 mM GDP per 10 min in tampone a 25 °C. L'attività stimolata dall'agonista è stata determinata incubando le sezioni per 2 ore a 25 °C con 5 μM di CP55940 in tampone contenente 0.04 nM di [<sup>35</sup>S]GTPγS e 3 mM di GDP. L'attività basale è stata misurata in assenza di CP55940 ed in presenza di 3 mM GDP. Il binding non specifico è stato determinato in sezioni cerebrali adiacenti in presenza di 10 μM GTPγS non marcato. Al termine dell'incubazione le sezioni sono state lavate due volte con tampone Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) freddo e una volta con acqua deionizzata e quindi fatte asciugare all'aria.

## 6.5 Analisi delle immagini

Le sezioni di tessuto ed gli standard [<sup>3</sup>H] micro-scales (RPA 501 and 505, Amersham) per il [<sup>3</sup>H](-)-CP55940 o gli standard [<sup>14</sup>C]Micro-scales (RPA 504 and 511, Amersham) per il binding [<sup>35</sup>S]GTPγS sono state posizionate nella cassetta *Fujifilm BAS* ed esposte con la lastra autoradiografica BAS-5000. Le immagini ottenute sono state 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 [<sup>3</sup>H] o per il [<sup>14</sup>C]. L'attività GTPγS stimolata dall'agonista CP55,940 è stata calcolata sottraendo la densità ottica delle sezioni basali (incubate solo con GDP) da quella delle sezioni stimolate dall'agonista; i risultati sono stati espressi come percentuale dell'attività basale.

## 6.6 Analisi statistica

I dati corrispondenti alla densità ed all'attività sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{SEM}$  ed analizzati all'interno di ciascuna area cerebrale attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) con i due fattori, trattamento farmacologico e durata del trattamento o trattamento farmacologico e tempo di sacrificio, seguita, se necessario, dal test *post-hoc* Bonferroni. Nel caso in cui l'ANOVA a 2 vie abbia rilevato un effetto principale significativo o una interazione significativa tra le variabili, si è proceduto all'analisi con l'ANOVA ad 1 via. Tutti i calcoli statistici sono stati effettuati utilizzando il software SPSS, versione 13 (SPSS, Software, Inc., Chicago, IL, USA).



# RISULTATI

## 7.1 Forced swimming test

**Trattamento acuto:** come illustrato in fig. (13) sia l'agonista CB<sub>1</sub>, HU-210, che l'antagonista/agonista inverso SR141716A aumentano in maniera significativa gli *scores* dello *swimming* ( $F_{(2,27)}=11.02$ ,  $p<0.001$ ) e riducono gli *scores* dell'immobilità, ( $F_{(2,27)}=10.17$ ,  $p<0.001$ ) rispetto al veicolo, mentre non modificano quelli del *climbing* ( $F_{(2,27)}=0.71$ ,  $p=0.939$ ). La misurazione del tempo di immobilità è coerente con i risultati ottenuti con il campionamento temporale. Infatti, sia l'HU-210 che l'SR141716A riducono significativamente il tempo di immobilità ( $F_{(2,27)}=11,23$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 13D) rispetto al veicolo. Al contrario, l'antagonista/agonista inverso SR141716A non influenza la latenza al primo episodio di immobilità rispetto al veicolo, mentre l'agonista HU-210 aumenta in maniera drammatica questo parametro ( $F_{(2,27)}=14.26$ ,  $p<0.001$ ) paragonato al veicolo (Fig. 13E).

**Trattamento sub-cronico:** tutti i trattamenti determinano un decremento significativo degli *scores* dell'immobilità ( $F_{(3,24)}=9.98$ ,  $p<0.001$ ) rispetto al veicolo (Fig. 14A). La riduzione dell'immobilità è dovuta all'incremento dello *swimming* ( $F_{(3,24)}=8.01$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 14B), nel caso dell'HU-210 e dell'SR141716A, ed all'incremento del *climbing* ( $F_{(3,24)}=6.18$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 14C) nel caso dell'imipramina. L'imipramina e l'HU-210, ma non l'SR141716A, aumentano la latenza al primo episodio di immobilità rispetto al veicolo; l'HU-210 induce maggiore aumento del tempo di latenza al primo episodio di immobilità anche rispetto all'imipramina ( $F_{(3,24)}=11.89$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 14D).

## 7.2 Open field

Sia l'imipramina che l'HU-210 riducono l'attività locomotoria nell'open field, come rivelato dal ridotto numero di *crossing* dei bordi dei quadrati (Fig. 15A) ( $F_{(3,39)} = 14.39$ ,  $p < 0.0001$ ) e degli episodi di *rearing* (Fig. 15B) ( $F_{(3,39)} = 12.53$ ,  $p < 0.0001$ ) rispetto al veicolo, mentre l'SR141716A non modifica né il *crossing* né il *rearing*.

## 7.3 Densità e funzione del recettore CB<sub>1</sub>

Gli effetti del FST sulla densità e sulla funzionalità del recettore CB<sub>1</sub> sono stati valutati in diverse aree cerebrali di ratti trattati con veicolo e sacrificati 1 o 24 ore dopo il test comportamentale. Come illustrato in tabella 2 l'analisi quantitativa degli autoradiogrammi del [<sup>3</sup>H]CP55940 e della stimolazione [<sup>35</sup>S]GTPγS indotta dal CP55940 non rivela differenze tra i ratti del gruppo di controllo (non esposti al FST) e quelli che sono stati sottoposti al FST, indicando che il FST non modifica né la densità né la funzionalità del recettore CB<sub>1</sub> in tutte le aree cerebrali analizzate.

## 7.4 Effetto del trattamento acuto e sub-cronico con HU-210 e SR141716A sulla densità e funzionalità del recettore CB<sub>1</sub>

La tabella 3 illustra l'analisi dell'autoradiografia con [<sup>3</sup>H]CP55940 nelle aree cerebrali di ratti trattati acutamente o sub-cronicamente con i differenti farmaci, sottoposti al FST e sacrificati 1 h dopo il test comportamentale. L'ANOVA a 2 vie rivela un significativo effetto principale del trattamento farmacologico in tutte le aree cerebrali analizzate, ma non un effetto significativo della durata del trattamento o un'interazione significativa tra i due fattori. Nello specifico, un effetto significativo del trattamento si è osservato in: Cg1 ( $F_{(2,27)}=14.95$ ,

$p < 0.001$ ), Cg3 ( $F_{(2,27)}=19.12$ ,  $p < 0.001$ ), NAc Core ( $F_{(2,28)}=29.95$ ,  $p < 0.001$ ), NAc Shell ( $F_{(2,29)}=31.18$ ,  $p < 0.001$ ), CPu ( $F_{(2,28)}=37.46$ ,  $p < 0.0019$ , così come nelle aree ippocampali CA1 ( $F_{(2,29)}=43.90$ ,  $p < 0.001$ ), CA2 ( $F_{(2,29)}=52.04$ ,  $p < 0.001$ ), CA3 ( $F_{(2,29)}=49.13$ ,  $p < 0.001$ ) e DG ( $F_{(2,28)}=28.64$ ,  $p < 0.001$ ). Il *post-hoc* Bonferroni ha evidenziato un effetto significativo dell'HU-210, mostrando una significativa e diffusa diminuzione dei livelli dei recettori CB<sub>1</sub> in tutte le aree cerebrali dei ratti trattati con HU-210 rispetto agli animali trattati con SR141716A o con veicolo.

Per meglio investigare l'effetto dei trattamenti, abbiamo analizzato separatamente con l'ANOVA ad 1 via i dati del trattamento acuto e di quello sub-cronico. Come si vede in figura 16 A vi è il decremento significativo della densità del recettore CB<sub>1</sub> (-40 /-66%) in tutte le aree cerebrali analizzate dei ratti trattati acutamente o sub-cronicamente con HU-210, rispetto al trattamento con veicolo ed SR141716A (Fig. 16B).

Allo scopo di verificare se la diminuita densità dei recettori CB<sub>1</sub> fosse associata ad una loro diminuita funzionalità, abbiamo effettuato il [<sup>35</sup>S]GTPγS *binding* stimolato dal CP55940 nelle stesse aree cerebrali. L'analisi quantitativa del CP55940-[<sup>35</sup>S]GTPγS *binding* è illustrata in tabella 4.

I livelli basali del [<sup>35</sup>S]GTPγS *binding* non sono significativamente differenti, in nessuna delle regioni selezionate, nei ratti trattati con veicolo, HU-210 o SR141716A (dati non mostrati).

Per quanto riguarda il [<sup>35</sup>S]GTPγS-*binding* stimolato dal CP55940, l'ANOVA a 2 vie (trattamento x durata del trattamento) non ha dimostrato un effetto significativo della durata del trattamento o un'interazione significativa tra le due variabili.

Al contrario, un effetto principale significativo del trattamento farmacologico è stato osservato in tutte le aree con la sola eccezione del NAc Core ( $F_{(2,28)}=1.95$ ,  $p > 0.05$ ). I risultati dell'ANOVA a 2 vie relativi al trattamento sono i seguenti: Cg1:  $F_{(2,28)}=7.61$ ,  $p < 0.01$ ; Cg3:  $F_{(2,28)}=15.04$ ,  $p < 0.001$ ; CPu:  $F_{(2,28)}=6.76$ ,  $p < 0.01$ ; NAc Shell:  $F_{(2,26)}=13.63$ ,  $p < 0.001$ ; CA1:  $F_{(2,26)}=9.30$ ,  $p < 0.001$ ; CA2:  $F_{(2,27)}=8.48$ ,  $p < 0.001$ ; CA3:  $F_{(2,26)}=8.95$ ,  $p < 0.001$ ; DG:

$F_{(2,27)}=4.32$ ,  $p<0.05$ . Il *post-hoc* ha evidenziato che l'attività del recettore  $CB_1$  è significativamente ridotta nei ratti trattati con HU-210 rispetto agli animali trattati con il veicolo o con SR141716A. L'ANOVA ad 1 via ha dimostrato che, negli animali trattati acutamente (Fig. 17A) o sub-cronicamente (Fig. 17 B) con l'agonista HU-210, la diminuzione della densità dei recettori  $CB_1$  è accompagnata dalla diminuzione dell'attività funzionale della proteina G, indotta dalla stimolazione del recettore  $CB_1$  rispetto ai controlli e agli animali trattati con SR141716A.

Infine, per studiare l'eventuale influenza esercitata dal tempo di sacrificio, abbiamo analizzato la densità e la funzione del recettore  $CB_1$  nei ratti trattati sub-cronicamente e sacrificati 1 h o 24 h dopo il FST. Per quanto riguarda la densità dei recettori  $CB_1$ , l'ANOVA a 2 vie (trattamento x tempo di sacrificio) ha evidenziato un effetto principale significativo del tempo di sacrificio in Cg1 ( $F_{(1,27)}=5.18$ ,  $p<0.05$ ), Cg3 ( $F_{(1,29)}=7.36$ ,  $p<0.01$ ), CPu ( $F_{(1,28)}=6.66$ ,  $p<0.05$ ), NAc Shell ( $F_{(1,29)}=7.81$ ,  $p<0.01$ ), NAc Core ( $F_{(1,28)}=7.33$ ,  $p<0.01$ ) e nelle aree ippocampali CA1 ( $F_{(1,29)}=12.28$ ,  $p<0.01$ ), CA2 ( $F_{(1,28)}=16.26$ ,  $p<0.001$ ), CA3 ( $F_{(1,29)}=6.10$ ,  $p<0.05$ ) e DG ( $F_{(1,29)}=7.06$ ,  $p<0.01$ ), evidenziando una diminuzione dei livelli dei  $CB_1$  negli animali sacrificati 24 h dopo il test comportamentale rispetto a quelli sacrificati 1h dopo il test. Inoltre, l'ANOVA a 2-vie ha evidenziato l'effetto significativo del trattamento e la successiva ANOVA ad 1 via ha mostrato che il trattamento sub-cronico con HU-210 produce una diffusa e significativa *down-regulation* del recettore  $CB_1$  nei ratti trattati con HU-210 rispetto a quelli trattati con veicolo e con SR141716A (Fig. 18A).

Per quanto riguarda il GTP $\gamma$ S-stimolato dal CP55940, l'ANOVA a 2 vie non ha rilevato nessun effetto del tempo di sacrificio, né un'interazione significativa fra tempo di sacrificio e trattamento, ma solo un effetto significativo del trattamento in tutte le aree cerebrali analizzate indicando che la funzionalità del recettore  $CB_1$  è diminuita negli animali trattati con HU-210 in Cg1 ( $F_{(2,27)}=8.91$ ,  $p<0.01$ ), Cg3 ( $F_{(2,28)}=12.59$ ,  $p<0.001$ ), CPu ( $F_{(2,29)}=7.78$ ,  $p<0.01$ ), NAc Shell ( $F_{(2,25)}=11.29$ ,  $p<0.001$ ), NAc Core ( $F_{(2,26)}=6.93$ ,  $p<0.01$ ), CA1 ( $F_{(2,25)}=26.46$ ,  $p<0.001$ ),

CA2 ( $F_{(2,26)}=22.65$ ,  $p<0.001$ ), CA3 ( $F_{(2,27)}=6.41$ ,  $p<0.01$ ) e DG ( $F_{(2,27)}=7.51$ ,  $p<0.01$ ).

Parallelamente alla diminuzione della densità dei CB<sub>1</sub>, l'ANOVA a 1 via nei ratti trattati sub-cronicamente e sacrificati 24 h dopo il FST ha evidenziato che l'accoppiamento del recettore CB<sub>1</sub>/proteina G è significativamente ridotto (45-70%) nei ratti trattati con l'HU-210 rispetto ai controlli e a quelli trattati con SR 141716A (Fig. 18 B)

**Tab. 2. Effetto del FST su densità e funzione del recettore CB<sub>1</sub>**

Area cerebrale	CB <sub>1</sub> receptor density (fmol/mg prot)			CB <sub>1</sub> receptor-G protein coupling CB <sub>1</sub> (% of basal)		
	Controlli	FST		Controlli	FST	
		1 h	24 h		1 h	24 h
Cg1	33.52 ± 2.72	46.33 ± 4.13	35.80 ± 5.14	102.34 ± 8.47	72.86 ± 8.09	97.84 ± 15.38
Cg3	37.60 ± 3.49	49.73 ± 3.08	37.13 ± 5.20	78.37 ± 10.85	71.56 ± 7.03	78.50 ± 13.82
CPu	68.25 ± 6.14	81.15 ± 3.87	60.33 ± 6.66	63.61 ± 4.76	55.87 ± 5.25	68.23 ± 4.16
NAc Core	39.75 ± 3.38	45.02 ± 5.15	34.83 ± 4.36	50.78 ± 3.16	44.84 ± 6.47	53.23 ± 3.73
NAc Shell	40.31 ± 3.35	40.31 ± 3.35	37.37 ± 5.41	55.99 ± 3.92	48.55 ± 2.96	55.80 ± 4.78
CA1	88.15 ± 8.05	96.90 ± 7.17	75.79 ± 5.32	82.04 ± 4.28	62.41 ± 8.31	70.38 ± 4.73
CA2	85.58 ± 8.01	100.98 ± 6.25	78.17 ± 4.99	87.91 ± 6.94	70.90 ± 5.32	83.83 ± 5.41
CA3	87.91 ± 7.82	95.22 ± 7.49	72.04 ± 5.21	76.20 ± 5.25	56.36 ± 4.94	69.43 ± 4.54
DG	83.41 ± 9.04	93.84 ± 9.20	65.27 ± 5.61	70.06 ± 7.68	79.98 ± 4.19	79.98 ± 4.19

I ratti trattati sub-cronicamente con veicolo sono stati suddivisi random in due gruppi (n=10 sottoposti al FST e n=8, i controlli, non sottoposti al test) e sacrificati 1 o 24 ore dopo il test. I dati sono la media±SEM delle densità (sei sezioni di tessuto per ciascun area cerebrale per ogni animale), espresse in fmol/mg di proteine per la densità del recettore CB<sub>1</sub> e come percentuale di stimolazione del [<sup>35</sup>S]GTPγS binding indotta dal CP55940 rispetto ai valori basali. I valori relativi al gruppo di controllo sacrificati 1 o 24 ore dopo il test sono stati uniti, dal momento che sia la densità dei recettori CB<sub>1</sub> sia loro attività di accoppiamento alla proteina G non differiva tra i due gruppi.

**Tab. 3 [<sup>3</sup>H]CP55940 autoradiografia nei ratti trattati con HU-210 o SR141716A ed esposti a FST.**

Area cerebrale	TRATTAMENTO ACUTO			TRATTAMENTO SUBCRONICO		
	VEICOLO	HU-210	SR141716A	VEICOLO	HU-210	SR141716A
Cg1	38.77 ± 4.32	20.11 ± 1.89	37.73 ± 3.28	46.34 ± 4.13	24.53 ± 4.63	38.45 ± 4.56
Cg3	41.94 ± 4.42	20.60 ± 2.03	40.57 ± 2.97	49.73 ± 3.07	25.19 ± 5.35	41.42 ± 4.44
CPu	71.86 ± 7.04	37.36 ± 2.67	64.87 ± 4.33	81.15 ± 3.87	30.32 ± 1.94	67.25 ± 6.87
Nac Core	40.16 ± 4.22	19.74 ± 2.74	38.54 ± 3.67	49.39 ± 3.35	15.47 ± 1.33	42.62 ± 5.09
Nac Shell	44.14 ± 4.53	21.00 ± 2.46	41.36 ± 4.22	50.33 ± 3.79	15.78 ± 0.78	46.07 ± 5.21
CA1	95.31 ± 7.07	44.42 ± 5.80	82.05 ± 6.58	96.90 ± 7.17	29.89 ± 1.89	92.22 ± 8.31
CA2	102.09 ± 6.57	45.56 ± 5.84	82.8 ± 6.84	100.98 ± 6.24	33.04 ± 2.37	88.91 ± 7.23
CA3	94.53 ± 7.22	43.85 ± 5.06	82.53 ± 3.72	95.22 ± 7.49	28.73 ± 1.50	86.04 ± 8.18
DG	88.09 ± 9.97	40.99 ± 4.95	81.8 ± 4.54	93.84 ± 9.20	32.15 ± 1.87	79.15 ± 8.92

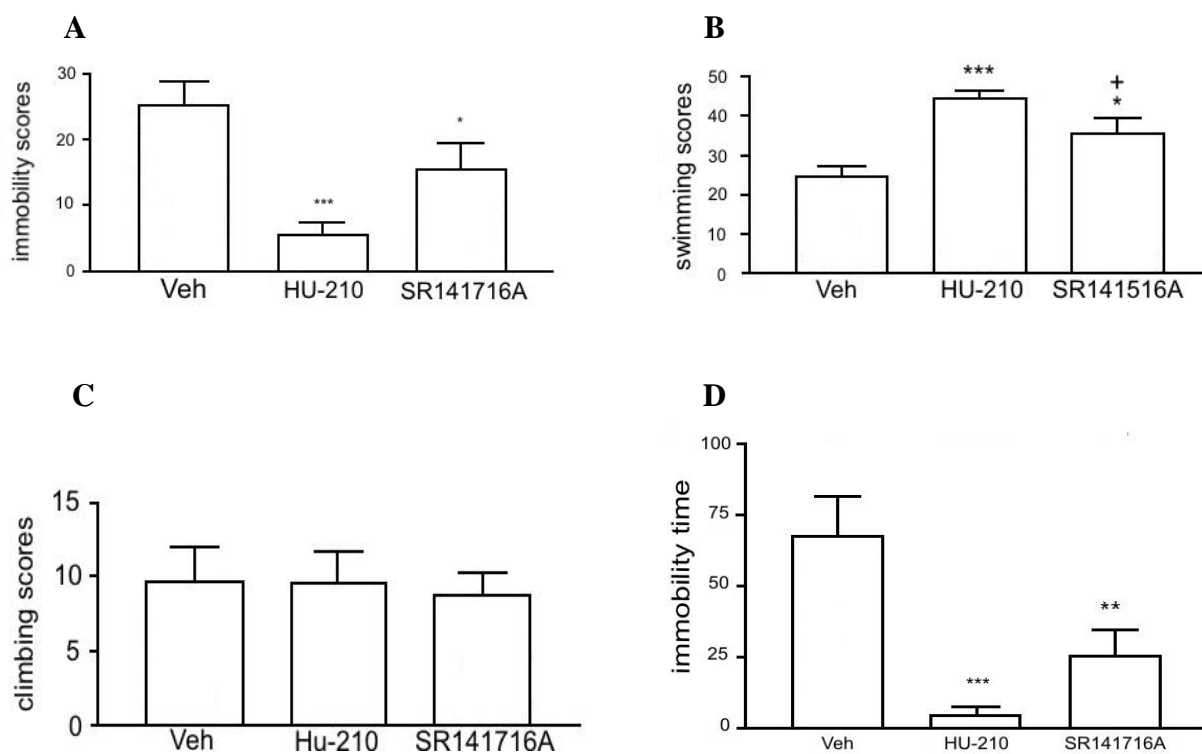
I ratti sono stati sacrificati dopo 1 h dal test comportamentale. I valori rappresentano le medie±SEM delle densità dei recettori CB<sub>1</sub> espresse in fmol/mg di proteine.

**Tab. 4 [<sup>35</sup>S]GTPγS-binding stimolato da CP55940 nei ratti trattati con HU-210 o SR141716A esposti al FST.**

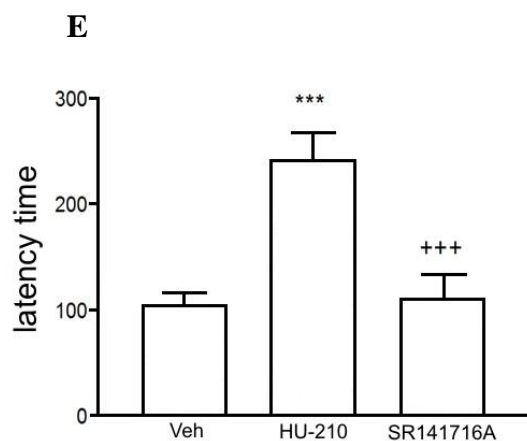
Area cerebrale	TRATTAMENTO ACUTO			TRATTAMENTO SUBCRONICO		
	VEICOLO	HU-210	SR141716 A	VEICOLO	HU-210	SR141716A
Cg1	72.86 ±8.09	55.54 ±10.57	72.36± 7.38	108.83 ± 11.78	57.34 ± 7.21	79.54 ± 9.18
Cg3	74.44 ±6.16	52.06 ± 4.16	63.48±4.15	87.14 ± 8.35	39.82 ± 5.98	67.75 ± 7.31
CPu	55.87 ±5.25	35.53 ± 3.69	41.33±4.33	52.59 ± 6.52	47.12 ± 2.25	35.61 ± 2.54
Nac Core	44.87 ±6.47	35.20 ± 3.69	44.81±7.50	44.73 ± 6.27	33.21 ± 4.59	36.74 ± 2.64
Nac Shell	48.55 ±2.96	29.07 ± 2.44	38.53±4.19	47.73 ± 5.93	29.40 ± 3.10	45.39 ± 3.00
CA1	62.41 ±8.31	38.91 ± 3.05	59.29±6.24	60.31 ± 6.00	30.12 ± 2.87	62.71 ±10.63
CA2	70.90 ±5.32	47.54 ± 4.53	50.84±6.20	79.04 ± 12.69	34.49 ± 3.93	67.32 ±10.33
CA3	59.63 ±4.79	38.05 ± 3.59	50.80±4.33	69.70 ± 12.37	29.71 ± 5.94	62.09 ± 9.28
DG	61.03 ±3.02	44.99 ± 3.83	62.55±7.19	77.59 ± 13.62	47.08 ±10.14	65.68 ±10.17

Binding stimolato con CP55940 nei ratti trattati acutamente o sub-cronicamente con HU-210, SR141716A o veicolo. I ratti sono stati sacrificati 1h dopo il FST. I valori sono le medie±SEM della densità, espressi come percentuale sui valori basali.

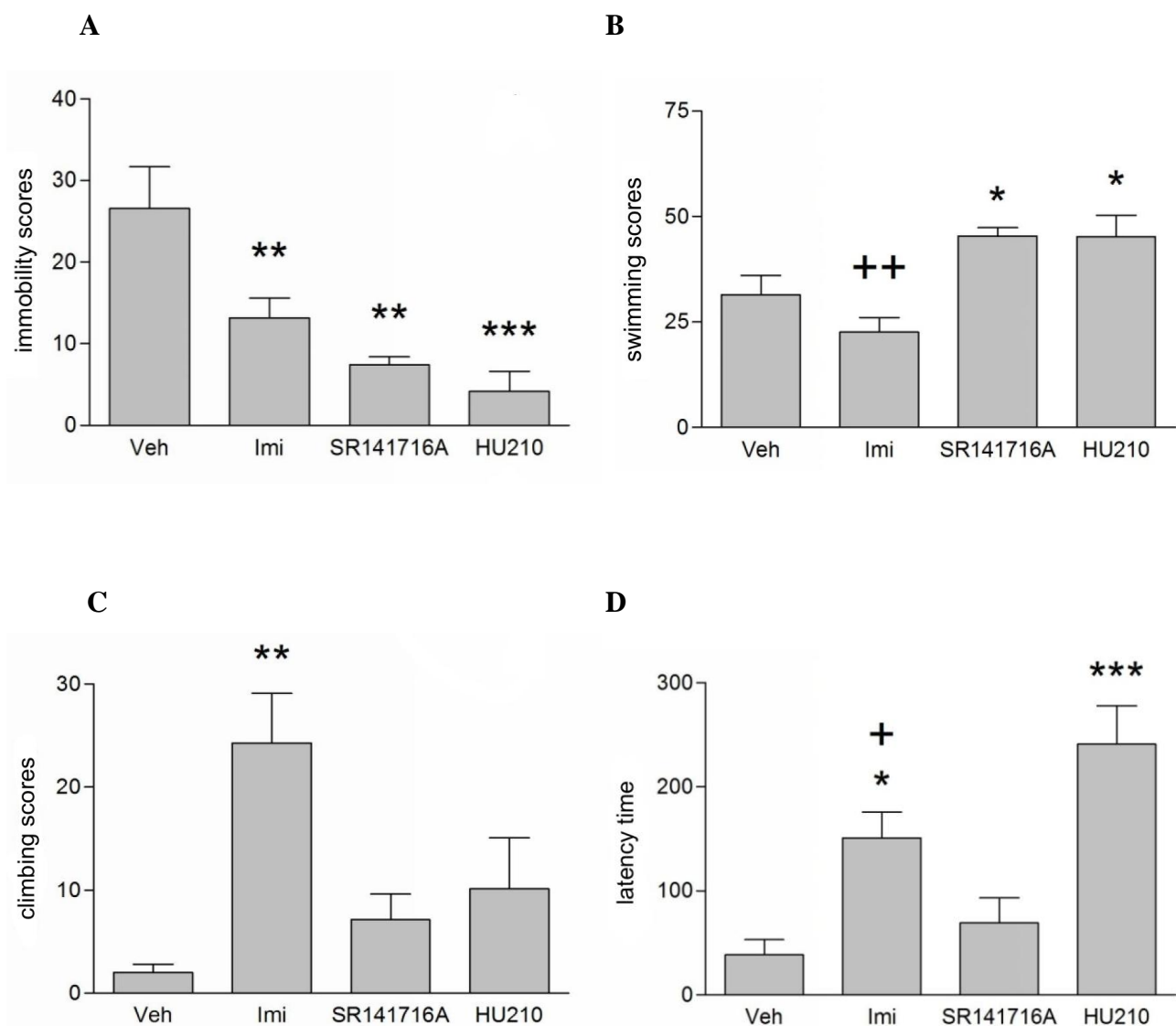




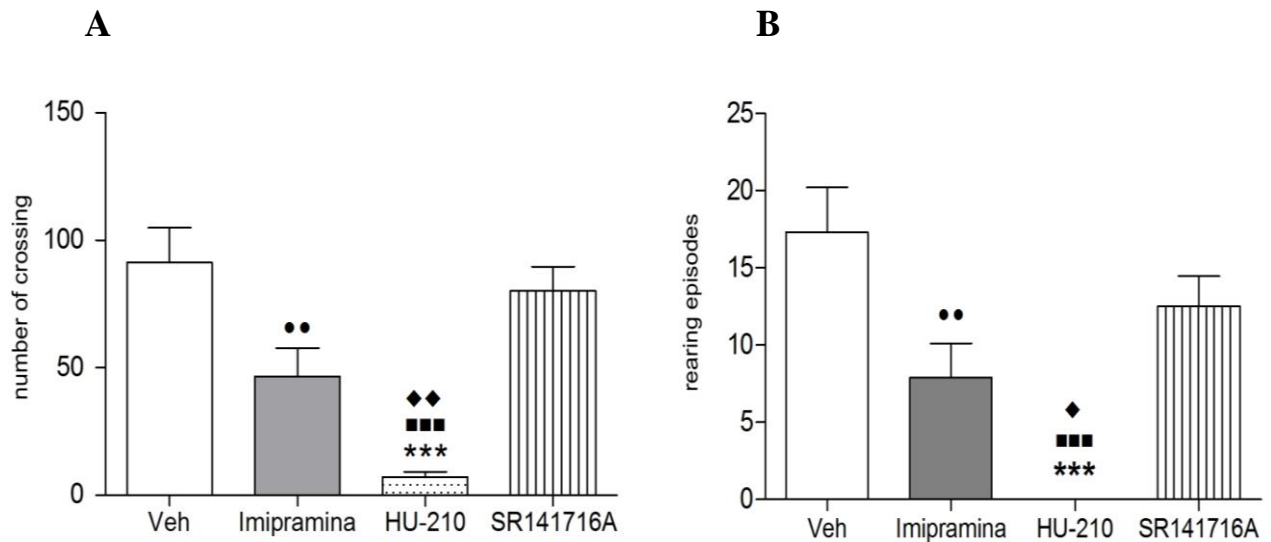
**Fig. 13** Effetto del trattamento acuto con HU-210 (0,1mg/Kg) e SR141716A (3 mg/Kg) sull'immobility, lo swimming ed il climbing scores e sull'immobility time. I dati sono la media  $\pm$  S.E.M (n= 10 animali per gruppo). (A) *Immobility score*: \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.001$  rispetto al veicolo. (B) *Swimming scores*: \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.001$  rispetto al veicolo. + $p < 0,05$  rispetto all' HU-210. (D) *Immobility time (sec)*:\*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0.001$  rispetto al veicolo (ANOVA ad 1 via seguita dal test Newman-Keuls test).



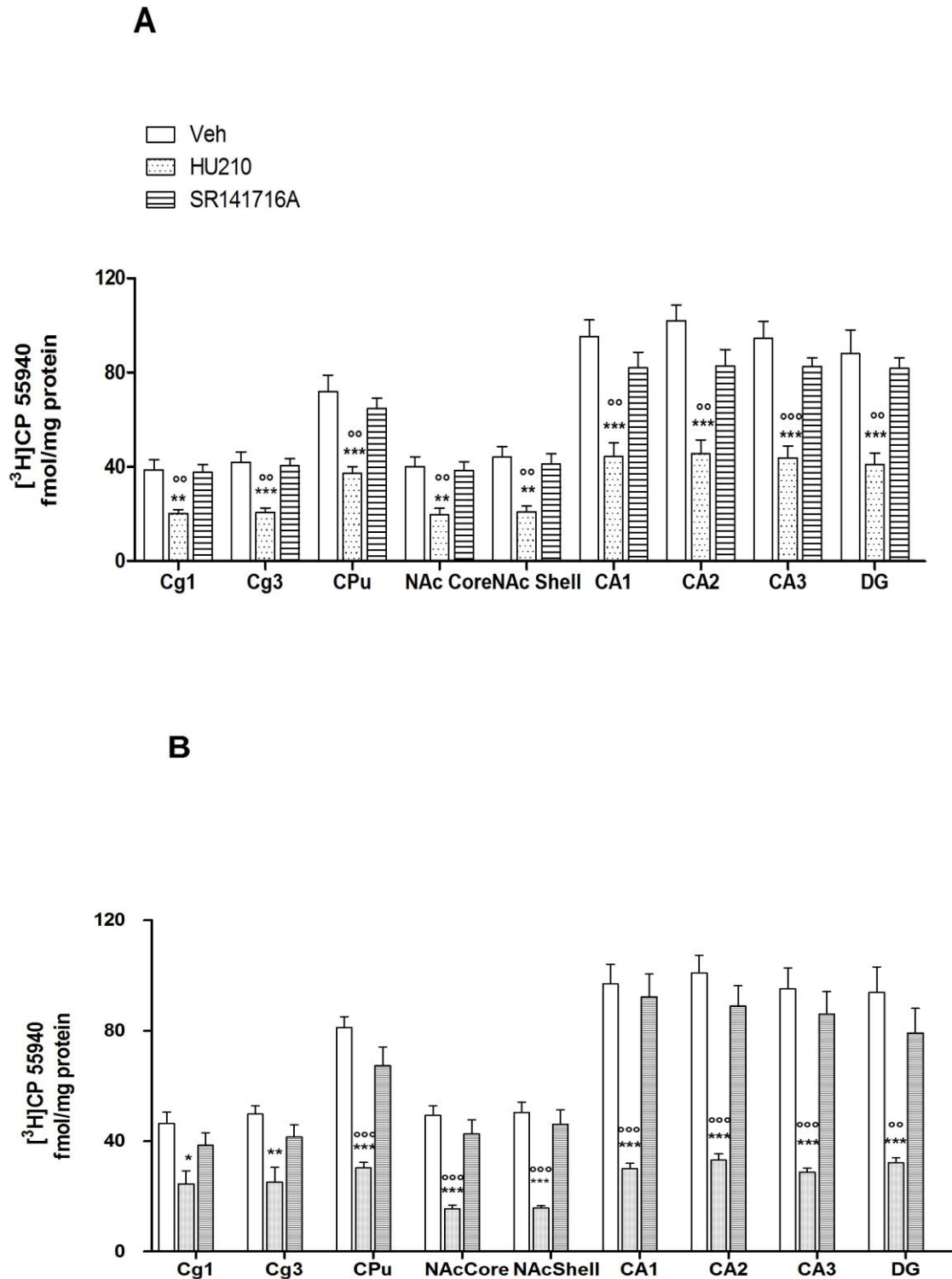
**Fig. 13E** L'HU-210 (0,1 mg/Kg) ma non l'SR141716A (3 mg/Kg) aumenta la latenza al primo episodio di immobilità. I dati sono la media  $\pm$  S.E.M (n= 10 animali per gruppo). *Latency time (sec)*: \*\*\* $p < 0.001$  rispetto al veicolo, +++ $p < 0,001$  rispetto all'HU-210 (ANOVA ad 1 via, seguito dal test *post-hoc* Newman-Keuls).



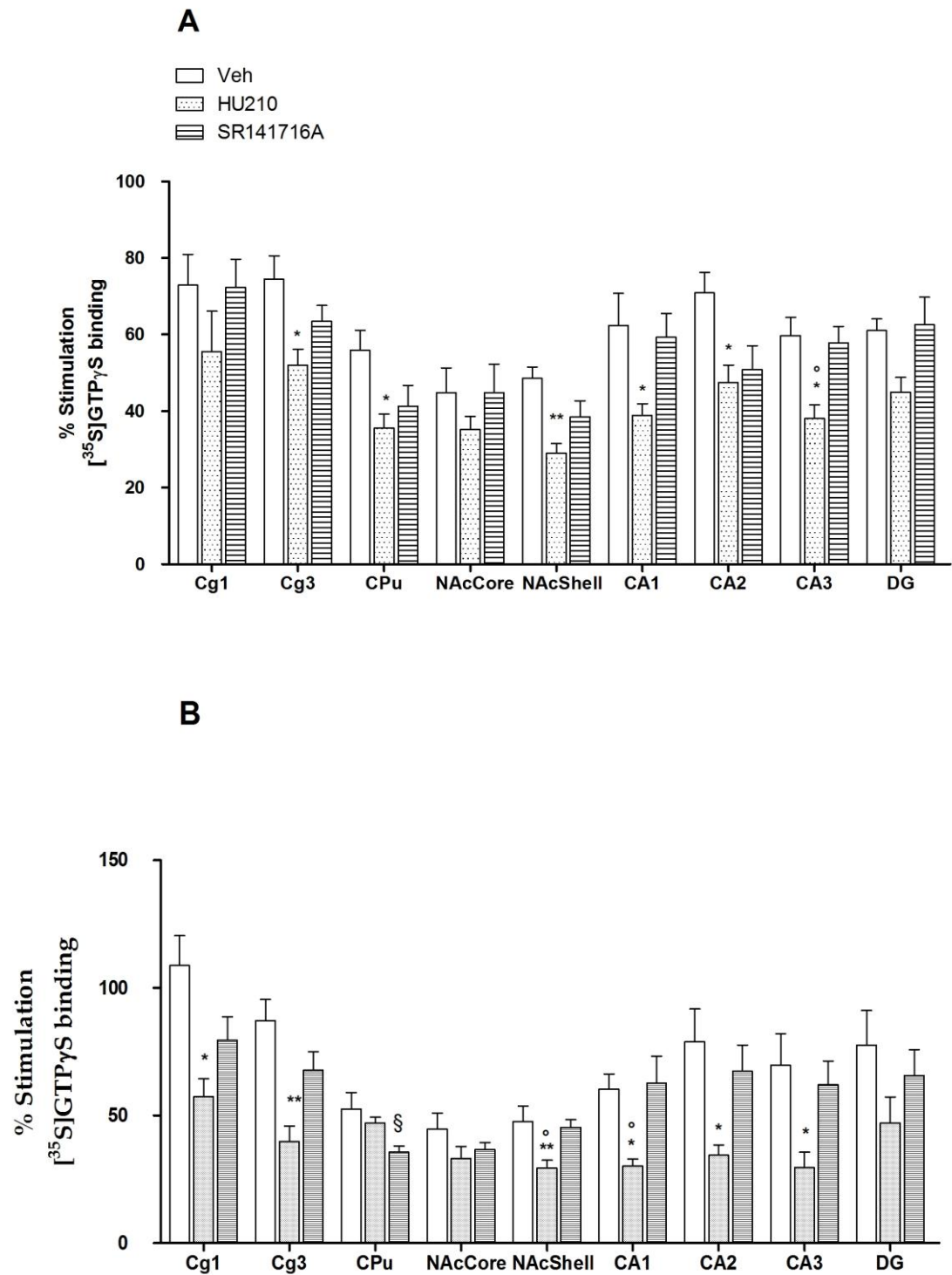
**Fig. 14** Effetto del trattamento sub-cronico con HU-210 (0,1mg/Kg), SR141716A (3 mg/Kg) ed imipramina (20 mg/Kg ), sull'*immobility*, lo *swimming* ed il *climbing* e sulla *latency time* (sec)(latenza al primo episodio di immobilità). I dati sono la media±S.E.M (n= 7-8 animali per gruppo). (A) *Immobility scores* : \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 rispetto al veicolo. (B) *Swimming scores*: \*p<0.05 rispetto al veicolo; ++p<0.01 rispetto al HU- (C) *Climbing scores*: \*\*p<0,01 rispetto al veicolo; (D) *Latency time* (sec): \*p<0,05 e \*\*\*p<0.001 rispetto al veicolo;; +p<0.05 rispetto all'HU-210 (ANOVA ad 1 via , seguito dal test *post-hoc* Newman-Keuls).



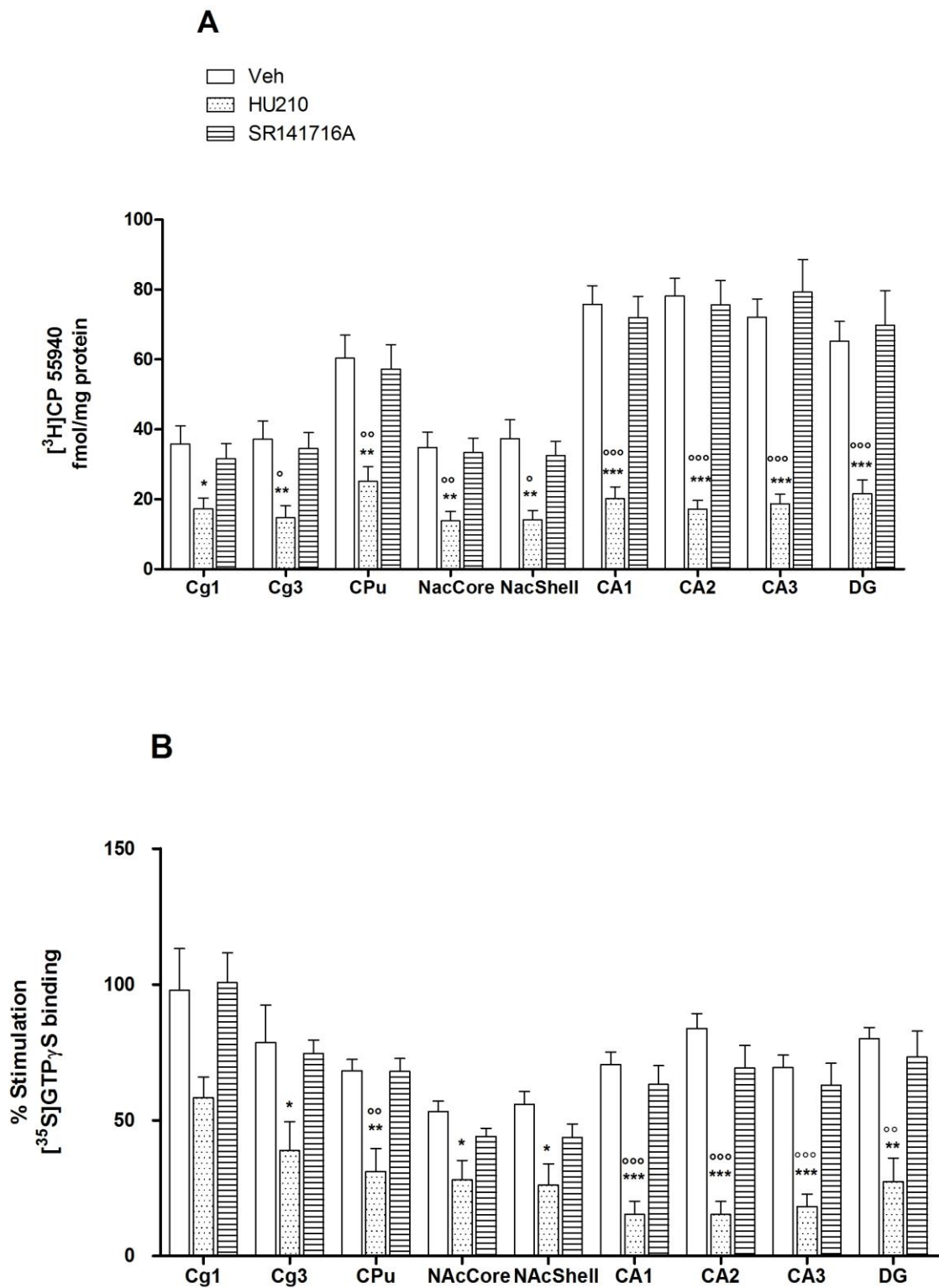
**Fig. 15** Effetto del trattamento sub-cronico con HU-210 (0,1mg/Kg), SR141716A (3 mg/Kg) e imipramina (20 mg/Kg), sul *number of crossing* (attività locomotoria orizzontale: numero di attraversamenti) e sul *rearing episodes* (attività locomotoria verticale: numero di sollevamenti sulle zampe posteriori). I dati sono la media±S.E.M (n= 7-8 animali per gruppo). (A) *Number of crossing*: \*\*\*p<0.001 rispetto al veicolo, \*\*\*p<0.001 rispetto all'SR141716A, \*\*p<0.01 rispetto all'imipramina e •p<0.01 rispetto al veicolo. (B) *Rearing episodes*: \*\*\*p<0.001 rispetto al veicolo, \*\*\*p<0.001 rispetto all'SR141716A, ♦p<0.05 rispetto all'imipramina e •p<0.01 rispetto al veicolo (ANOVA ad 1 via, seguito dal test *post-hoc* Newman-Keuls).



**Fig. 16 Effetti del trattamento acuto e sub-cronico con HU-210 (0,1mg/kg) ed SR141716A (3mg/kg) sulla densità del recettore CB<sub>1</sub>.** I ratti trattati acutamente (A) o sub-cronicamente (B) con HU-210 o SR141716A sono stati sacrificati 1 ora dopo il test comportamentale. I valori sono le medie±SEM della densità (sei sezioni di tessuto per ciascuna area cerebrale per animale) espressa in fmol/mg di proteine. \*p<0.05, \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 rispetto al veicolo; <sup>oo</sup>p<0.01 e <sup>ooo</sup>p<0.001 rispetto all'SR141716A (ANOVA ad 1 via seguita dal test Newman-Keuls).



**Fig. 17** Effetto del trattamento acuto e sub-cronico con HU-210 (0,1mg/kg) ed SR141716A (3mg/kg) sul  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding del recettore  $\text{CB}_1$ . I ratti trattati acutamente (A) o sub-cronicamente (B) con HU-210 o SR141716A sono stati sacrificati 1 ora dopo il test comportamentale. I dati sono le medie  $\pm$  SEM della densità (sei sezioni di tessuto per ciascuna area cerebrale per animale) espressi come percentuale sui valori basali. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  rispetto al veicolo; ° $p < 0.05$  rispetto all' SR141716A; § $p < 0.05$  rispetto al veicolo. (ANOVA 1via, *post-hoc* Newman-Keuls).



**Fig. 18** Effetto del trattamento sub-cronico con **HU-210** (0,1mg mg/kg) ed **SR141716A** (3mg/kg) sulla densità (A) e funzionalità (B) del recettore **CB<sub>1</sub>**. I ratti trattati sub-cronicamente con HU-210 o SR141716A sono stati sacrificati 24 ore dopo il test comportamentale. I dati sono rappresentati dalle medie $\pm$ SEM della densità (sei sezioni di tessuto per ciascuna area cerebrale per animale) espressi come percentuale sopra il valore basale. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 e \*\*\* $p$ <0.001 rispetto al veicolo; °° $p$ <0.01 e °°° $p$ <0.001 rispetto a SR141716A. (ANOVA ad 1 via seguita dal test *post-hoc* Newman-Keuls)

## DISCUSSIONE

I nostri risultati dimostrano che nel FST l'effetto antidepressivo dell'HU-210 è associato ad una diffusa e significativa *down-regulation* dei recettori CB<sub>1</sub> e ad un significativo decremento della loro funzionalità in diverse aree nel sistema nervoso centrale. Al contrario, l'SR141716A, in linea con evidenze descritte in precedenza da altri gruppi, manifesta un effetto antidepressivo nel FST quando vengono utilizzati i parametri classici, quali il *swimming*, l'*immobility* e il *climbing*, ma non modifica né la densità, né la funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub> in nessuna area cerebrale analizzata. L'effetto simil-antidepressivo indotto sia dall'HU-210 che dall'SR141716A non è dovuto agli aspetti motori aspecifici e confondenti dei due farmaci, come dimostrato dai nostri risultati ottenuti nel test dell'*open field*. Tuttavia, mentre l'HU-210 e l'imipramina, antidepressivo classico, aumentano la latenza al primo episodio di immobilità, l'SR141716A non modifica tale parametro. In linea con precedenti lavori, che hanno indicato la latenza al primo episodio di immobilità quale miglior indice predittivo dell'attività antidepressiva e in grado di smascherare i cosiddetti "falsi positivi" (Castagnè 2009; Cryan 2005; Detke 1997; Koponen 2005; Lutter 2008), i nostri risultati sembrano indicare che l'azione dell'SR141716A nel FST possa essere considerata un "falso positivo". Tale interpretazione è supportata dalle evidenze cliniche che hanno rilevato come la somministrazione ripetuta di SR141716 (rimonabant) per il trattamento dell'obesità provochi un aumento degli episodi ansiosi e depressivi e aumenta il rischio di suicidio in pazienti obesi (Moreira 2009; Van Gaal 2008).

I nostri dati dovrebbero comunque essere interpretati con cautela. Infatti, sebbene tutti i lavori pubblicati ad oggi riportino in maniera concorde che la latenza al primo episodio di immobilità sia un parametro più sensibile agli effetti dei farmaci antidepressivi classici rispetto ai parametri tradizionali utilizzati nel FST, non vi sono ancora evidenze sperimentali che dimostrino come tale parametro possa rivelare i "falsi positivi". Ulteriori studi sono

pertanto necessari per accertare se altri farmaci, noti per comportarsi come falsi positivi nel FST (quali gli psicostimolanti) modifichino (o non) la latenza al primo episodio di immobilità.

Per quanto riguarda i dati biochimici, il FST non modifica la densità e/o la funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub> in nessuna delle aree analizzate. A tutt'oggi, pochi lavori hanno esaminato le caratteristiche farmacologiche e funzionali dei recettori CB<sub>1</sub> in diversi modelli animali di depressione, quale il CMS o l'OBX, riportando risultati contraddittori (vedi introduzione), mentre nessun dato è disponibile sugli effetti nel FST, rendendo in conclusione impossibile un confronto.

Un interessante risultato del nostro studio è dato dall'ubiquitaria diminuzione dei livelli della densità e della funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub>, misurate rispettivamente tramite autoradiografia con [<sup>3</sup>H]CP55940 e con il [<sup>35</sup>S]GTPγS-*binding* stimolato da CP55940, dopo somministrazione acuta e/o sub-cronica di HU-210 in animali esposti al FST. La diminuzione del [<sup>3</sup>H]CP55940 e del [<sup>35</sup>S]GTPγS-*binding* indotto da CP55940 è dello stesso ordine di grandezza (~ 60-70%), suggerendo che la diminuita trasmissione endocannabinoide riflette una diminuita espressione proteica dei recettori CB<sub>1</sub>. Inoltre, la maggiore diminuzione dei livelli dei recettori CB<sub>1</sub> osservata negli animali sacrificati 24 h rispetto a 1 h dopo il FST indica che la somministrazione sub-cronica dell'HU-210 induce una modificazione di lunga durata dei CB<sub>1</sub>.

Nel loro insieme i nostri dati dimostrano che nel FST il trattamento con HU-210 è associato ad una diminuita funzionalità del sistema EC. Questi risultati sono particolarmente intriganti se interpretati alla luce dei recenti studi post-mortem che hanno rivelato un aumento dei livelli degli ECs, dell'espressione e della funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub> nella PFC di soggetti depressi che hanno commesso suicidio (Hungud 2004; Vinod 2005). In linea con i nostri dati, infatti, la somministrazione cronica della fluoxetina e del citalopram (entrambi SSRI) induce rispettivamente una diminuzione dei livelli di mRNA messaggero per il CB<sub>1</sub> nel nucleo



caudato-putamen (Olivas 2005) e del GTP $\gamma$ S *binding* stimolato dall' HU-210 nell'ipotalamo, nell'ippocampo e nel nucleo mediale genicolato (Hesketh 2008). Inoltre è stato riportato che il trattamento con ECT, uno dei trattamenti antidepressivi più efficaci nelle forme resistenti di depressione grave, induce un decremento della densità dei recettori CB<sub>1</sub> nella corteccia frontale (Hill 2007). Al contrario, altri lavori riportano un aumento dell'espressione e della funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub> indotto da alcuni farmaci antidepressivi clinicamente efficaci (Hill 2008; Hill 2007; Hill 2006). Le discrepanze esistenti tra i diversi studi potrebbero essere attribuite a molteplici fattori, quali: a) i diversi modelli di depressione utilizzati, b) i differenti meccanismi d'azione dei diversi trattamenti antidepressivi, c) il dosaggio, la via e il periodo di somministrazione degli antidepressivi utilizzati e d) le differenze metodologiche, quale l'utilizzo del *binding* per omogenato o dell'autoradiografia. I dati di questo studio rivelano che sia l'HU-210 che l'SR141716A aumentano gli *scores* dello *swimming*, mentre non influenzano il *climbing*. I farmaci antidepressivi, con un meccanismo d'azione preferibilmente noradrenergico, quale la desipramina, riducono l'immobilità e aumentano il *climbing*, mentre gli SSRI hanno effetti inconsistenti nel *climbing* ma aumentano lo *swimming* (Detke 1995; Detke 1996). In sintesi questi risultati, in linea con precedenti lavori (Aso 2009; Bambico 2009; Hill 2009d) suggeriscono un possibile coinvolgimento del sistema serotoninergico sugli effetti dei farmaci agenti a livello del sistema EC (agonisti e/o antagonisti) sul FST.

Esistono molteplici evidenze che supportano l'esistenza di un'interazione fra il sistema EC e quello serotoninergico. Gli ECs inducono un comportamento simil-antidepressivo aumentando l'attività elettrica dei neuroni serotoninergici del nucleo del DR (Gobbi 2005; Bambico 2007). Tale aumento, secondo gli autori, sarebbe dovuto all'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> localizzati nella PFC, i quali inviano input eccitatori ai neuroni serotoninergici. Tuttavia non è chiaro come l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub>, i quali, come è stato dimostrato inibiscono l'eccitabilità dei neuroni piramidali della PFC e riducono la trasmissione glutamatergica (Auclair 2000), possa portare ad un aumento del *firing* dei neuroni serotoninergici del DR.

Inoltre Haj-Dahmane e coll. (2009) hanno dimostrato che gli ECs inibiscono la trasmissione glutamatergica verso i neuroni serotoninergici del DR attraverso l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> probabilmente localizzati sui terminali glutamatergici che impingono sui neuroni serotoninergici.

Quindi la diminuzione nel DR della trasmissione glutamatergica indotta dall'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> probabilmente porta ad un decremento dell'attività elettrica generale dei neuroni serotoninergici, inducendo quindi un'inibizione della trasmissione serotoninergica. Infine, diversi lavori hanno dimostrato che l'attivazione o il blocco dei recettori CB<sub>1</sub> induce rispettivamente una diminuzione o un aumento della trasmissione monoaminergica nella PFC (Tzavara 2003, Need 2006, Sagredo 2006, Nazaki 2000). E' stato suggerito che ridurre la trasmissione endocannabinoide nella PFC potrebbe determinare un aumento del *release* monoaminergico, meccanismo comune agli agenti antidepressivi tradizionali. Conseguentemente, dati i risultati del presente lavoro, si potrebbe ipotizzare che la somministrazione dell'agonista HU-210 induca una disinibizione del release delle monoamine mediante una riduzione della trasmissione endocannabinoide, contribuendo così alla sua azione antidepressiva. Dal momento che l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> regola l'eccitabilità neuronale inibendo in diverse aree cerebrali il rilascio sia del glutammato che quello del GABA, non è da escludere la possibilità che la *down-regulation* di questi recettori possa alterare l'equilibrio tra gli input eccitatorio e inibitorio. Ulteriori studi sono peraltro necessari per delucidare i meccanismi neurobiologici attraverso i quali la diminuzione della densità dei recettori CB<sub>1</sub> e della loro funzionalità possa determinare un effetto antidepressivo.

In conclusione, a prescindere dal meccanismo d'azione, i risultati biochimici e la loro correlazione con i dati comportamentali svelano un effetto antidepressivo dell'HU-210 ma non dell'SR141716A, suggerendo che la *down-regulation* e la diminuita funzionalità dei CB<sub>1</sub> in strutture implicate nel controllo degli eventi emotivi (PFC, nucleus accumbens ed

ippocampo) possano essere coinvolte nell'effetto antidepressivo indotto dalla somministrazione di agonisti CB<sub>1</sub>.

## BIBLIOGRAFIA

- Akiskal R.S. (2000) Mood disorders: introduction and overview. In *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, B.J. Sadock and V.A. Sadock, eds. (New York: Lippincott, Williams & Wilkins), pp.1284-1298.
- Ameri A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58: 315-48.
- Ashton J.C., Friberg D., Darlington C.L., Smith P.F. (2006) Expression of the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396: 113-6.
- Aso E., Renoir T., Mengod G., Ledent C., Hamon M., Maldonado R., Lanfumey L., Valverde O. (2009) Lack of CB1 receptor activity impairs serotonergic negative feedback. *J Neurochem.* 109: 935-44.
- Auclair N., Otani S., Soubrie P., Crepel F. (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 83: 3287-93.
- Baldessarini R.J. (2006) Drug therapy of depression and anxiety disorders. In *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics II th edition*. Edited by: Laurance L.B., John S.L., Keith L.P., *McGraw-Hill*: 429-459.
- Bambico F.R., Duranti A., Tontini A., Tarzia G., Gobbi G. (2009) Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from Animals models. *Pharmac. Design.* 14: 1623-46.
- Bambico F.R., Gobbi G. (2008) The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor and the endocannabinoid anandamide: possible antidepressant targets. *Expert Opin. Ther. Targets* 12: 347-1366.
- Bambico F.R., Kat N., Debbonnel G., Gobbi G. (2007) Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 27: 11700-11711.
- Beltramo M., Bernardini N., Bertorelli R., Campanella M., Nicolussi E., Fredussi S., Reggiani A. (2006) CB<sub>2</sub> receptor-mediated antihyperalgesia: possibile direct involvement of neural mechanism. *Eur J Neurosci* 23: 1530-1538.
- Beltramo M., Stella N., Calignano A., Lin S.Y., Makriyannis A., Piomelli D. (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094-1097.
- Berton O., Nestler E.J. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Rev. Neurosci.* 7: 137-151.
- Bisogno T., Di Marzo V. (2007) Short- and long-term plasticity of the endocannabinoid system in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Res* 56: 428-442.

- Blendy J.A. (2006) The role of CREB in depression and Antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59: 1144-1150.
- Bortolato M., Mangieri R.A., Fu J., Kim J.H., 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.
- Cadogan A.K., Alexander S.P., Boyd E.A., Kendall D.A. (1997) Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem* 69: 1131-1137.
- Castelli M.P., Piras A.P., Melis T., Succu S., Sanna F., Melis M.R., Collu S., Ennas M.G., Diaz G., Mackie K., Argiolas A. (2007) Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in the paraventricular nucleus and central control of penile erection: immunocytochemistry, autoradiography and behavioral studies. *Neuroscience* 147:197-206.
- Castagné V., Porsolt R.D. (2009) Improved detection of antidepressant-like activity in behavioural despair test by measurement of the latency to the first immobility. *Eur J Pharmacol.* 616:128-33.
- Chen C., Bazan N.G. (2005) Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77:65-76.
- Cosenza M., Gifford A.N., Gatley S.J., Pyatt B., Liu Q., Makriyannis A., Volkow N.D. (2000) Locomotor activity and occupancy of brain cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors by the antagonist/inverse agonist AM281. *Synapse* 38:477-482.
- Cota D., Steiner M.A., Marsicano G., Cervino C., Herman J.P., Grübler Y., Stalla J., Pasquali R., Lutz B., Stalla G.K., Pagotto U. (2007) Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 148: 1574-1581.
- Cryan J.F., Valentino R.J., Lucki I. (2005) Assessing substrates underlying the behavioural effects of antidepressant using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev* 29: 547-569.
- Croci T., Manara L., Aureggi G., Guagnini F., Rinaldi-Carmona M., Maffrand J.P. Le Fur G., Mukenge S., Ferla G. (1998) In vitro functional evidence of neural cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in human ileum. *Br J Pharmacol* 125: 1393-5.
- Detke M.J., Johnson J., Lucki I. (1997) Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp. Clin. Psychopharmacol* 5: 107-112.
- Detke M.J., Lucki I. (1996) detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain res* 73: 43-6.
- Detke M.J., Rickels M., Lucki I. (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121: 66-72.

- Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the CB receptor. *Science* 258: 1946-1949.
- Di Marzo V., Petrosino S. (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 18:129-140.
- Domschke K., Dannlowski U., Ohrmann P., Lawford B., Bauer J., Kugel H., Heindel W., Young R., Morris P., Arolt V., Deckert J., Suslow T., Baune B.T. (2008) Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 751-759.
- Drevets W.C. (2001) Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implication for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 240-249.
- D'sa C., Eisch A.J., Bolger G.B., Duman R.S. (2005) Differential expression and regulation of the cAMP selective phosphodiesterase type 4a splice variants in the rat brain by chronic antidepressant administration. *Eur J Neurosci* 22: 1463-1475.
- Duman R.S., Heininger G.R., Nestler E.J. (1997) A molecular and cellular hypothesis of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 54: 597-606.
- Edwards D.A., Kim J., Alger B.E. (2006) Multiple mechanism of endocannabinoid response initiation in hippocampus. *J Neurophysiol* 95: 67-75.
- Elphick M.R., Egertova M. (2001) The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 381-408.
- Fowler C.J., Jacobsson S.O. (2002) Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitylethanolamide-targets for drug development? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid* 66: 193-200.
- Gifford A.N., Ashby C.R. Jr, (1996) Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, is potentiated by the cannabinoid agonist, SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 1431-1436.
- Glass M., Dragano M., Faull R.L.M. (1997) Cannabinoid receptor in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77: 299-318
- Goaoni Y., Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646-1647.
- Gobbi G., Bambico F.R., Mangieri R., Bortolato M., Campolongo P., Solinas M., Cassano T., Morgese MG, Debonnel G, Duranti A., Tontini A., Tarzia G., Mor M., Trezza V., Goldberg S.R., Cuomo V., Piomelli D. (2005) Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *PNAS* 102: 18620-18625.

- Gong J.P., Oniavi E.S., Ishiguro H., Liu Q.R., Tagliaferro P.A., Brusco A. et al. (2006) Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071:10-23.
- Griebel G., Stemmelin J., Scatton B. (2005) Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry* 57: 261-267.
- Gruber A.J. Pope H.G. Jr, Brown M.E. (1996) Do patients use marijuana as an antidepressant? *Depression* 4: 77
- Haj-Dahmane S., Shen R.Y. (2009) Endocannabinoids suppress excitatory synaptic transmission to dorsal raphe serotonin neurons through the activation of presynaptic CB1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 331:186-96.
- Haynes L.E., Barber D., Mitchel I.J. (2004) Chronic antidepressant medication attenuates dexametasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. *Brain Res* 1020: 157-167.
- Haring M., Marsicano G., Lutz B., Monory K. (2007) Identification of the cannabinoid receptors type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience* 146: 1212-9.
- Harrison P. J. (2002) The neuropathology of primary mood disorder. *Brain* 125: 1428-1449.
- Herkenam M., Lynn A.B., Johnson M.R., Melvin L.S. De Costa B.R., Rice K.C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in the rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563-583.
- Herkenam M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., De Costa B.R., Rice K.C. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1932-1936.
- Hesketh S.A., Brennan A.K., Jessop D.S., Finn D.P. (2008) Effects of chronic treatment with citalopram on cannabinoid and opioid receptor-mediated G-protein coupling in discrete rat brain regions. *Psychopharmacology* 198:29-36.
- Hill M.N., Titternes A.K., Morrish A.C., Carrier E.J., Lee T.T., Gil-Mohapel J., Gorzalka B.B., Hillard C.J., Christie B.R. (2009a) Endogenous cannabinoid signaling is requisite for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*.
- Hill M.N., McEwen B.S. (2009b) Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Neuro-Psychopharmacology & Biol Psych*, in press.
- Hill M.N., and Gorzalka B.B. (2009c) Impairments in endocannabinoid signal and depressive illness. *JAMA* 301: 1165-1166.
- Hill M.N., Hillard C.J., Bambico F.R., Patel S., Gorzalka B.B., Gobbi G. (2009d) The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Pharmacol. Science* 30: 9

- Hill M.N., Miller G.E., Carrier E.J., Gorzalka B.B., Hillard C.J. (2009e) Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology* 34:1257-62
- Hill M.N., Miller G.E., Ho W.S., Gorzalka B.B., Hillard C.J. (2008a) Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry* 41: 48-53.
- Hill M.N., Carrier E.J., McLaughlin R.J., Morrish A.C., Meier S.E., Hillard C.J., Gorzalka B.B. (2008b) Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem* 106: 2322-36.
- Hill MN, Barr AM, Ho WS, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ (2007) Electroconvulsive shock treatment differentially modulates cortical and subcortical endocannabinoid activity. *J Neurochemistry* 103: 47-56.
- Hill M.N. Ho W.S., Sinopoli K.J., Viau V., Hillard C.J., Gorzalka B.B. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* 31: 2591-2599.
- Hill M.N., Gorzalka B.B. (2005a) Pharmacological enhancement of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swimming test. *European Neuropharmacology* 15: 593-599.
- Hill M.N., Patel S., Carrier E.J., Rademaker D.J., Ormerod B.K., Hillard C.J., Gorzalka B.B. (2005b) Downregulation of cannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology* 30: 508-515.
- Hill M.N., Gorzalka B.B., (2005c) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behavioral Pharmacology* 16: 333-352.
- Hillard C.J., Jarrahian A. (2000) The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem Phys Lipids* 108: 123-134.
- Holboer F. (2000) The corticosteroid hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23: 477-501.
- Howlett A.C., Breivogel C.S., Deadwyler S.A., Hampson R.E., Porrino L.J. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47: 345-358
- Howlett A.C. (2002a) The cannabinoid receptors. *Prost. Lipid Mediat* 68-69: 619-631.
- Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R., Pertwee R.G. (2002b) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202.



- Howlett A.C, Qualy J.M., Khachatryan L.L. (1986) Involvement of G<sub>i</sub> in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29: 307-13.
- Howlett A.C. (1985) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 27: 429-436.
- Howlett A.C. (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylyl cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci* 35: 1803-10.
- Hungund B.L., Vinod K.Y., Kassir S.A., Basavarajappa B.S., Yalamanchili R., Cooper T.B., Mann J.J., Arango V. (2004) Up-regulation of CB1 receptors and agonist-stimulated (<sup>35</sup>S)GTPγ binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Molecular Psychiatry*, 9:184-190.
- Ishac E.J., Jiang L., Laje K.D., Varga K., Abood M.E., Kunos G. (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118: 2023-2028.
- Järbe T.U., LeMay B.J., Olszewska T., Vemuri V.K., Wood J.T., Makriyannis A. (2008) Intrinsic effects of AM4113, a putative neutral CB1 receptor selective antagonist, on open-field behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 91:84-90.
- Jennings E.A. Vaughan C.W., Christie M.J. (2001) Cannabinoid actions on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. *J Physiol* 534: 805-812.
- Jiang W., Zhang Y., Xiao L. Van Cleemput J., Ji S.P., Bai G., Zhang X. (2005) Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effect. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 3104-3116.
- Young T., Bakish D., Beaulieu S. (2002) The neurobiology of treatment response to antidepressant and mood stabilizing medications. *J Psychiatry Neurosci* 27: 260-265.
- Kano M., Ohno-Shosaku T., Hashimoto Y., Uchigashima M., Watanabe M. (2009) Endocannabinoid-Mediated control of synaptic transmission. *Physiol rev* 89: 309-380.
- Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N., La Harpe R. (2005) Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res.*136: 29-37.
- Kearn C.S., Hillard C.J. (1997) Rat microglial cell express the peripheral-type cannabinoid receptor (CB<sub>2</sub>) which is negatively coupled to adenylyl cyclase. *Proceedings of the symposium on the cannabinoids, Burlington, Vermont, International Cannabinoid Research Society* 57.
- Koponen E., Rantamaki T., Voikar V., saarelainen T., MacDonald E., Castren E. (2005) Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. *Cell Mol. Neurobiol* 25: 973-980.

- Kreitzer A.C., Regehr W.G. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses in to Purkinje cells. *Neuron* 29: 717-727.
- Levenes C., Daniel H., Soubrie P., Crepel F. (1998) Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 510: 867-879.
- Lutter M., Krishnan V., Russo S.J., Jung S., McClung C.A. Nestler E.J. (2008) Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. *J. Neurosci* 28: 3071-3075.
- Maejima T., Hashimoto K., Yoshida T., Aiba A., Kano M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31:463-475.
- Mailleux P., Vanderhaeghen J.J. (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48: 655-668.
- Malberg J.E. (2004) Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci* 29: 196-205.
- Maletic V., Robinson M., Oakes T., Iyengar S, Ball S.G., Russell J. (2007) Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int. J Clin Pract* 61: 2030-2040.
- Marsez K., Carrier E.J., Ponomarev E.D., Hillard C.J., Dittel B.N. (2005) Modulation of the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor in microglia cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95: 437-445.
- Martin M., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R., Valverde O. (2002) Involvement of CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology* 159: 379-387.
- Mathew S.J. Manji H.K., Carney D.S. (2008) Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33: 2080-2092.
- Matias I. (2006) Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int. J. Obes (Lond)* 30: 7-12.
- Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. (1990) Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.
- McFarland M.J., Porter A.C., Rakhshan F.R., Rawat D.S., Gibbs R.A., Barker E.L. (2004) A role of caveolae/lipid rafts in the uptake and re cycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem* 279: 41919-41997.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.*50: 83-90.

- Mechoulam R., Shvo Y., Hashish I. (1963) The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19: 2073-2078.
- Monteggia L.M. (2007) Elucidating the role of brain-derived neurotrophic factor in the brain. *Am J Psychiatry*.164: 1790.
- Monteggia L.M., Barrot M., Powell C.M., Berton O., Galanis V., Gemelli T., Meuth S., Nagy A., Greene R.W., Nestler E.J. (2004) Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:10827-32.
- Moreira F.A., Crippa J.A. (2009) The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr*. 31:145-53
- Muntoni A.L. (2006) Cannabinoids modulate spontaneous neuronal activity and evoked inhibition of locus coeruleus noradrenergic neurons. *Eur J Neurosci* 23: 2385-2394.
- Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of peripheral receptor for cannabinoid. *Nature* 365: 61-65.
- Naidu P.S., Varvel S.A., Ahn K., Cravatt B.F., Martin B.R., Lichtman A.H. (2007) Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition murine models of emotionality. *Psychopharmacology* 192: 65-70.
- Nakazi M., Bauer U., Nickel T., Kathmann M., Schlicker E. (2000) Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361: 19-24.
- Need A.B., Davis R.J., Alexander-Chacko J.T., Eastwood B., Chernet E., Phebus L.A., Sindelar D.K., Nomikos G.G. (2006) The relationship of in vivo central CB1 receptor occupancy to changes in cortical monoamine release and feeding elicited by CB1 receptor antagonists in rats. *Psychopharmacology* 184: 26-35.
- Nestler E. J., Carlezon W.A. (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59: 1151-1159.
- Nestler E. J., Barrot M., DiLeone R. J., Eisch A. J., Gold S. J. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.
- Nibuya M., Morinobu S., Duman R.S. (1995) Regulation of BDNF and Trkb mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatment. *J Neurosci* 15: 7539-7547.
- Nissen S.E. Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodés-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, Després JP, Kastelein JJ, Steinhilber SR, Kapadia S, Yasin M, Ruzyllo W, Gaudin C, Job B, Hu B, Bhatt DL, Lincoff AM, Tuzcu EM (2008) Effect of Rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA* 299: 1547-1560.

- Nunez E., Benito C. Pazos M.R., Barbachano A. Fajardo O., Gonzales S., Tolon R.M., Romero J. (2004) Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53: 208-213.
- Olivas J.M., Uriguen L., Perz-Rial S., Manzanares J. (2005) Time course of opioid and cannabinoid gene transcription:alterations induced by repeated administration with fluoxetine in the rat brain. *Neuropharmacology* 49: 618-626
- Onaivi E.S. (2006) Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor in the brain. *Neuropsychobiology* 54: 231-246.
- Oropeza V.C., Mackie K., Van Bockstaele E.J. (2007) Cannabinoid receptors are localized to noradrenergic axon terminals in the rat frontal cortex. *Brain Res* 1127: 36-44.
- O'Sullivan S.E., Kendall D.A., Randall M.D. (2004) Characterization of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA.). *British Journal of Pharmacology* 141: 803-812.
- Pacher P., Batkai S & Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* 58: 389-462.
- Pagotto U., Marsicano G., Cota D., Lutz B., Pasquali R. (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and Energy balance. *Endocrine Reviews* 27: 73-100.
- Paxinos G., Watson C. (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press.
- Pazos M.R., Nunez E., Benito C., Tolon R.M., Romero J. (2005) Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol Biochem and Behavior* 81: 230-247.
- Pertwee R.G. (2005) The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J* 7: E625-54
- Pertwee R.G. (2003) Inverse agonism at cannabinoid receptors. *Elsevier*:75-86.
- Pertwee R.G. (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63: 569-611.
- Pertwee R.G. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptors ligands. *Curr Med. Chem.* 6: 635-664.
- Pertwee R.G. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Pharmacol Ther* 74: 129-80.
- Piomelli D., Beltramo M., Glansnapp S., Lin S.Y., Goutopoulos A., Xie X.Q., Makriyannis A. (1999) Structural determinants for recognition and trans location by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5802-5807.
- Porter A.C., Sauer J.M., Knierman M.D., Becker G.W., Berna M.J., Bao J., Nomikos G.G., Carter P., Bymaster F.P., Leese A.B., Felder C.C. (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB<sub>1</sub> receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 1020-1024.

- Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. (1978) "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramina. *Eur J Pharmacol.* 51:291-4
- Ravinet-Trillou C., Delgorge C., Menet C., Arnone M., Soubrie P. (2004) CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 46:640–648.
- Ridder S., Chourbaji S., Hellweg R., Urani A.I., Zacher C., Schmid W., Zink M., Hornagl H., Flor H., Henn F.A., Schutz G., Gass P. (2005) Mice with genetically altered glucocorticoid receptors expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *The Journal of Neuroscience* 25: 6243-6250.
- Rinaldi-Carmona M., Barth F., Heaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martinez S., Maruani J., Neliat G., Caput D., Ferrara P., Soubrie P., Breliere J.C., Le Fur G. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350:240-244.
- Ryberg E., Larsson N., Sjogren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Lenova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology* 152: 1092-1101.
- Rodríguez-Gaztelumendi A., Rojo M.L., Pazos A., Díaz A. (2009) Altered CB<sub>1</sub> receptor-signaling in prefrontal cortex from an animal model of depression is reversed by chronic fluoxetine. *Journal of Neurochemistry* 108: 1423–1433,
- Rogoz Z., Legutko B. (2005) Combined treatment with imipramina and metyrapone induces hippocampal and cortical Brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *Pharmacological reports* 57: 840-844.
- Sagredo O, Ramos JA, Fernández-Ruiz J, Rodríguez ML, de Miguel R. (2006) Chronic Delta9-tetrahydrocannabinol administration affects serotonin levels in the rat frontal cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 372:313-7.
- Sanchis-Segura C, Cline BH, Marsicano G, Lutz B, Spanagel R. (2004) Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. *Psychopharmacology* 176:223-32.
- Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R.S., Arancio O., Belzung C., Hen R., (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressant. *Science* 8: 805-809.
- Sapolsky R.M. (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57: 925-935.
- Schildkraut J.J. (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509-522.
- Schlicker E., Kathmann M. (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trands Pharmacol Sci* 22: 565-572.

- Serra G., Fratta W. (2007) A Possible role for the endocannabinoid system in the neurobiology of depression. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health* 3: 1-11.
- Shearman L.P., Rosko K.M., Fleischer R., Wang J., Xu S., Tong X.S., Rocha B.A.. (2003) Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behavioral Pharmacology* 14: 573-582.
- Sheline Y.I., Gado M.H., Kraemer H.C. (2003) Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 160: 1516-1518.
- Skaper B., Buriano A., Dal Toso R., Petrelli L., Romanello S., Facci L., et al (1996) The ALAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3984-9.
- Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci.* 22:3251-61.
- Smith M.A., Makino S., Kvetnansky R., Post R.M. (1995) Stress and glucocorticoids affect the expressing of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15:1768-1777.
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. (1995) 2-arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97.
- Steiner M.A. et al. (2008) Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice. *Psychoneuroendocrinology* 33: 54-67.
- Stockmeier C.A., Mahanjan G.J., Konick L.C. et al. (2004) Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*, 56: 640-50.
- Sugiura T., Kishimoto S., Oka S., Gokoh M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligands cannabinoid receptor. *Prog Lip Res* 45: 405-446.
- Sugrue M.F. (1983) Chronic antidepressant therapy and associated changes in central monoaminergic receptor functioning. *Pharmacol Ther* 21: 1-33.
- Svizenska I., Dubovy P., Sulcova A. (2008) Cannabinoid receptor 1 and 2 (CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures. A short review. *Pharmacol. Biochem. and Behavior* 90: 501-5011.
- Swanson L. W. (1987) The hypothalamus. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol 5, Integrated System of CNS, Part I, Hypothalamus, Hippocampus, Amigdala; Retina. *Elsevier*, 1-124.

- Szabo B., Norheim U., Niederhoffer N. (2001) Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 819-26.
- Szabo B., Dorner L., Pfreundtner C., Norenberg W., Starke K. (1998) Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85: 395-403.
- Tichomirova M.A., Keck M.E., Schneider H.J., Paez-Pereda M., Renner U., Holsboer F., Stalla G.K. (2005) Endocrine disturbances in depression. *J Endocrinol Invest* 28: 89-99.
- Trivedi M.H., Rush A.J., Wisniewski S.R., Nierenberg A.A., Warden D., Ritz L., Norquist G., Howland R.H., Lebowitz B., McGrath P.J., Shores-Wilson K., Biggs M.M., Balasubramani G.K., Fava M. (2006) Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implication for clinical practice. *Am. J. Psychiatry* 163, 28-40.
- Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M.C., Mackie K., Walker J.M. (1997) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411.
- Tzavara ET, Davis RJ, Perry RW, Li X, Salhoff C, Bymaster FP, Witkinand JM, Nomikos GG, (2003) The CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716 selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *British Journal of Pharmacol* 138: 544-553.
- Urigüen L., Pérez-Rial S., Ledent C., Palomo T., Manzanares J.. (2004) Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors. *Neuropharmacology*. 46: 966-73.
- Vaishnav K., Nestler E.(2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455.
- Van Gaal L.F., Pi-Sunyer X., Despres J.P (2008) Efficacy and safety of rimonabant for improvement multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 31: S229-S240
- Vasquez C., Navarro-Polanco R.A., Huerta M., Trujillo X., Andrade F., Trujillo-Hernandez B., Hernandez L. (2003) Effects of cannabinoids on endogenous K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in HEK293 cells. *Can J Physiol Pharmacol* 81:436-442.
- Videbech P., Ravnkilde B. (2004) Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161: 1957-1966.
- Vinod K.Y., Hungund B.L. (2006) Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Pharmacol. Science* 27,10.
- Vinod K.I., Arango V., Xie S., Kassir S.A., Mann J.J., Cooper T.B., Hungund B.L. (2005) Elevated levels of endocannabinoids and CB<sub>1</sub> receptor-mediated G-protein signalling in the prefrontal cortex of alcoholic suicide victims. *Biol Psychiatry* 57:480-486.

- Wastlake T.M., Howlett A.C., Bonner T.I., Matsuda L.A., Herkenham M. (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiographic and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer brains. *Neuroscience* 63: 637-652.
- Williamson E.M., Evans F.J. (2000) Cannabinoids in clinical practice. *Drugs* 60: 1303-1314.
- Wilson R.I., Nicoll R.A. (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-682.
- Witkin J.M., Tzavara E.T., Davis R.J., Lia X., Nomikos G.G., (2005a) A therapeutic role for cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonists in major depressive disorders. *Trends In Pharmacological Sciences* 26: 609-617.
- Witting A., Walter L., Wacker J., Moller T., Stella N. (2004) P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3214-9.
- Wong E. Y., Hrbert J. (2004) Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137(1): 83-92.
- Zygmunt P.M., Petersson J., Andersson D.A., Chuang H., Sorgard M., Di Marzo V., Julius D., Hogestatt E.D. (1999) Vanilloid receptor on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457.
- Zhang J., Hoffert C., Vu H.K., Groblewski T., Ahmad S., O'Donnell D. (2003) Induction of CB<sub>2</sub> receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but non inflammatory chronic pain models. *Eur Neurosci* 17: 2750-2754.