



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Dottorato in Neuroscienze

Ciclo XXVII

**CARATTERIZZAZIONE DEL CLOFIBRATO AGONISTA
SINTETICO DEI RECETTORI DEI PROLIFERATORI DEI
PEROSSISOMI (PPAR α) IN MODELLI ANIMALI DI
DEPRESSIONE ED ANSIA**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO/14 FARMACOLOGIA

Presentata da:	Alessandra Mameli
Coordinatore Dottorato	Prof. Walter Fratta
Tutor/ Relatore	Prof.ssa Paola Fadda

Esame finale anno accademico 2013 – 2014



La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze, dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

INDICE

INTRODUZIONE	<i>pag. 1</i>
<i>1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR) ed i loro agonisti endogeni</i>	<i>pag. 2</i>
<i>1.1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR): struttura e meccanismo d'azione</i>	<i>pag. 2</i>
<i>2. Recettori dei proliferatori dei perossisomi isoforma α (PPARα)</i>	<i>pag. 6</i>
<i>2.1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi isoforma α (PPARα): distribuzione e ligandi</i>	<i>pag. 6</i>
<i>2.2. Etanolamidi degli acidi grassi (FAE): sintesi e catabolismo</i>	<i>pag. 7</i>
<i>2.3. Recettori PPARα e interazioni con il sistema endocannabinoide</i>	<i>pag. 12</i>
<i>2.4. Funzionalità biologiche di OEA e PEA legate all'attivazione dei recettori PPARα</i>	<i>pag. 13</i>
<i>2.5. Nuove evidenze sperimentali sugli effetti di OEA e PEA</i>	<i>pag. 15</i>
<i>2.6. La PEA nella pratica clinica</i>	<i>pag. 19</i>
<i>2.7. Ligandi sintetici dei recettori PPARα: i fibrati</i>	<i>pag. 21</i>
<i>2.8. Farmacologia dei ligandi sintetici dei recettori PPARα</i>	<i>pag. 24</i>
<i>2.9. Nuove evidenze sperimentali sulla farmacologia dei ligandi sintetici dei recettori PPARα</i>	<i>pag. 26</i>
<i>2.10. I fibrati nella pratica clinica</i>	<i>pag. 28</i>

<i>3. Ansia e Depressione</i>	<i>pag. 29</i>
<i>3.1. Modelli animali per lo studio dell'ansia e della depressione</i>	<i>pag. 31</i>
<i>3.2. Modelli animali di depressione</i>	<i>pag. 31</i>
<i>3.3. Modelli animali d'ansia</i>	<i>pag. 32</i>
<i>4. Implicazioni dei recettori PPARα nell'ansia e nella depressione</i>	<i>pag. 34</i>
OBIETTIVI	<i>pag. 37</i>
MATERIALI E METODI	<i>pag. 39</i>
<i>1.1. Animali</i>	<i>pag. 39</i>
<i>1.2. Farmaci utilizzati nei test comportamentali</i>	<i>pag. 39</i>
<i>1.3. Gruppi sperimentali e trattamenti farmacologici</i>	<i>pag. 40</i>
<i>1.4. Test comportamentali</i>	<i>pag.41</i>
<i>1.4.1. Test dell'attività motoria: apparato e procedura</i>	<i>pag.41</i>
<i>1.4.2. Test del nuoto forzato: apparato e procedura</i>	<i>pag.42</i>
<i>1.4.3. Elevated plus maze: apparato e procedura</i>	<i>pag. 44</i>
<i>1.4.4. Test dell'interazione sociale: apparato e procedura</i>	<i>pag. 46</i>
<i>1.5. Analisi statistica</i>	<i>pag. 48</i>

RISULTATI

- 1. Effetti comportamentali dopo somministrazione acuta e sub-acuta di clofibrato* *pag. 49*
- 1.1. Test dell'attività motoria* *pag. 49*
- 1.1.1. Valutazione del trattamento acuto con l'agonista dei recettori PPAR α , clofibrato, nel test dell'attività motoria* *pag. 49*
- 1.2. Test comportamentale per la valutazione dello stato depressivo* *pag. 52*
- 1.2.1. Effetto del trattamento subacuto dell'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato, nel test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"* *pag. 52*
- 1.2.2. Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB1, SR141617A, sull'attività antidepressiva dell'agonista PPAR α , clofibrato, nel test comportamentale del "nuoto forzato"* *pag. 55*
- 1.2.3. Valutazione della possibile interazione tra l'effetto antidepressivo-simile dell'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato, e l'antidepressivo fluoxetina o amitriptilina, nel test comportamentale del "nuoto forzato"* *pag. 58*
- 1.2.4. Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB1, SR141617A, sull'attività antidepressiva del farmaco SSRI, fluoxetina, nel test comportamentale del "nuoto forzato"* *pag. 61*

1.2.5. Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB, SR141617A, sull'attività antidepressiva del farmaco triciclico, amitriptilina, nel test comportamentale del "nuoto forzato"	pag. 64
1.3. Test comportamentali per la valutazione dello stato ansioso	pag. 67
1.3.1. Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test comportamentale di ansia "elevated plus maze"	pag. 67
1.3.2. Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test comportamentale di ansia "interazione sociale".	pag. 70
2. Effetti comportamentali dopo somministrazione cronica di clofibrato	
2.1. Test dell'attività motoria	pag. 72
2.1.1. Valutazione del trattamento cronico con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato nel test dell'attività motoria	pag. 72
2.2. Test comportamentale per la valutazione dello stato depressivo	pag. 75
2.2.1. Effetto del trattamento cronico con l'agonista endogeno e sintetico dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"	pag. 75
2.3. Test comportamentali per la valutazione dello stato ansioso	pag. 77

<i>2.3.1. Valutazione del trattamento cronico con gli agonisti dei recettori PPARα, PEA e clofibrato nel test comportamentale di ansia “elevated plus maze”</i>	<i>pag. 77</i>
<i>2.3.2. Valutazione del trattamento cronico con gli agonisti dei recettori PPARα, PEA e clofibrato, nel test comportamentale di ansia “interazione sociale”</i>	<i>pag. 80</i>
DISCUSSIONE	<i>pag. 82</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 94</i>

INTRODUZIONE

I “recettori dei proliferatori dei perossisomi” o PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sono fattori di trascrizione ligando dipendenti appartenenti alla superfamiglia dei recettori ormonali nucleari, che comprende anche i recettori per gli ormoni steroidei, tiroidei, per l’acido retinoico e per la vitamina D (Esciva *et al.* 1998; Desvergne e Wahli 1999; Francis *et al.* 2003). L’attivazione dei recettori nucleari viene innescata dal legame con ligandi costituiti da piccole molecole lipofile, come ormoni, acidi grassi ed i loro prodotti metabolici (Desvergne e Wahli 1999).

I recettori PPAR vennero inizialmente definiti come recettori orfani, a causa della mancata identificazione di un ligando specifico ed in seguito rinominati, per la loro capacità di mediare gli effetti pleiotropici di ligandi definiti “proliferatori dei perossisomi” (Reddy *et al.* 1986; Green e Wahli 1994), composti chimici capaci di indurre la proliferazione di perossisomi, nel fegato del topo e del ratto.

Il recettore, attivato dal suo specifico ligando, forma un eterodimero con il “recettore X per i retinoidi” o RXR (Retinoid X Receptor), anch’esso appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari (Keller *et al.* 1993). L’eterodimero riconosce e lega specifiche sequenze sul DNA denominate PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) localizzate su geni bersaglio (Pistis e Melis 2010).

Un gran numero di proteine accessorie, quali coattivatori e corepressori, può legarsi ai recettori nucleari in modo ligando-dipendente e regolare il processo di trascrizione tramite rimodellamento della struttura cromatinica e/o agendo da molecole adattatrici che legano il recettore nucleare al complesso trascrizionale (Yu e Reddy 2007).

1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR)

1.1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR): struttura e meccanismo d'azione

I recettori attivati da proliferatori dei perossisomi (PPAR) appartengono alla superfamiglia dei recettori ormonali nucleari (NHR) insieme ai recettori steroidei, tiroidei e retinoidi (Issemann e Green 1990; Green e Wahli 1994).

I recettori PPAR, come altri recettori nucleari, presentano una struttura composta da quattro domini:

- (A/B) la regione NH 2-terminale ospita il dominio di transattivazione ligando-indipendente (AF-1) che è attivo in ogni tipo cellulare;
- (C) regione altamente conservata che presenta il sito di legame per il DNA (DBD: DNA Binding Domain) che consiste in due motivi "zinc fingers" disposti perpendicolarmente fra loro;
- (D) regione che compone un'ansa flessibile che permette la corretta disposizione del DBD dopo attivazione del recettore dovuta al legame col ligando;
- (E/F) la regione C-terminale che comprende il dominio di legame con il ligando (LBD: Ligand Binding Domain) e di trans attivazione ligando-dipendente, consente la dimerizzazione tra i recettori PPAR e retinoidi X (RXR) e l'associazione con modulatori della trascrizione (coattivatori o corepressori).

A differenza dei recettori per gli ormoni steroidei, attivi sottoforma di omodimeri, la regolazione trascrizionale mediata dai recettori PPAR richiede l'eterodimerizzazione con il recettore per l'acido retinoico (RXR) (Keller *et al.* 1993), appartenente alla stessa

superfamiglia recettoriale. In seguito ad attivazione ligando dipendente, l'eterodimero può legare specifiche sequenze di DNA definite PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element). Tali sequenze sono caratterizzate dalla ripetizione diretta di due motivi di riconoscimento AGGTCA separati da 1 nucleotide, definita DR1 (Varanasi *et al.* 1996), generalmente presente in singola o multipla copia nella regione promotrice dei geni bersaglio.

Sono stati identificati tre differenti geni, ciascuno codificante una delle tre isoforme recettoriali; PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) and PPAR γ (NR1C3) (Dreyer *et al.* 1992; Desvergne e Wahli 1999; Willson *et al.* 2000), che condividono la medesima struttura e meccanismi d'azione molecolare (Ferre 2004), ma differiscono per funzionalità e distribuzione.

I recettori PPAR α sono coinvolti nella regolazione del metabolismo e catabolismo degli acidi grassi (β -ossidazione) e nei processi antinfiammatori (Stienstra *et al.* 2007).

I ligandi endogeni di questi recettori sono costituiti da lipidi endogeni o derivanti dalla dieta e dai loro metaboliti.

I recettori PPAR β/δ svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi soprattutto nel tessuto muscolare (Barish *et al.* 2006). Questi recettori sono target degli acidi grassi LDL-derivati ed eicosanoidi e delle prostaglandine A1. I recettori PPAR β/δ sono espressi in modo ubiquitario, nell'essere umano presentano una maggiore espressione nel tratto digestivo e nella placenta.

I recettori PPAR γ sono suddivisi in tre sottotipi: PPAR γ 1, ubiquitari; PPAR γ 2 espressi soprattutto nel tessuto adiposo; PPAR γ 3, nei macrofagi (Auboeuf *et al.* 1997). I recettori

PPAR γ sono coinvolti nella regolazione del differenziamento degli adipociti e del loro accumulo, nell'infiammazione (Stienstra *et al.* 2007) e nella regolazione nel metabolismo dei carboidrati, infatti, sono responsabili della riduzione dei livelli di glucosio nel sangue, inoltre regolano la sensibilità all'insulina. I ligandi naturali dei recettori PPAR γ sono gli eicosanoidi mentre quelli sintetici sono i tiazolidindioni (TZD) utilizzati nel trattamento clinico del diabete di tipo 2 per incrementare la sensibilità all'insulina. Nei roditori, l'isoforma recettoriale γ è espressa nel tessuto adiposo e, in modo minore, nella mucosa intestinale, retina, muscoli scheletrici ed organi linfatici. Nell'uomo, tale isoforma è altamente espressa nel tessuto adiposo e, in minor misura, in muscoli scheletrici, cuore e fegato (Heneka *et al.* 2007).

Nonostante la loro specifica distribuzione negli organi periferici, tutte e tre le isoforme sono ampiamente espresse a livello del sistema nervoso centrale e periferico (Moreno *et al.* 2004; Cimini *et al.* 2005).

Meccanismo d'azione genomico. L'attivazione dei PPAR regola principalmente la trascrizione di geni bersaglio (Berger e Moller 2002).

L'interazione del ligando con il sito di legame dei recettori PPAR dà luogo a cambiamenti conformazionali che portano alla dissociazione dei complessi corepressori, favorendo la traslazione recettoriale. Successivamente, la formazione dell'eterodimeri con il recettore RXR, permette il riconoscimento ed il legame di specifiche sequenze del DNA, gli elementi di risposta dei proliferatori dei perossisomi o Peroxisome Proliferator Response Elements (PPRE), per incrementare o ridurre la trascrizione di geni target (Bardot *et al.* 1993). Inoltre, la loro funzionalità può essere modulata dall'interazione con numerose proteine

chinasi (Burns e Vanden Heuvel 2007) e da un'ampia gamma di complessi proteici coattivatori e corepressori (Yu e Reddy 2007).

Meccanismo d'azione non genomico. Oltre al meccanismo d'azione genomico, i recettori PPAR possono agire con meccanismo non-genomico (Gardner *et al.* 2005; Melis *et al.* 2008; Ropero *et al.* 2009). Infatti, essi esplicano i loro effetti con estrema rapidità, all'interno di un ristretto arco di tempo (2-5 min) (Ropero *et al.* 2009) e tramite attivazione di tirosin-chinasi (Melis *et al.* 2008).

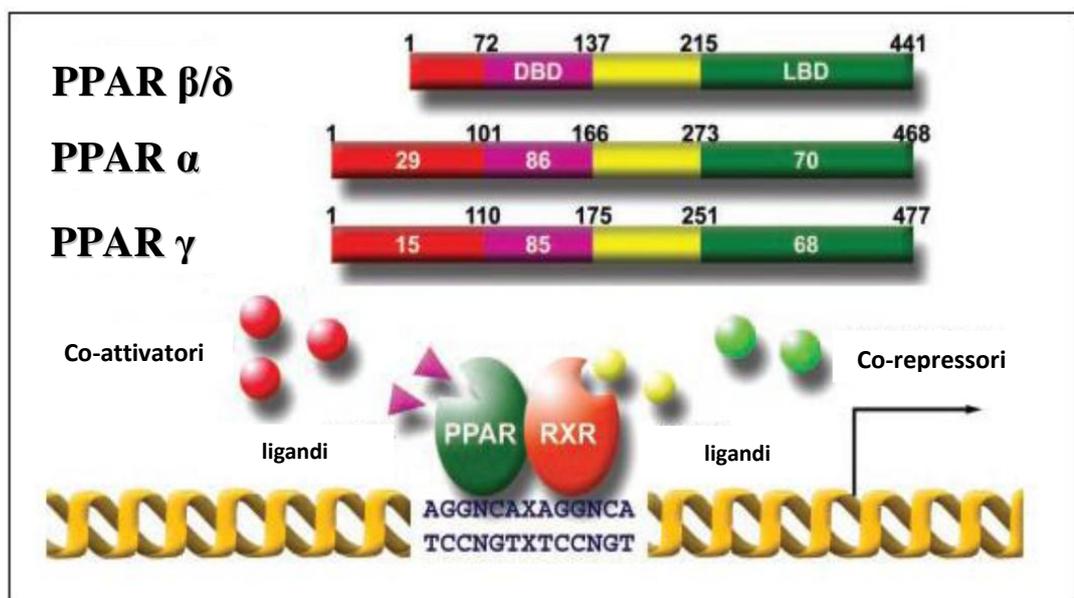


Fig. A. Struttura e meccanismo d'azione genomico dei recettori PPARs (Rosen e Spiegelman 2001)

2. Recettori dei proliferatori dei perossisomi isoforma α (PPAR α)

2.1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi isoforma α (PPAR α): distribuzione e ligandi

L'identificazione del recettore PPAR α risale ai primi anni '90, il gene (NR1C1) codificante tale isoforma fu il primo ad essere clonato e caratterizzato in diverse specie, comprese il ratto, il topo (Issemann and Green 1990; Göttlicher *et al.* 1992) e l'uomo, nel quale il gene codificante per il recettore PPAR α (NR1C1) è stato mappato sul cromosoma 22q12-q13.1 (Sher *et al.* 1993; Mukherjee *et al.* 1994).

Tale isoforma recettoriale è principalmente espressa nei tessuti caratterizzati da intensa attività metabolica come fegato, cuore, rene, muscolo scheletrico, tessuto adiposo e SNC (Braissant *et al.* 1996; Aubeuf *et al.* 1997; Mandard *et al.* 2004; Moreno *et al.* 2004; Galan-rodriguez *et al.* 2009), si ritrova inoltre espresso nei monociti, nell'endotelio vascolare e nelle cellule muscolari lisce (Chinetti *et al.* 1998). Coerentemente con la sua distribuzione tissutale, il ruolo principale del recettore PPAR α è la regolazione dell'omeostasi energetica (Lefebvre *et al.* 2006). Molti aspetti del metabolismo lipidico epatico sono sotto controllo dei recettori PPAR α , tra cui l'assorbimento degli acidi grassi attraverso le membrane, l'attivazione, il traffico intracellulare e l'ossidazione di questi ultimi, la chetogenesi, lo stoccaggio dei trigliceridi e la lipolisi (Rakhshandehroo *et al.* 2010). Inoltre, svolgono un ruolo importante nel controllo del metabolismo delle lipoproteine, in particolare riducono i trigliceridi circolanti e la produzione di lipoproteine a bassa densità (VLDL) (Kersten 2008). Svolgono un importante ruolo nel metabolismo del glucosio e degli aminoacidi e sono responsabili della proliferazione degli epatociti in

particolare nei roditori (Issemann e Green 1990). In ultimo, i recettori PPAR α agiscono come modulatori negativi della risposta infiammatoria (Ramanan *et al.* 2008).

I ligandi naturali di tale isoforma recettoriale, includono una varietà di acidi grassi, loro derivati e composti strutturalmente simili, fisiologicamente prodotti dall'organismo o derivanti dalla dieta (Devchand *et al.* 1996; Schoonjans *et al.* 1996 a, b; Forman *et al.* 1997; Kliewer *et al.* 1997; Khan e Vanden Heuvel 2003). La ricerca attuata allo scopo di identificare i ligandi endogeni dei recettori PPAR α portò all'identificazione di due composti quali l'oleoiletanolamide (OEA) e palmitoiletanolamide (PEA), appartenenti alla classe delle etanolamidi degli acidi grassi (FAE) (Fu *et al.* 2003; Lo Verme *et al.* 2005 a, b). In particolare, OEA attiva i recettori PPAR α con una concentrazione dell'effetto massimale al 50% (EC50) di 120 nM e i PPAR β/δ con una EC50 di 1.1 μ M, mentre non ha alcun effetto sui recettori PPAR γ (Fu *et al.* 2003; Pistis e Melis 2010). PEA, rispetto ad OEA, mostra un'affinità di legame più bassa nei confronti dell'isoforma α (3 μ M) e non mostra attività sulle altre isoforme (Bouaboula *et al.* 2005; Lo Verme *et al.* 2005 a, b). L'anandamide (AEA) è considerata un agonista putativo dei recettori PPAR α , anche se questa ipotesi è supportata esclusivamente da studi *in vitro* su cellule trasfettate (Sun e Bennet 2007).

2.2. Etanolamidi degli acidi grassi (FAE): sintesi e catabolismo

Le etanolamidi degli acidi grassi (FAE) sono importanti molecole lipidiche di segnale ampiamente distribuite in piante, invertebrati e mammiferi (Lambert e Di Marzo 1999; Lambert e Muccioli 2007). Alla classe biochimica delle FAE afferiscono l'endocannabinoide arachidonoiletanolamide o anandamide (AEA), e composti non-

cannabinoidi come l'OEA e la PEA. Questi ultimi rappresentano i ligandi endogeni dell'isoforma α dei recettori PPAR e sono generati da un precursore dei fosfolipidi di membrana quando le cellule vengono stimulate dall'incremento di Ca^{2+} intracellulare, agenti depolarizzanti, neurotrasmettitori ed ormoni (Di Marzo *et al.* 1994; Cadas *et al.* 1997; Schuel *et al.* 2002).

La sintesi delle FAE, nei mammiferi, avviene "on-demand" all'interno del doppio strato lipidico (Cadas *et al.* 1996) attraverso attività enzimatiche. Il processo ha luogo nei fosfolipidi di membrana, dove gli acidi grassi e le fosfatidiletanolamine (PE), tramite N-aciltransferasi (NAT), enzima Ca^{2+} /cAMP-dipendente, formano il precursore delle FAE, la N-acil fosfatidiletanolamina (NAPE). La formazione di NAPE può avvenire tramite N-acilazione inter o intramolecolare di PE, PC, liso-PC o cardiolipina (Schmid 2000). Attraverso l'azione di N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasi D (NAPE-PLD) vengono prodotte l'OEA e la PEA (Hansen e Deep 2009). Un meccanismo alternativo per la sintesi di PEA consiste nell'idrolisi di NAPE in N-palmitoil-liso PE (liso-NAPE) tramite l'azione di fosfolipasi A2 (PLA2), e successiva scissione di liso-NAPE in PEA da parte di una lisofosfolipasi D (liso-PLD) (Natarajan *et al.* 1984; Lo Verme *et al.* 2005 a, b). È stato riportato inoltre che la formazione di OEA e PEA (nonché AEA) è collegata all'attivazione dei recettori N-Metil-D-aspartato (NMDA) per il glutammato e quelli colinergici (Hampson *et al.* 1998; Stella e Piomelli 2001).

In particolare, sembrerebbe che la stimolazione dei recettori muscarinici possa aumentare la produzione di OEA e PEA (Stella e Piomelli 2001). Inoltre, sembrerebbe che OEA e PEA possano essere modulatori endogeni della trasmissione colinergica attraverso

il blocco dei recettori nicotinici *via* PPAR α . Questo indicherebbe la possibilità che l'acetilcolina e le FAE, regolino reciprocamente le loro attività (Melis *et al.* 2008).

Il catabolismo delle FAE avviene tramite rapida idrolisi mediata principalmente dall'amido idrolasi degli acidi grassi (FAAH) localizzata nel reticolo endoplasmatico (Ahn *et al.* 2008; Cravatt *et al.* 1996) e dalla "N-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase" (NAAA) (Puffenbarger 2005) che presenta localizzazione lisosomiale (Tsuboi *et al.* 2007). Quest'ultimo è responsabile soltanto dell'idrolisi della PEA che è substrato anche della FAAH. Anche OEA è substrato di due diverse idrolasi: la FAAH e la proteina N-acilsfingosina aminoidrolase-simile (proteina ASAH-simile) (Sun *et al.* 2006). FAAH è una serina idrolasi (Desarnaud *et al.* 1995; Hillard *et al.* 1995; Ueda *et al.* 1995; Cravatt *et al.* 1996; Bracey *et al.* 2002) presente in tutti i tessuti dei mammiferi, ed è un enzima specifico per il catabolismo delle amidi degli acidi grassi. Quindi FAAH rappresenta il principale enzima catabolico sia delle etanolamidi non-cannabinoidi OEA e PEA, che dell'etanamide cannabinoidi AEA.

FAAH è particolarmente espressa nel cervello e nel fegato (Lichtman *et al.* 2002; Cravatt *et al.* 2004; Patel *et al.* 2005).

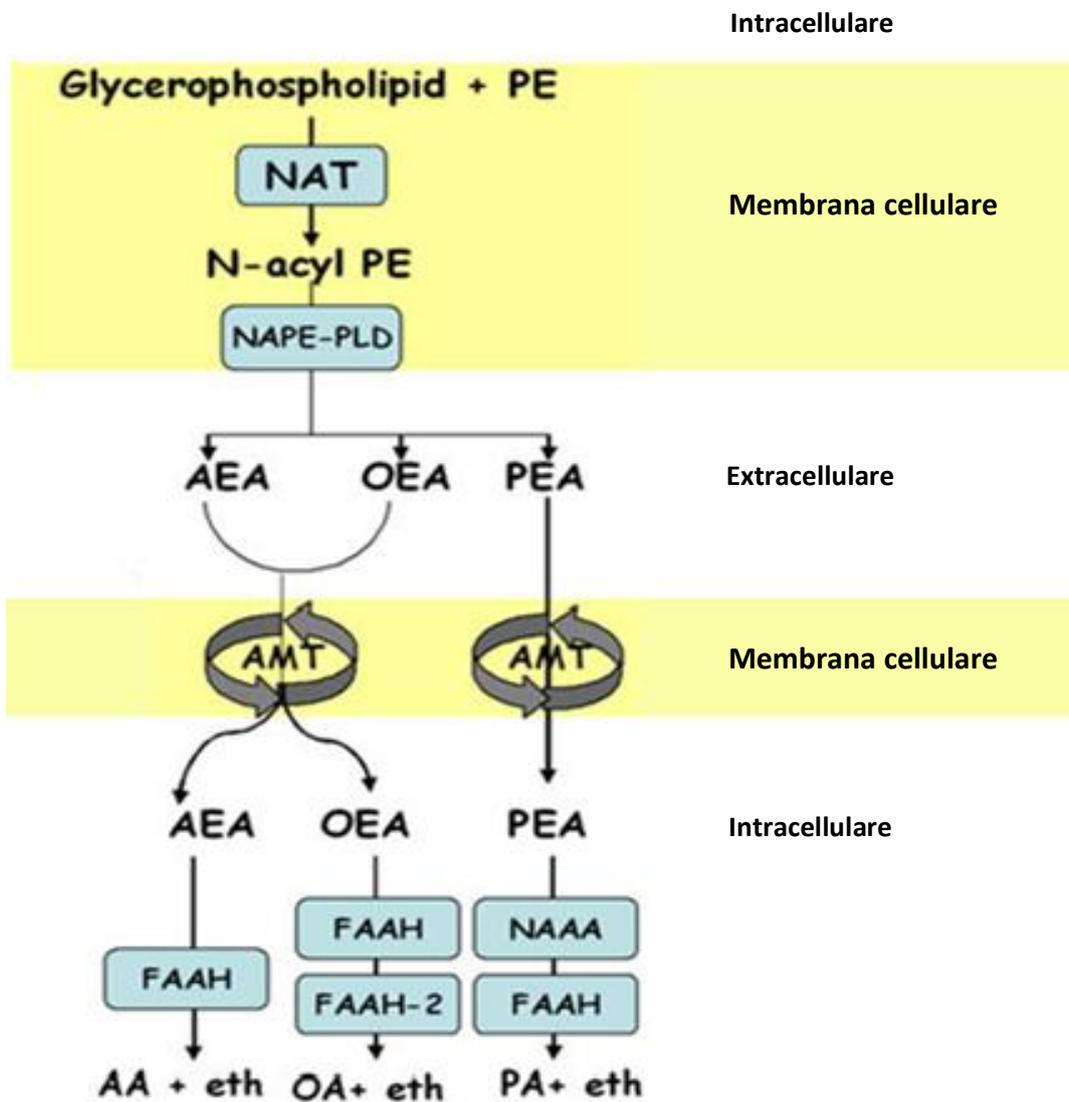


Fig. B. Biosintesi e catabolismo delle FAE, anandamide (AEA), oleoiletanolamide (OEA) e palmitoiletanolamide (PEA) (Borrelli et al. 2009)

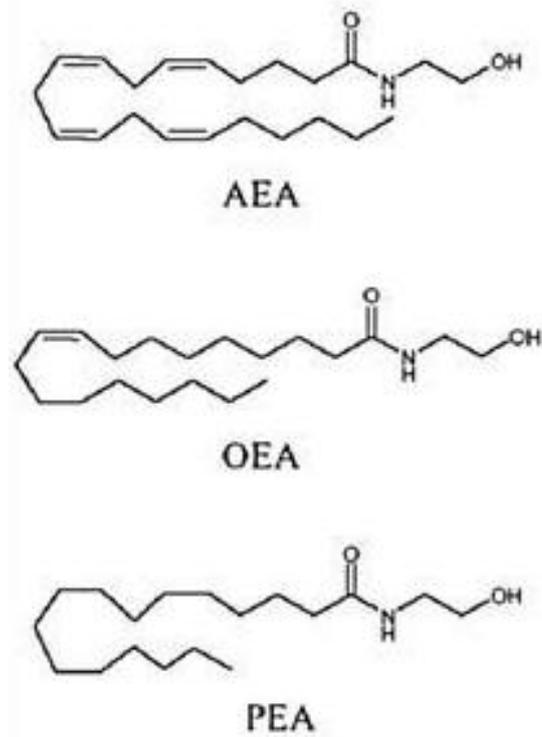


Fig. C. Struttura chimica delle FAE, anandamide (AEA), oleoiletanolamide (OEA) e palmitoiletanolamide (PEA) (Borrelli et al. 2009)

2.3. Recettori PPAR α e interazioni con il sistema endocannabinoide

Un importante numero di evidenze scientifiche mette in relazione sistema endocannabinoide e recettori PPAR α poiché agiscono su campi d'azione comuni come infiammazione ed analgesia, neuro-protezione, comportamento nutritivo e funzioni cognitive. OEA e PEA si pensa vengano sintetizzate e metabolizzate attraverso meccanismi simili a quelli dell'endocannabinoide AEA (Alexander e Kendall 2007). Inoltre, competono, insieme ad AEA, per il sito di legame con la FAAH, l'enzima responsabile del loro catabolismo. In questo modo aumentano i livelli di AEA potenziandone gli effetti: questo fenomeno è noto col nome di "effetto entourage". Queste due molecole sembrerebbero in grado di potenziare gli effetti di AEA anche attraverso l'azione sui recettori vanilloidi di tipo 1 (TRPV1) *in vivo* (De Petrocellis *et al.* 2001; Smart *et al.* 2002; Ho *et al.* 2008).

Diversi studi hanno ipotizzato che OEA e PEA esercitino i loro effetti non solo *via* PPAR ma anche attraverso altri target come i recettori orfani accoppiati a proteine G, GPR119 (attivato da OEA) e GPR55 (attivato da PEA e, con minore potenza, anche da AEA e OEA) (Overton *et al.* 2006; Borrelli *et al.* 2009; Godlewski *et al.* 2009), entrambi proposti come nuovi recettori cannabinoidi (Brown 2007; Izzo e Sharkey 2010; McHugh *et al.* 2010).

Nonostante i ligandi dei recettori PPAR non abbiano affinità di legame per i recettori cannabinoidi (Lambert e Di Marzo 1999; Ryberg *et al.* 2005), sembrerebbe che, i cannabinoidi endogeni, alcuni loro metaboliti e alcuni cannabinoidi sintetici mostrino affinità di legame per i recettori PPAR (Kozak *et al.* 2002; Sun *et al.* 2006; Sun *et al.* 2007).

2. 4. Funzionalità biologiche di OEA e PEA legate all'attivazione dei recettori PPAR α .

OEA and PEA sono molecole lipidiche attive che svolgono diverse funzioni biologiche all'interno di sistemi omeostatici sia nel cervello che in periferia. I principali ambiti in cui sono coinvolte entrambe le molecole sono: infiammazione analgesia e regolazione del bilancio energetico.

Infiammazione ed analgesia. Sia OEA che PEA possiedono proprietà analgesiche ed antinfiammatorie (Lo Verme *et al.* 2005 a; Suardiaz *et al.* 2007). In particolare, PEA è una potente molecola antinfiammatoria che agisce probabilmente sia con meccanismo genomico che non-genomico attraverso l'attivazione di canali K⁺ ad ampia conduttanza Ca²⁺-attivati (Conti *et al.* 2002; Lo Verme *et al.* 2005 a). Inoltre, i loro ligandi sono in grado di ridurre significativamente i livelli di citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina-1 (IL-1), il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), della cicloossigenasi-2 (COX-2), e dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) (Ramanan *et al.* 2008).

PEA, rispetto a OEA, esercita potenti effetti analgesici come dimostrato in diversi modelli animali di dolore indotti con formalina (Calignano *et al.* 1998; Jaggar *et al.* 1998), solfato di magnesio (Calignano *et al.* 2001), carragenina (Conti *et al.* 2002), fattore di crescita nervoso (Farquhar-Smith e Rice 2003) e trementina (Jaggar *et al.* 1998; Farquhar-Smith e Rice 2001), inoltre ha effetti benefici anche su modelli animali di dolore neuropatico (Helyes *et al.* 2003). Si ipotizza che PEA regoli prima la nocicezione in modo rapido attraverso le sue proprietà analgesiche e in secondo luogo con azione antinfiammatoria (Calignano *et al.* 1998). PEA viene utilizzata in commercio come antinfiammatorio ed analgesico (Petrosino *et al.* 2010).

Metabolismo lipidico e comportamento nutritivo. Esperimenti di tipo farmacologico e molecolare hanno dimostrato che OEA agisce come messaggero locale nell'intestino in risposta all'ingestione di diete ricche in grassi (Fu *et al.* 2003). In particolare, OEA è definita una molecola anoressizzante, poiché favorisce la trascrizione di geni coinvolti nella lipolisi e ossidazione degli acidi grassi tramite un meccanismo PPAR α -mediato (Guzmán *et al.* 2004). Inoltre, OEA sarebbe in grado di attivare regioni cerebrali (nucleo del tratto solitario, nucleo paraventricolare ed ipotalamo) coinvolte nel controllo del comportamento nutritivo, attraverso l'attivazione di fibre nervose sensoriali periferiche (Rodríguez de Fonseca *et al.* 2001; Gaetani *et al.* 2003; Fu *et al.* 2003; 2005). Come l'OEA, anche la PEA è in grado di inibire l'assunzione di cibo (Rodríguez de Fonseca *et al.* 2001) nonché la motilità gastrointestinale (Capasso *et al.* 2001).

2.5. Nuove evidenze sperimentali sugli effetti di OEA e PEA

Recenti studi propongono un potenziale ruolo dei recettori PPAR α e dei loro ligandi endogeni nella neuroprotezione e neuroinfiammazione, nella regolazione dei cicli sonno veglia dei processi mnemonici e di apprendimento. Inoltre, è stato proposto un potenziale effetto antiepilettico/anticonvulsivante, antidepressivo, e un ruolo nella dipendenza da nicotina.

Neuroprotezione: I ligandi dei recettori PPAR α sono considerati agenti neuroprotettivi per le loro proprietà antinfiammatorie, ma anche per la loro capacità di favorire la crescita e differenziazione neuronale (Bento-Abreu *et al.* 2007; Charalampopoulos *et al.* 2008; Crupi *et al.* 2013), in ultimo per la loro capacità di stimolare la produzione di neurosteroidi (Sasso *et al.* 2010), l'espressione di fattori neurotrofici, in particolare BDNF, e di fattori anti-apoptotici (Crupi *et al.* 2013). Per tali motivi, OEA e PEA sono potenzialmente implicate in meccanismi di riparazione cerebrale in seguito ad insulti di varia natura. Infatti, aumenti nei livelli delle FAE, sono stati riscontrati in modelli animali di ischemia cerebrale: OEA e PEA hanno effetti anche sulla protezione vascolare (Bouchard *et al.* 2003; Franklin *et al.* 2003; Sheerin *et al.* 2004; Ho *et al.* 2008). È stato dimostrato che l'OEA esercita un effetto protettivo sui neuroni dopaminergici nigro-striatali in un modello animale di Parkinson, tramite attivazione dei recettori PPAR α (Esposito *et al.* 2012). Inoltre, recenti studi mostrano l'effetto neuroprotettivo di PEA PPAR α -mediato, in un modello animale di Alzheimer (D'Agostino *et al.* 2012; Scuderi *et al.* 2012).

Neuroinfiammazione: L'attivazione del recettore PPAR α sembrerebbe sopprimere la risposta infiammatoria gliale indotta dall'esposizione a LPS, un'endotossina espressa sulla membrana batterica (Lee *et al.* 2005; Xu *et al.* 2005, 2006, 2007; Paintlia *et al.* 2008 a, b).

È stato osservato che l'esposizione materna a LPS causi alterazioni nello sviluppo degli oligodendrociti del feto. Gli agonisti dei recettori PPAR α sembrerebbero prevenire tali modificazioni (Paintlia *et al.* 2008 a, b).

Antiepilettico/Anticonvulsivante: Diversi studi hanno esaminato il potenziale effetto antiepilettico di alcuni agonisti dei recettori PPAR α . In particolare è stato riportato che PEA ha azione anticonvulsivante sul modello di convulsioni massimali indotte da elettroshock (MES), e sembrerebbe avere effetto protettivo sulle convulsioni di tipo toniche, ma non di tipo clonico indotte da pentilentetrazolo (PTZ) (Lambert *et al.* 2001), anche se potrebbe aumentare la latenza all'insorgenza di episodi convulsivi di tipo clonico, senza influire sul numero di episodi nel modello del Kindling amigdaloideo (Sheerin *et al.* 2004). La PEA riduce l'insorgenza di onde-punta (SWDs) caratteristiche del modello genetico di assenze epilettiche, in parte tramite diretta attivazione del recettore PPAR α ed in parte tramite interazione con il sistema endocannabinoide (Citraro *et al.* 2013). Nello stesso studio sono state osservate variazioni nei livelli di tale agonista PPAR α , in diverse aree cerebrali coinvolte nell'insorgenza delle assenze epilettiche, suggerendo che tali alterazioni potrebbero contribuire all'insorgenza del disturbo.

Regolazione dei cicli sonno-veglia: I livelli fisiologici di PEA e OEA subiscono variazioni nell'arco delle 24 h sia nel liquido cefalorachidiano che nei tessuti di alcune aree cerebrali come il ponte, l'ippocampo e l'ipotalamo, con un andamento contrario a quello osservato per l'AEA. In particolare, durante la fase di buio, OEA e PEA mostrano livelli ridotti nel liquido cefalorachidiano, mentre aumentano nei tessuti delle aree cerebrali sopraindicate, (Murillo-Rodriguez *et al.* 2006). L'inibizione della FAAH tramite URB597, sembrerebbe determinare, durante le fasi di luce, un aumento dei livelli di OEA e PEA e

concomitante riduzione dei livelli di AEA favorendo lo stato di veglia, riducendo il sonno a onde lente e la fase di sonno REM. Lo stesso effetto viene mimato dalla diretta somministrazione di OEA e PEA durante la fase di luce (Murillo-Rodriguez *et al.* 2007). Lo stato di veglia promosso dagli agonisti endogeni PPAR α potrebbe dipendere da una regolazione dei livelli di anandamide che al contrario favorirebbe il sonno. In alternativa l'effetto di PEA e OEA potrebbe essere dovuto ad una diretta attivazione di aree cerebrali quali l'ipotalamo laterale (LH) e il nucleo dorsale del rafe (DNR), come dimostrato dagli elevati livelli di c-fos, rilevati in tali aree, e associati ad aumento dei livelli di dopamina riscontrati nel nucleus accumbens (NAc) in seguito a somministrazione di URB597, OEA e PEA nelle aree sopraindicate (Soria-Gómez *et al.* 2010; Murillo-Rodriguez *et al.* 2011).

Dipendenza: Alcuni studi hanno valutato il ruolo di PPAR α nella dipendenza da farmaci psicostimolanti (cocaina, metamphetamine, MDMA) e oppioidi (morfina). Gran parte della ricerca attuata a tale scopo si è concentrata principalmente sulla dipendenza da nicotina.

Scherma e colleghi (2008 c) hanno dimostrato che la somministrazione di URB597, sfavorisce nel ratto, l'acquisizione del comportamento di auto somministrazione di nicotina, ed il re instaurarsi di tale comportamento una volta estinto. Inoltre, sfavorisce sia l'acquisizione che il ripristino del comportamento di preferenza indotto dalla nicotina, nel modello sperimentale di Conditioned Place Preference (CPP). In accordo con i risultati ottenuti nei test comportamentali, esperimenti di microdialisi e di elettrofisiologia indicano che l'URB597 riduce i livelli di dopamina nel NAc riducendo l'attivazione dei neuroni dopaminergici dell'area ventrale tegmentale (VTA) indotta dalla nicotina, (Melis *et al.* 2008; Scherma *et al.* 2008 c). Tali effetti, sembrerebbero essere principalmente PPAR α -mediati come dimostrato dalla somministrazione dello specifico antagonista

PPAR α MK886 (Melis *et al.* 2008). Inoltre, la diretta somministrazione di agonisti PPAR α riproduce gli effetti comportamentali, elettrofisiologici e neurochimici prodotti dall'URB597, e anche in questo caso revertiti dallo MK886, indicando il diretto coinvolgimento dei recettori PPAR α (Mascia *et al.* 2011).

Funzioni cognitive: I PPAR α sono altamente espressi in ippocampo ed amigdala e quindi si pensa possano essere coinvolti nei processi di apprendimento e memoria (Moreno *et al.* 2004; Cimini *et al.* 2005). Lo studio di Mazzola e colleghi (2009) riporta che la somministrazione di URB597, sembrerebbe favorire il consolidamento mnemonico con meccanismo PPAR α -mediato. In un altro studio è stato dimostrato che la somministrazione di OEA produce effetti simili attraverso l'attivazione di strutture cerebrali da parte di segnali provenienti dalla periferia, in particolare attraverso le fibre del sistema autonomo (nervo vago) e stimolando la trasmissione noradrenergica nell'amigdala basolaterale (BLA) (Campolongo *et al.* 2009).

Antidepressivo: Dati provenienti da uno studio clinico condotto su donne depresse, ha riportato che la concentrazione sierica di PEA subisce un decremento in risposta a condizioni di stress. (Hill *et al.* 2009). Più recentemente studi preclinici dimostrano il potenziale effetto ansiolitico e antidepressivo della PEA in diversi modelli sperimentali. In particolare la somministrazione orale di PEA produrrebbe, nel topo, una significativa riduzione del tempo trascorso in immobilità quando sottoposto al test del nuoto forzato (FST) e nel test di sospensione per la coda (TST) (Yu *et al.* 2011). La somministrazione cronica della PEA sembrerebbe revertire lo stato ansioso/depresso-simile mostrato da topi sottoposti a trattamento cronico con corticosterone, in diversi test comportamentali quali il test dell'alimentazione soppressa dalla novità (NSF), il test del nuoto forzato (FST)

e il test dell'elevated plus maze (EPM). Producendo, inoltre, un affetto neurotrofico e antiapoptotico a livello ippocampale (Crupi *et al.* 2013).

2.6. La PEA nella pratica clinica

Negli ultimi anni, l'interesse della ricerca scientifica internazionale si è particolarmente concentrato sull'identificazione e lo studio di sostanze endogene di natura lipidica, dotate di potenzialità applicativa, una di queste è la palmitoiletanolamide (PEA), anche conosciuta con il nome chimico di N-(2-idrossietil) esadecanamide. La scoperta della PEA e delle sue proprietà antinfiammatorie risale agli anni '50, quando gli effetti antianafilattici ed antiflogistici legati all'assunzione di rosso d'uovo, olio di arachidi e lecitina di soia furono imputati ad una specifica frazione lipidica presente in questi alimenti e corrispondente alla PEA (Ganley *et al.* 1958; Kuehl *et al.* 1957). Successivamente, la PEA venne isolata anche dai tessuti dei mammiferi (Bachur *et al.* 1965). Gli anni che seguirono la scoperta degli effetti antinfiammatori della PEA (Benvenuti *et al.* 1968; Perlik *et al.* 1971), si assistè ad una serie di interessanti studi clinici sugli effetti farmacologici di tale composto. Alcuni di questi, riportano la capacità della PEA di ridurre la gravità e la durata dei sintomi causati dal virus influenzale nei bambini e nei soldati (Masek *et al.* 1974; Kahlich *et al.* 1979). Il successo di questi studi portò, durante la fine del 1970 nell'ex Cecoslovacchia, all'introduzione della PEA in campo clinico, nel trattamento delle malattie respiratorie acute. Dopo essere stata per diversi anni sul mercato, la PEA, fu ritirata per ragioni sconosciute, che non sembrano essere correlate a potenziali effetti di tossicità. La cessazione dell'utilizzo clinico della PEA e la mancata identificazione del suo target molecolare causò un periodo di stasi nella ricerca

delle sue proprietà farmacologiche della durata di circa 20 anni (Lo Verme *et al.* 2005). La pietra miliare della ricerca farmacologica sugli effetti della PEA è datata 1993, quando il premio Nobel per la Medicina, Rita Levi Montalcini, coniò l'acronimo ALIA (Autacoid Local Injury Antagonism), per indicare il meccanismo locale di tipo autacoide con il quale la PEA contrasta i danni tissutali causati dall'infiammazione, basato principalmente sulla regolazione della funzionalità mastocitaria (Aloe *et al.* 1993, Levi-Montalcini *et al.* 1996).

Nella clinica dermatologica veterinaria la PEA ha dato risultati promettenti nel trattamento di malattie allergiche e infiammatorie spontanee, (Noli e Miolo 2012) pertanto, ha trovato largo impiego in campo veterinario dove viene utilizzata allo scopo di ripristinare la reattività cutanea negli animali.

Dal 2007 in Italia è stato commercializzato un preparato contenente PEA conosciuto con il nome commerciale di "Normast", mentre dal 2014 si trova anche in forma pura e commercializzata come "PeaVera". Tali preparati sono stati classificati come "alimento dietetico per fini medici speciali" dalle Autorità sanitarie dell'Unione Europea in base agli standard enunciati nella DIRETTIVA 1999/21/CE DELLA COMMISSIONE. Attualmente la PEA è utilizzata in ambito medico, come dimostrato da numerosi studi clinici, oltre che per le sue proprietà antinfiammatorie anche per le sue proprietà analgesiche, nella terapia del dolore sia di tipo somatico che neuropatico (Keppel Hesselink and Hekker 2012; Ghafour *et al.* 2013; Keppel Hesselink 2013; Keppel Hesselink *et al.* 2013). Studi clinici, in particolare nel campo dermatologico umano per il trattamento di dermatiti pruriginose di varia natura, riportano risultati promettenti, indicando la PEA tra le nuove opzioni terapeutiche per il trattamento della dermatite atopica (Abramovits and Perlmutter 2006; Simpson 2010) e, più specificatamente, per il prurito (Stander *et al.*

2008; Metz *et al.* 2011). In particolare, l'uso dermatologico della PEA viene oggi considerato una valida alternativa ai corticosteroidi, in virtù dell'elevato profilo di sicurezza e del vantaggioso rapporto costo beneficio (Kircik 2010).

2.7. Ligandi sintetici dei recettori PPAR α : i fibrati

Oltre ad un'ampia gamma di ligandi endogeni, il recettore PPAR α lega anche diversi composti sintetici che comprendono ftalati, insetticidi, erbicidi, tensioattivi, solventi organici e i farmaci ipolipemizzanti come i fibrati (Issemann and Green 1990; Forman *et al.* 1997). Tali composti sono stati definiti proliferatori dei perossisomi, per la loro capacità di causare epatomegalia e proliferazione perossisomiale nel topo ma non nell'essere umano (Lee *et al.* 1995).

Alcuni composti appartenenti alla classe farmacologica dei fibrati sono: fenofibrato, clofibrato, ciprofibrato, bezafibrato e gemfibrozil ed il Wy14643. Questi farmaci sono stati sviluppati come agenti ipolipemizzanti prima della scoperta dei recettori PPARs. L'acido clofibrico e fenofibrico, cioè i metaboliti attivi di clofibrato e fenofibrato, sono definiti doppi attivatori, perché capaci di legarsi all'isoforma α e γ del recettore PPAR, con selettività 10 volte maggiore per l'isoforma α , mentre il bezafibrato attiva tutte le tre isoforme recettoriali a dosi paragonabili ai fibrati precedentemente indicati. I fibrati attivano il recettore PPAR α umano solo ad alte concentrazioni, pertanto nel tentativo di identificare composti più potenti sono stati sintetizzati una serie di composti definiti ureidofibrati (Hawke *et al.* 1997) Alcuni ureidofibrati sono: il GW2331, il GW9578 ed il GW7674 che ha dimostrato di legarsi con affinità nell'ordine della nanomoli e di avere un

miglior effetto ipolipemizzante rispetto al fenofibrato (Kliwer *et al.* 1997; Brown *et al.* 1999).

Altri composti sintetici capaci di legare il recettore PPAR α sono rappresentati dallo MK886 (Kehrer *et al.* 2001) e dal GW6471 (Xu *et al.* 2002), entrambi capaci di modulare negativamente l'attività recettoriale e utilizzati nella sperimentazione come antagonisti specifici del recettore PPAR α .

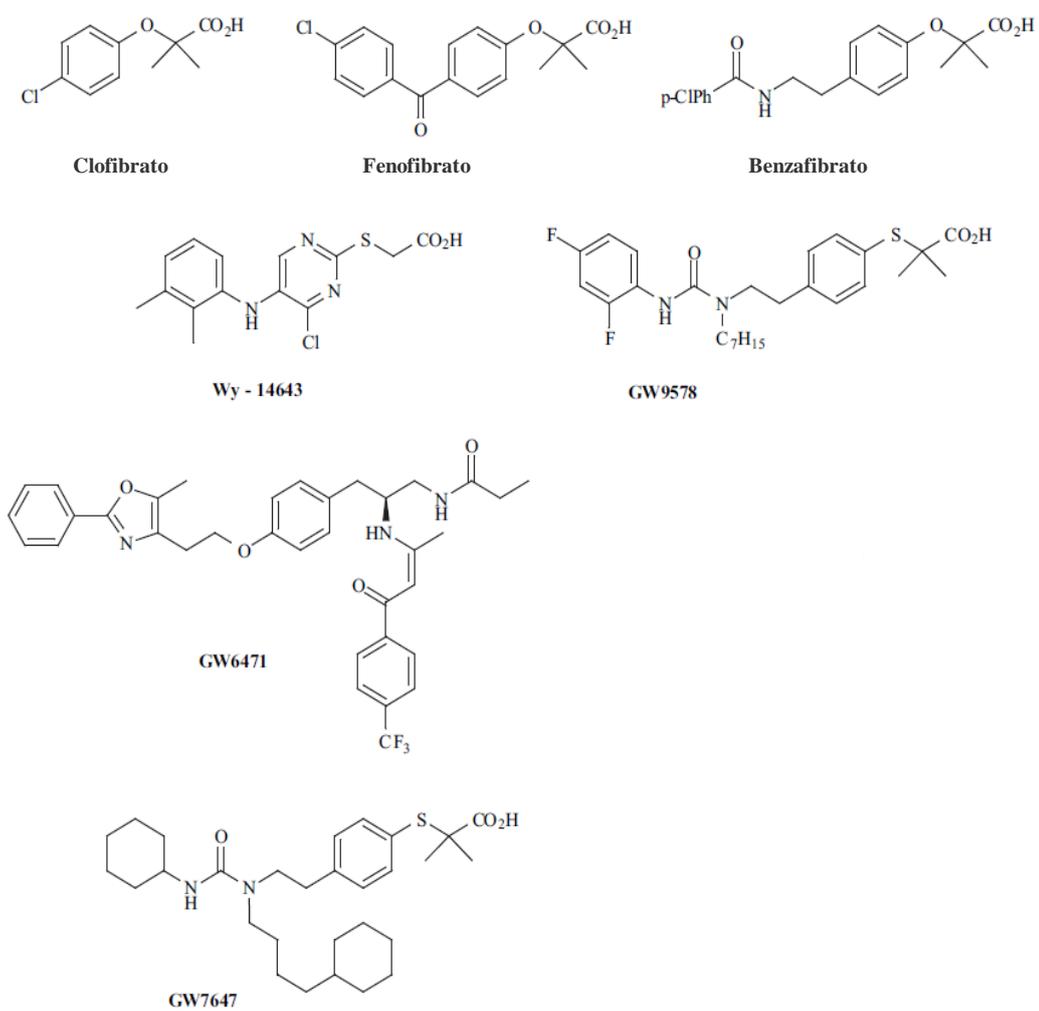


Fig. D. Struttura chimica dei principali ligandi sintetici PPAR α (Shearer e Hoekstra 2003)

2.8. Farmacologia dei ligandi sintetici dei recettori PPAR α

Dislipidemie: In seguito alla clonazione del recettore PPAR α e ed in seguito alla scoperta del meccanismo d'azione dei fibrati, si è innescata un'intensa ricerca allo scopo di delucidare il ruolo di tale recettore nel mediare gli effetti ipolipemizzanti dei fibrati (Willson *et al.* 2000).

Nell'essere umano i fibrati riducono i livelli sierici dei trigliceridi mentre aumentano i livelli del colesterolo ad alta densità (HDL), principalmente tramite l'aumento della clearance e la ridotta sintesi di lipoproteine a bassissima densità (VLDL) ricche di trigliceridi (Staels *et al.* 1998 a).

I fibrati legandosi al recettore PPAR α , modulano l'espressione di diversi geni, codificanti proteine coinvolte nel metabolismo lipidico, dotati di sequenze PPARE a livello del promotore. Tramite questo meccanismo viene regolata negativamente l'espressione dell'apolipoproteina C-III (Hertz *et al.* 1995), un noto inibitore della clearance di VLDL (Shepherd 1994) sia nell'uomo (Malmendier *et al.* 1989) che nei roditori (Staels *et al.* 1995), diminuendo in tal modo i livelli di colesterolo a bassa densità (LDL). Altre sequenze PPARE sono state identificate nei promotori dei geni codificanti per: AOX (Dreyer *et al.* 1992), citocromo P-450 A4 (Palmer *et al.* 1994), la proteina epatica legante gli acidi grassi (L-FBP) e la lipoproteina lipasi (LPL) (Schoonjans *et al.* 1996 a, b) e di altre due proteine coinvolte nella sintesi dell'HDL come l'apolipoproteina A-I e A-II (Willson *et al.* 2000).

Nell'uomo i fibrati promuovono l'espressione di Apo A-I, con conseguente aumento di HDL, che svolge un ruolo fisiologico molto importante, poiché è deputato alla rimozione del colesterolo dai tessuti periferici e della sua conduzione verso il fegato tramite un processo definito "trasporto inverso del colesterolo". I fibrati accelerano il trasporto del

colesterolo, dalla periferia al fegato non solo aumentando i livelli di HDL circolanti, ma anche promuovendo l'espressione vascolare dei suoi recettori (ABC-1) e (SR-BI) (Fournier *et al.* 2013).

Aterosclerosi: Alterazioni nell'omeostasi del metabolismo lipidico rappresentano uno dei principali fattori di rischio delle patologie cardiovascolari (Grundy 1998).

È stato dimostrato che i fibrati sono in grado di rallentare la formazione delle placche aterosclerotiche e ridurre il numero di eventi coronarici in studi di prevenzione secondaria (Oliver *et al.* 1984; Ericsson *et al.* 1997; Rutolo *et al.* 1998) e in pazienti con normali livelli di colesterolo LDL (Rubins *et al.* 1999). Pertanto è stato proposto un impiego di tali farmaci nella terapia dell'aterosclerosi. Inoltre, emergenti prove suggeriscono che gli agonisti PPAR α possono avere effetti diretti sulla parete arteriosa, che potrebbero contribuire agli effetti benefici, prodotto da questi farmaci negli studi di prevenzione dell'aterosclerosi (Oliver *et al.* 1984; Ericsson *et al.* 1997; Rutolo *et al.* 1998; Rubins *et al.* 1999). La Formazione della lesione aterosclerotica richiede il reclutamento dei monociti nella parete arteriosa mediante l'espressione di proteine di adesione, da parte delle cellule endoteliali attivate (Libby *et al.* 1999). L'espressione della molecola di adesione VCAM-1 viene regolata negativamente dagli agonisti PPAR α in cellule dell'endotelio vascolare (Marx *et al.* 1999). Questo processo viene mediato in parte dall'inibizione della proteina NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), un fattore di trascrizione ubiquitario che trasduce gli effetti di molti fattori proaterogeni e infiammatori (Thurberg e Collins 1998). Alcuni agonisti PPAR α hanno dimostrato di inibire il rilascio di IL-1, IL-6 e prostaglandine infiammatorie in cellule muscolari lisce (Staels *et al.* 1998 b).

Obesità: L'obesità rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo del diabete, a tal proposito è stato riportato che il trattamento con fibrati sembrerebbe ridurre l'aumento di peso corporeo nei roditori, probabilmente attraverso la regolazione del consumo energetico e del catabolismo degli acidi grassi. L'espressione di geni coinvolti in questi processi, è stato dimostrato, essere indotta dal bezafibrato (Cabrero *et al.* 1999), Wy-14643 (Krook *et al.* 1998), e da altri agenti (Brooks *et al.* 2001; Etgen *et al.* 2002).

2.9. Nuove evidenze sperimentali sulla farmacologia dei ligandi sintetici dei recettori

PPAR α

Alcuni agonisti dei recettori PPAR α , come i fibrati, sono farmaci consolidati e clinicamente utilizzati nel trattamento di disturbi del metabolismo lipidico. I loro effetti centrali sono considerati trascurabili a causa della loro scarsa capacità di attraversare la barriera ematoencefalica (Melis *et al.* 2008). Tuttavia, una serie di studi si è proposta di valutare gli effetti farmacologici dei fibrati in particolare su alcuni processi come la neuro infiammazione e la dipendenza da nicotina. Inoltre, ne è stato valutato il potenziale effetto anticonvulsivante.

Anticonvulsivante: Come prima discusso per gli agonisti endogeni dei recettori PPAR α anche alcuni agonisti sintetici ed in particolare il fenofibrato esercitata effetti anticonvulsivanti in diversi modelli animali (Porta *et al.* 2009; Puligheddu *et al.* 2013).

Neuroinfiammazione: Diversi studi riportano che anche l'attivazione dei recettori PPAR α , da parte di agonisti sintetici, sopprime le risposte infiammatorie gliali indotte da LPS. (Lee *et al.* 2005; Xu *et al.* 2005, 2006, 2007; Paintlia *et al.* 2008 a, b). Inoltre, è stato osservato

che l'alterazione nello sviluppo degli oligodendrociti, nel cervello fetale, causato dall'esposizione materna alla tossina batterica LPS, sia prevenuta dall'attivazione di PPAR α . (Paintlia *et al.* 2008 a, b). In particolare uno studio riporta che la somministrazione sistemica di Wy-14643 e fenofibrato sono in grado di aumentare l'attivazione dei recettori PPAR α a livello cerebrale. La somministrazione di LPS a livello cerebrale riduce i livelli di mRNA codificante per il recettore PPAR α e aumenta i livelli di molecole proinfiammatorie (TNF α , IL-1, IL-6, iNOS, and COX-2) e di mRNA per proteine di adesione cellulare (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1). Tale effetto viene revertito dalla somministrazione sistemica di Wy-14643 e fenofibrato (Wang and Namura 2011).

Dipendenza da nicotina: Nello studio di Panlilio e colleghi (2012) sono stati valutati gli effetti del clofibrato sulle proprietà gratificanti della nicotina. Tale studio riporta che il clofibrato blocca gli effetti gratificanti della nicotina, riduce l'assunzione di nicotina inibendo il comportamento di auto-somministrazione, contrastata gli effetti della ricaduta sia in seguito a riesposizione alla nicotina che a stimoli nicotina-associati. L'effetto indotto dal clofibrato sembrerebbe essere PPAR α -mediato come dimostra dal pretrattamento con lo specifico antagonista del recettore PPAR α , MK886. Inoltre, studi di elettrofisiologia riportano che l'attivazione dei recettori PPAR α mediata sia da agonisti endogeni che sintetici (clofibrato e Wy14643) ridurrebbe l'attivazione dei neuroni dopaminergici in VTA indotta da nicotina, con conseguente riduzione del rilascio di dopamina nel NAc, da parte di questi ultimi (Melis *et al.* 2008, 2010; Mascia *et al.* 2011; Panlilio *et al.* 2012). Tali risultati suggeriscono che i farmaci fibrati potrebbero essere utili per il trattamento della dipendenza da tabacco.

2.10. I fibrati nella pratica clinica

La scoperta dell'azione ipolipemizzante dei fibrati risale ai primi anni '60. Tra i composti appartenenti a tale classe farmacologica il clofibrato risultava essere il composto più efficace nel ridurre i livelli di colesterolo e altri lipidi nel plasma e nel fegato dei ratti da laboratorio. Seguirono i primi risultati in vivo su pazienti ipercolesterolemici, nei quali si era ottenuto un abbassamento dei livelli plasmatici di colesterolo e trigliceridi (Oliver 1962). Nel 1967 il clofibrato ricevette l'autorizzazione all'immissione in commercio sul mercato statunitense da parte della FDA. e in breve tempo, divenne il farmaco ipolipemizzante più prescritto (Brunton *et al.* 2010), prima dell'introduzione delle statine. Alla fine degli anni '70 vennero diffusi i risultati di un vasto studio clinico organizzato dall'OMS, dai quali risultava che, nonostante un abbassamento nei livelli di colesterolo ematico, il trattamento con clofibrato non riduceva gli eventi cardiovascolari fatali. Inoltre, il trattamento con clofibrato sembrava essere significativamente correlato all'insorgenza di calcoli biliari (Bateson *et al.* 1978). La pubblicazione di questi dati fece sì che il clofibrato venisse eliminato dalla pratica clinica.

All'inizio degli anni '80 fu introdotto in terapia in tutti i principali paesi industrializzati il gemfibrozil e a seguire il fenofibrato.

Uno studio di prevenzione primaria con gemfibrozil, condotto su oltre 4.000 uomini di mezza età conferma una significativa riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi e LDL con concomitante aumento di HDL (Frick *et al.* 1987). Inoltre, tale studio riportava una riduzione dell'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori associata al trattamento. Nel 2002 il clofibrato è stato ritirato dal mercato a causa del rapporto rischio/beneficio non più favorevole.

Uno studio di meta-analisi ha osservato come i fibrati possano essere utili nella prevenzione degli eventi cardiovascolari maggiori in pazienti con dislipidemia mista, nei quali il trattamento con statine non è soddisfacente (Jun *et al.* 2010). L'utilizzo dei fibrati è stato quindi proposto nell'ambito della medicina personalizzata (Staels 2010).

3. Ansia e Depressione

La depressione, nella sua forma unipolare o bipolare, è un disturbo dell'umore a carattere cronico, ricorrente, e disabilitante che produce conseguenze psico-fisiche e socio-economiche gravi (Kupfer *et al.* 2012). Essa colpisce circa 350 milioni di persone in tutto il mondo (Marcus *et al.* 2013). Dati epidemiologici suggeriscono che la depressione colpisce più frequentemente le donne e rappresenta la principale causa di disabilità (Kessler *et al.* 2007, 2012; Marcus *et al.* 2013) poiché altera la sfera emozionale, motivazionale, le funzioni cognitive, ma anche l'equilibrio dei sistemi neurovegetativo, immunitario e infiammatorio dell'organismo.

La depressione è considerata una malattia psichiatrica eterogenea poiché ogni paziente sviluppa in modo soggettivo la sintomatologia del disturbo, tale complessità è spesso causa della difficoltà nella classificazione del disturbo. Il DSM-IV definisce i criteri per categorizzare tale patologia la cui sintomatologia deve comprendere: umore depresso o irritabile, anedonia, aumento o perdita di peso rilevante, alterazione dei cicli sonno veglia, agitazione o il ritardo psicomotorio, fatica o perdita di energia, sentimenti di auto svalutazione e senso di colpa eccessivo, diminuzione delle capacità di attenzione e concentrazione, pensieri ricorrenti di morte o di suicidio. In particolare, umore depresso e

anedonia sono i sintomi essenziali per riconoscere e diagnosticare un episodio depressivo (American Psychiatric Association 2000).

Il trattamento farmacologico attualmente disponibile per la terapia della depressione si basa principalmente su farmaci che aumentano i livelli sinaptici di monoamine (Papakostas 2010). Anche questa nella maggior parte dei pazienti, produce effetti benefici, si stima che meno di un terzo dei pazienti depressi raggiunge remissione e solo i due terzi risponde dopo l'assunzione di più farmaci antidepressivi (Rush *et al.* 2006; Trivedi *et al.* 2006). Spesso, sintomi depressivi residui, deficit cognitivi, compromissione funzionale, e aumento della frequenza delle recidive sono presenti in pazienti depressi unipolari e bipolari trattati correttamente (Coppola e Mondola 2014).

Studi preclinici e clinici hanno fornito una visione-modello sulla patofisiologia della depressione. Ad oggi è noto che la complessità sintomatologica della depressione riflette non solo il coinvolgimento di diversi sistemi neurotrasmettitoriali, ma anche molteplici processi biochimici, fattori neurotrofici e aree cerebrali. Evidenze scientifiche hanno dimostrato una relazione tra depressione e disregolazione dell'asse HPA e quindi della produzione di glucocorticoidi, alterazioni funzionali e strutturali delle strutture corticali e subcorticali aumentati livelli ematici di citochine proinfiammatorie, fattore di necrosi tumorale ("tumor necrosis factor alpha" TNF- α), ed interleuchina 6 (IL-6), (Ambrogini *et al.* 2002; Nestler *et al.* 2002 a, b; Chourbaji *et al.* 2006; Duman e Monteggia 2006; Dowlati *et al.* 2010; Palazidou 2012). Da tempo è riconosciuta una stretta correlazione non solo tra depressione e altri disturbi psichiatrici, in particolare con l'ansia (Hirschfeld 2001), ma anche con diverse condizioni mediche croniche come l'artrite e il diabete (Moussavi *et al.*

2007), non solo, anche con patologie cardiovascolari e aterosclerosi (Seldenrijk *et al.* 2011).

3.1. Modelli animali per lo studio dell'ansia e della depressione

I modelli animali costituiscono la spina dorsale della ricerca pre-clinica sulla neurobiologia dei disturbi psichiatrici. Tali modelli sono impiegati come strumenti di screening per la caratterizzazione di nuovi agenti terapeutici e simulazioni per gli studi sui meccanismi sottostanti gli effetti farmacologici di tali agenti.

3.2. Modelli animali di depressione

I modelli animali di depressione indotti da condizionamento ambientale si basano sulla valutazione quantitativa del "comportamento di disperazione e sfiducia acquisita" vale a dire della risposta negativa che segue all'eccitazione da stress, paragonabile allo scoraggiamento profondo di alcuni stati depressivi umani.

Il test del nuoto forzato è il modello più utilizzato per valutare l'efficacia di farmaci antidepressivi, grazie alla sua buona validità predittiva. Questo modello si basa sull'osservazione dell'animale che, forzato, a nuotare in un cilindro ricolmo d'acqua, inizialmente cerca una via di fuga e poi, una volta rassegnato all'impossibilità di fuga, si lascia galleggiare immobile. L'immobilità è interpretata come rinuncia della ricerca di una via di fuga. I farmaci antidepressivi hanno la capacità di ridurre tale comportamento (Porsolt *et al.* 1977 a, b). Il test si effettua in due fasi: la fase di training, allo scopo di indurre il comportamento di disperazione, seguita, dopo 24 ore, dalla fase di test, che avviene eseguendo la medesima procedura. Il modello della learned helplessness, o

sfiducia acquisita, è concettualmente simile al test del nuoto forzato. Anche questo test si compone di due fasi: la fase di induzione dello stress durante la quale l'animale viene posto in un apparato dotato di griglia pavimento dal quale riceve scosse elettriche, associate all'impossibilità di fuga. In modo sviluppa un deficit nel comportamento di evitamento. Quando l'animale, nella seconda fase del test, riceve le scosse, ma gli viene data la possibilità di scappare, compirà meno fughe rispetto al gruppo di controllo. I farmaci antidepressivi migliorano la performance degli animali stressati in questo paradigma (Seligman e Maier 1967).

Il modello da stress cronico variato prevede l'induzione di uno stato anedonico-depresso in seguito a fattori stressogeni blandi ma continui, differenti tra loro, per diverse settimane. Lo stato edonico viene successivamente misurato in seguito a valutazione della preferenza di una soluzione di saccarosio (molto gradita all'animale in condizioni normali), rispetto al gruppo controllo. I farmaci antidepressivi sono in grado di revertire l'anedonia in questo test (Willner 2005).

3.3. Modelli animali d'ansia

Gran parte dei modelli animali d'ansia si basano sul concetto che i farmaci ansiolitici disinibiscono un comportamento che si presume sia soppresso dalla paura.

Il test più semplice è quello del "open-field" in cui viene valutata l'attività motoria spontanea dell'animale durante il suo comportamento esploratorio all'interno di uno spazio sconosciuto, un'arena, in cui è libero di muoversi (Blumstein e Crawley 1983). Tuttavia, l'attività esploratoria in questo test potrebbe essere modificata, oltre che da

farmaci con proprietà ansiolitiche, anche da farmaci stimolanti per cui la valutazione comportamentale potrebbe di difficile analisi. I test di emersione sono test largamente utilizzati nelle neuroscienze comportamentali. In questo tipo di paradigma vengono misurati il numero di attraversamenti da una zona ritenuta sicura ad una ritenuta pericolosa. Uno di questi test è “light e dark box” in cui l’animale ha la possibilità di passare da uno scompartimento illuminato a quello buio, il numero degli attraversamenti viene aumentato dagli ansiolitici (Crawley *et al.* 1984). Anche il risultato di questo test potrebbe essere alterato da farmaci stimolanti (Carey e Fry 1988). Il test di emersione più utilizzato per lo studio del profilo farmacologico di molecole potenzialmente ansiolitiche è quello del “elevated plus maze”, che si avvale dell’utilizzo di un apparato sollevato dal suolo, composto di due corridoi, uno aperto ed uno chiuso, disposti in croce, che formano dei bracci. I farmaci ansiolitici, ma non gli stimolanti e gli antidepressivi aumentano il tempo trascorso nei bracci aperti. Per questo motivo esso presenta una buona validità predittiva ed è considerato un buon modello per la valutazione dell’ansia (Pellow *et al.* 1985, 1986).

Alcuni modelli animali d’ansia si basano sulle interazioni sociali. Il più comune tra questi è il test di interazione sociale nel quale l’interazione sociale tra una coppia di conspecifici dello stesso sesso è soppressa dalla loro immissione in un ambiente non familiare, da un ambiente sottoposto ad una luce abbagliante, o da entrambe le condizioni: gli ansiolitici sono efficaci nell’aumentare il livello di interazioni in queste condizioni (File e Hyde 1978; Guy e Gardner 1985).

4. Implicazioni dei recettori PPAR α nell'ansia e nella depressione

È stato osservato che l'inibizione della FAAH dopo somministrazione di URB597, potrebbe influenzare l'umore e le emozioni. Infatti, alcuni studi riportano che l'URB579 produce effetti antidepressivi in diversi modelli animali come, il test di nuoto forzato ed il test di sospensione per la coda nel topo (Gobbi *et al.* 2005). Lo stesso effetto antidepressivo è stato riscontrato nei ratti dopo stress cronico (chronic mild stress) e dopo valutazione al test di assunzione del saccarosio (Bortolato *et al.* 2007). Inoltre, l'URB579 sembrerebbe possedere anche un effetto ansiolitico (Scherma *et al.* 2008). L'effetto antidepressivo indotto dall'inibizione della FAAH, è associato ad un aumento dei livelli degli endocannabinoidi AEA e PEA in aree cerebrali strettamente correlate alla regolazione dell'umore e delle emozioni quali, la corteccia prefrontale, l'ippocampo ed il nucleo dorsale del rafe. Esperimenti di microdialisi in animali di laboratorio dimostrano che l'aumento dei livelli di AEA e PEA favorirebbe il rilascio di monoammine, in particolare di serotonina nel nucleo del rafe e di noradrenalina nel locus coeruleus. Lo stesso studio riporta che gli effetti comportamentali e quelli neurochimici dovuti alla somministrazione dell' URB597 vengono revertiti dall'antagonista cannabinoide SR141716A e sarebbero pertanto da ricondurre ad un effetto esclusivamente legato dall'aumento di AEA (Gobbi *et al.* 2005).

In uno studio clinico donne affette da depressione maggiore presentano variazioni nei livelli ematici di etanolamidi quando sottoposte a situazioni di stress (Hill *et al.* 2009).

Più recentemente studi preclinici ipotizzano un potenziale coinvolgimento del recettore PPAR α e dei suoi ligandi endogeni nei disturbi dell'umore. In particolare la somministrazione di PEA indurrebbe effetti antidepressivi e ansiolitico-simili in diversi

modelli sperimentali nell'animale di laboratorio (Yu *et al.* 2011; Crupi *et al.* 2013). Nello studio di Yu e colleghi (2011) la somministrazione di PEA per via orale in un regime di trattamento sub-cronico, produce un effetto antidepressivo su topi sottoposti al test del nuoto forzato e al test di sospensione per la coda. Tale effetto è osservabile come riduzione del tempo trascorso in immobilità e paragonabile a quello prodotto dall'antidepressivo di riferimento, la fluoxetina. In accordo con tali risultati la somministrazione di PEA in regime di trattamento cronico sembrerebbe revertire lo stato ansioso/depresso-simile mostrato da topi sottoposti a trattamento cronico con corticosterone, in diversi test comportamentali quali il test dell'alimentazione soppressa dalla novità, il test del nuoto forzato e il test dell'elevated plus maze. Nello stesso lavoro dati d'immunoistochimica evidenziano che a livello ippocampale la PEA favorisce la proliferazione neuronale, la formazione di nuove spine dendritiche e in ultimo aumenta l'espressione del fattore neurotrofico BDNF e del fattore anti-apoptotico Bcl-2, riducendo infine l'espressione del fattore pro-apoptotico Bax (Crupi *et al.* 2013).

Studi preliminari condotti nei nostri laboratori, non ancora pubblicati, ma oggetto di precedente tesi, riportano l'effetto antidepressivo prodotto da entrambi gli agonisti endogeni PPAR α , PEA e OEA, su ratti sottoposti al test del nuoto forzato. Tale effetto antidepressivo sembrerebbe essere dose dipendente e paragonabile a quello indotto dall'antidepressivo di riferimento, il triciclico amitriptilina e significativamente revertito da MK886, specifico antagonista del recettore PPAR α , sottolineando un meccanismo sicuramente mediato dai recettori PPAR α .

Ad oggi, nessuno studio si è occupato di analizzare il possibile effetto antidepressivo degli agonisti endogeni PPAR α o alterazioni nell'espressione o nella funzionalità di tale recettore in pazienti affetti da depressione.

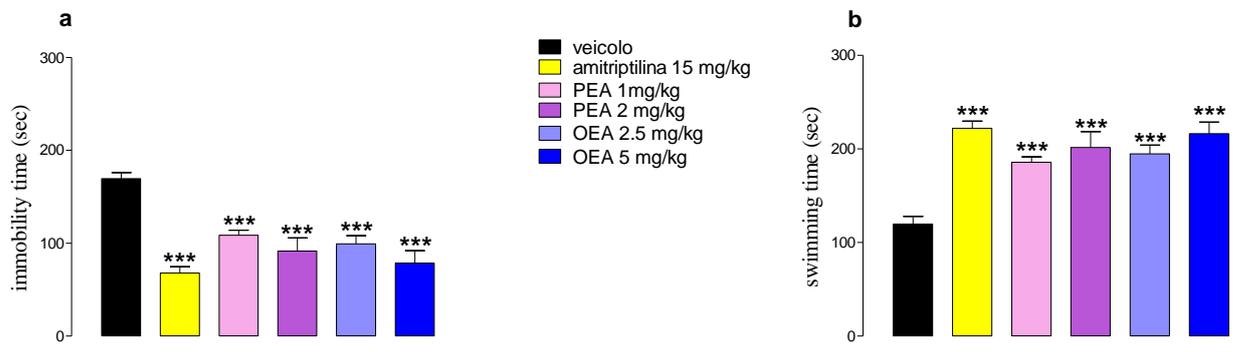


Fig. E. Effetto antidepressivo-simile degli agonisti endogeni PPAR α , OEA e PEA nel test del nuoto forzato (a) immobility, (b) swimming.

OBIETTIVI

I fibrati agonisti sintetici dei recettori PPAR α sono farmaci che sono stati sviluppati come agenti ipolipemizzanti ancor prima dell'identificazione degli stessi recettori PPARs. Pertanto gran parte della letteratura relativa ai fibrati si concentra principalmente sui loro effetti a livello del metabolismo lipidico e sul potenziale ruolo nella terapia delle patologie cardiovascolari (Staels *et al.* 2008). A causa della loro scarsa capacità di attraversare la barriera emato-encefalica, i loro effetti centrali sono stati da sempre considerati trascurabili. Di conseguenza ad oggi non sono presenti in letteratura dati che riferiscano effetti farmacologici centrali degli agonisti sintetici ed il diretto coinvolgimento dei recettori PPAR α in patologie proprie della sfera emotiva ed umorale.

Scopo di questa tesi è stato quello di valutare con un approccio di tipo comportamentale gli effetti farmacologici della somministrazione sistemica di un agonista sintetico dei recettori PPAR α della classe dei fibrati, il clofibrato.

Gli studi sono stati condotti tramite una serie di test sperimentali su ratti maschi adulti del ceppo Sprague Dawley. Come primo approccio è stato caratterizzato quale potesse essere l'effetto della somministrazione di clofibrato sull'attività motoria degli animali, in modo da escludere dagli esperimenti successivi le dosi che inducessero effetti aspecifici nel comportamento animale. Il possibile profilo antidepressivo del clofibrato è stato valutato mediante il test del "nuoto forzato" in paragone a due differenti antidepressivi di riferimento, il triciclico amitriptilina e l'SSRI fluoxetina. Lo specifico coinvolgimento del recettore PPAR α è stato investigato tramite il pretrattamento con l'antagonista specifico, lo MK886 mentre il potenziale coinvolgimento del sistema endocannabinoide con la somministrazione dell'antagonista/agonista inverso dei recettori CB1, SR141617A. Allo

stesso modo è stato indagato il coinvolgimento del recettore PPAR α e del sistema endocannabinoide nella mediazione degli effetti comportamentali dei due farmaci antidepressivi di riferimento. In ultimo, si è valutata la possibile interazione farmacologica tra il clofibrato e ciascuno dei due farmaci antidepressivi di riferimento nello stesso modello utilizzato per valutare l'attività antidepressiva dei singoli farmaci.

Successivamente, l'effetto antidepressivo del clofibrato e dell'endogeno PEA è stato analizzato anche dopo trattamento cronico in paragone a quello della fluoxetina.

Si è proseguito con un'analisi del possibile profilo ansiolitico sia del clofibrato che della PEA con l'utilizzo del test comportamentale di "interazione sociale" e del "elevated plus maze", con diversi regimi di trattamento.

MATERIALI E METODI

1.1. Animali

Sono stati utilizzati ratti maschi adulti del ceppo Sprague Dawley (Harlan, Italia), del peso di 280-300 gr. al momento della sperimentazione. Gli animali sono stati stabulati quattro per gabbia e mantenuti ad un regolare ciclo luce/buio di 12 h (7:00 – 19:00), in condizioni ambientali di temperatura ed umidità standard ($T= 21\pm 2$ °C; $U= 60\%$) con libero accesso ad acqua e cibo. I test comportamentali sono stati condotti durante il periodo di luce.

Prima di ciascun test, gli animali, sono stati sottoposti ad abitramento (1 ora) delle condizioni ambientali nelle stanze di sperimentazione.

Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico per la tutela degli Animali di Laboratorio e condotti nel rispetto delle normative vigenti in materia E.C. Regulations for Animal Use in Research (CEE No. 86/609, DL 27.01.1992).

1.2. Farmaci utilizzati nei test comportamentali

Le soluzioni di farmaci sono state preparate prima di ogni test.

I farmaci utilizzati nel nostro studio sono stati i seguenti:

- PEA (Abcam, UK): 1, 2 mg/kg disciolta in 5% Tween 80 e 95% soluzione salina, somministrata 10 minuti prima dei test.
- Clofibrato (Tocris, UK): 12.5, 25, 50, 100 mg/kg disciolta in 10% Tween 80, 20% DMSO e 70% acqua distillata, somministrata 1 ora prima dei test.

- MK886 (Tocris, UK): 1 mg/kg disciolta in 10% Tween 80, 20% DMSO e 70% acqua distillata, somministrata 1 ora prima dei test.
- SR141716A (Rimonabant) (Sanofi Aventis): 1 mg/kg disciolta in 5% di Tween 80 e 95% soluzione salina, somministrata 30 minuti prima dei test.
- Fluoxetina (Eli Lilly & Co USA): 2, 5mg/kg diluita in soluzione salina e somministrata 30 minuti prima del test.
- Amitriptilina (Roche, UK): 0.3, 15, mg/kg diluita in soluzione salina e somministrata 1 ora prima del test.

Entrambi gli antidepressivi sono stati utilizzati come farmaci di riferimento negli esperimenti sulla depressione.

1.3. Gruppi sperimentali e trattamenti farmacologici

Per il nostro studio tutti i farmaci sono stati somministrati per via intraperitoneale (i.p.), seguendo tre diverse tipologie di trattamento:

- Trattamento acuto: una singola somministrazione del farmaco è avvenuta prima del test in base al tempo di somministrazione di ciascun farmaco come in precedenza indicato.
- Trattamento subacuto: tre somministrazioni consecutive del farmaco nell'arco di ventiquattro ore. In particolare 24 e 4 ore prima del test, l'ultima somministrazione anticipa il test in relazione al tempo di somministrazione di ciascun farmaco.

- Trattamento cronico: una singola somministrazione giornaliera per un periodo di 14 giorni consecutivi.

1.4. Test comportamentali

1.4.1. Test dell'attività motoria: apparato e procedura

Il test dell'attività motoria è stato condotto seguendo il protocollo di Spano *et al.* 2012. Gli animali sono stati randomizzati nei diversi gruppi sperimentali e testati in gabbie operanti tramite l'apparecchio Digiscan Animal Activity Analyser (Omnitech Eletronics, Columbus, USA). Ogni gabbia (42 x30 x 60 cm) è dotata di due set di 16 fotocellule localizzate nei quattro lati della gabbia, ad una distanza di 2.5 cm l'una dall'altra che emettono raggi infrarossi in senso orizzontale e verticale (4 e 12 cm dal pavimento della gabbia).

Ogni animale, in seguito a trattamento, è stato posizionato individualmente all'interno della gabbia sperimentale.

Sono stati valutati i seguenti parametri:

-*attività orizzontale*: numero totale d'interruzioni di emissione dei raggi infrarossi, captate dai sensori orizzontali;

-*attività verticale*: numero totale d'interruzioni di emissione dei raggi infrarossi, captate dai sensori verticali;

-*attività al centro e ai margini*: numero totale d'interruzioni di emissione dei raggi infrarossi, captate dai sensori agli angoli, quando l'animale si trova ad una distanza di 8 e 2 cm (centro e margini, rispettivamente) dai margini della gabbia.

Tutti i parametri sono stati registrati per un periodo complessivo di 60 minuti a partire dal momento di posizionamento dell'animale nella gabbia sperimentale. In particolare, sono stati valutati; la curva temporale (valori raccolti ad intervalli di 10 minuti) e le conte cumulative (media della somma dei valori valutati ogni 10 minuti per un totale di 60 min, per animale, per gruppo, all'interno dell'intera sessione). Tra una sessione e la successiva le pareti dell'apparato venivano pulite con H₂O₂ in modo da limitare ogni possibile traccia olfattiva.

Il test dell'attività motoria è stato utilizzato per valutare l'effetto sia del trattamento acuto con clofibrato (12.5, 25, 50, 100 mg/kg) che del trattamento cronico con PEA (1 mg/kg) e con clofibrato (25 mg/kg).

1.4.4. Test del nuoto forzato: apparato e procedura

Il test è stato condotto utilizzando cilindri trasparenti in plexiglas (20 cm diametro × 40 cm altezza) contenenti 40 cm di acqua (in modo che l'animale non potesse sostenersi poggiando la coda al fondo del cilindro) ad una temperatura 25°C ± 2°C, costringendo l'animale, a nuotare senza via di fuga. Gli animali sono stati randomizzati nei gruppi sperimentali. L'esperimento si è svolto in due fasi: training e test. La fase di training, della durata di 15 minuti (giorno 1) si svolge 24 ore prima del test. Subito dopo l'animale viene accuratamente asciugato dall'operatore e riceve la prima somministrazione di farmaco e riposto nella stanza di stabulazione. Gli animali ricevono la seconda somministrazione di farmaco (giorno 2) 4 ore prima del test e la terza poco prima del test, in base ai tempi di somministrazione dei farmaci. Il test che viene condotto nelle medesime condizioni della fase di training, consiste nell'osservare per 5 minuti gli animali, da una stanza esterna

tramite sistema di videocamere digitali e rispettivo software (Anymaze Software, Stoelting). Nel test del nuoto forzato, i roditori, che sono forzati a nuotare in uno spazio ristretto e senza via di fuga, dopo un iniziale periodo di ipermotilità, assumono una postura immobile, e si muovono solo per mantenere il capo fuori dall'acqua per risparmiare energie. Il significato della postura di "immobilità o galleggiamento" indica un comportamento di rassegnazione in una situazione di forte stress, anche noto come "comportamento di disperazione". La procedura del test del nuoto forzato è ampiamente descritta in letteratura (Porsolt *et al.* 1977 a, b, 1978; Detke e Lucki 1996; Rénéric e Lucki 1998) ed in particolare in questa tesi è stato utilizzato il protocollo descritto da Castagné e colleghi (2011) con qualche modifica.

Sono stati valutati i seguenti parametri:

-*Immobility*: tempo in secondi (sec) trascorso dall'animale nello stare immobile/galleggiare nell'acqua facendo minimi movimenti con le zampe anteriori in modo da mantenere il capo sopra il livello dell'acqua;

-*Swimming*: tempo (sec) trascorso dall'animale in movimenti orizzontali sulla superficie d'acqua;

-*Climbing*: tempo (sec) trascorso dall'animale in movimenti verticali contro le pareti del cilindro.

Tramite l'ausilio di tale test sono stati valutati gli effetti farmacologici legati alla somministrazione subacuta del clofibrato (12.5, 25 mg/kg) in relazione all'effetto farmacologico indotta da due antidepressivi utilizzati nella pratica clinica quali l'amitriptilina (15 mg/kg) e la fluoxetina (5 mg/kg). Il possibile coinvolgimento dei

recettori PPAR α e del recettore CB1, nell'effetto antidepressivo-simile del clofibrato (25 mg/kg), della fluoxetina (5 mg/kg) e dell'amitriptilina (15 mg/kg), è stato indagato tramite l'ausilio dello specifico antagonista MK886 (1 mg/kg) dell'antagonista/agonista inverso CB1 SR141716A (1 mg/kg). Inoltre, è stata valutata la capacità del clofibrato (12.5mg/kg) di potenziare l'effetto antidepressivo della fluoxetina (2 mg/kg) o dell'amitriptilina (0.3 mg/kg). In ultimo, tale test è stato utilizzato allo scopo di valutare gli effetti farmacologici indotti dal trattamento cronico con la PEA (1 mg/kg) e con il clofibrato (25 mg/kg) in relazione a quelli indotti della fluoxetina (5 mg/kg).

1.4.2. Elevated plus maze: apparato e procedura

L'elevated plus maze è un test comportamentale basato sul conflitto provato dall'animale, tra il naturale comportamento esplorativo di un nuovo ambiente e l'innata avversione per le condizioni ambientali presentate dallo stesso. L'apparato è composto da due bracci chiusi sul perimetro da pareti scure (50 cm x 10 cm x 40 cm) e due aperti (50 cm x 10 cm), che si estendono in direzione opposta da una piattaforma centrale comune (10 cm x 10 cm) per formare una struttura a croce. L'intero apparato è sollevato 50 cm dal pavimento.

Il test ha avuto inizio con il posizionamento dell'animale nella zona centrale dell'apparato, con il capo rivolto verso un braccio aperto. Gli animali sono stati lasciati liberi di esplorare l'apparato e il loro comportamento è stato osservato per 5 minuti, da una stanza esterna di monitoraggio, tramite videocamere digitali e rispettivo software (Anymaze Software, Stoelting). Gli animali sono stati randomizzati nei gruppi sperimentali e testati individualmente. Sono state considerate come entrate nei bracci le volte in cui l'animale

attraversava il bordo del braccio (in entrata) con il 90% del suo corpo. Tra una sessione e la successiva l'apparato è stato pulito con H₂O₂ in modo da eliminare ogni possibile traccia olfattiva.

Nell'elevated plus maze il comportamento naturale dell'animale si manifesta con una riduzione dei movimenti e con la preferenza a permanere nei bracci chiusi (Pellow *et al.* 1985, Treit *et al.* 1993, Rodgers *et al.* 1997, Carobrez *et al.* 2005). L'ansia accentua questo comportamento mentre, una riduzione dello stato ansioso, si riscontra con l'aumento sia del tempo speso dall'animale nei bracci aperti sia del numero di entrate nei bracci aperti. Il numero totale delle entrate nei bracci e il numero delle entrate nei bracci chiusi sono un indice del tipo attività motoria spontanea (Hogg *et al.* 1996). Sono stati valutati come parametri:

- *tempo speso nei bracci aperti e chiusi (sec);*
- *numero di entrate nei bracci aperti e chiusi;*
- *numero di entrate totali nei 4 bracci.*

I valori ottenuti sono stati utilizzati per misurare i parametri convenzionali:

- *percentuale di tempo speso nei bracci aperti* ($[\text{tempo speso nei bracci aperti} / \text{tempo totale}] \times 100$);
- *numero di entrate nei bracci aperti* ($[\text{numero di entrate nei bracci aperti} / \text{entrate totali}] \times 100$).

Per una migliore valutazione del profilo ansiolitico/ansigeno dei farmaci vengono valutati anche i parametri etologici (Rodgers *et al.* 1997):

-*head-dipping* (movimenti esploratori effettuati col capo nelle aree esterne ai bracci aperti);

-*risk-assessment* (movimenti esploratori effettuati col capo seguiti dal riposizionamento dell'animale alla posizione originale senza attraversamento di nessun'area dell'apparato).

L'effetto di PEA (1, 2 mg/kg) e clofibrato (12.5, 25 mg/kg) è stato valutato in seguito a trattamento acuto. Inoltre, è stato valutato l'effetto di PEA (1 mg/kg) e del clofibrato (25 mg/kg) in seguito ad un regime di trattamento cronico.

1.4.3. Test dell'interazione sociale: apparato e procedura

Il test dell'interazione sociale (SI) è un test utilizzato per la valutazione dell'ansia basato esclusivamente sull'osservazione del naturale comportamento di esplorazione ed interazione tra due conspecifici sconosciuti messi a contatto. Le condizioni ambientali, come l'elevata intensità luminosa o l'esposizione ad un ambiente nuovo, influenzano negativamente il livello di interazione sociale tra gli animali. Tali condizioni possono essere facilmente manipolate in modo da rendere l'ambiente più o meno ostile. In questo modo il test risulta essere altamente sensibile sia all'effetto ansiolitico che ansiogenico di alcuni farmaci. Infatti, un aumento dell'interazione sociale senza un concomitante aumento dell'attività motoria può essere assunto come indice di un effetto ansiolitico, al contrario una riduzione specifica dell'interazione sociale è associata all'effetto ansiogenico di un composto (File e Seth 2003).

Per il nostro studio sono stati utilizzati un'arena in plexiglas (60 x 60) non familiare agli animali e un'intensità luminosa ridotta (30 lux). All'interno di tale arena, l'animale

sperimentale è stato introdotto insieme ad un conspecifico sconosciuto dello stesso sesso e di peso simile (± 5 g).

In seguito il loro comportamento è stato osservato per 10 minuti da una stanza esterna di monitoraggio, tramite videocamere digitali e rispettivo software (Anymaze Software, Stoelting).

Sono state considerate interazioni sociali attive tutte le attività di esplorazione (odorare, seguire, mordicchiare), d'ispezione ano-genitale, di monta, di colluttazione attuate dall'animale oggetto di studio nei confronti del compagno.

I parametri valutati sono stati:

-Numero di interazioni sociali attive: (esplorazione del partner, ispezione ano-genitale, monta, morsicature, inseguimento scalciamiento, colluttazione).

-Interazione sociale: il tempo (sec) trascorso in interazioni attive

Tra una sessione e la successiva l'apparato veniva pulito con H₂O₂ e sostituita la segatura in modo da eliminare ogni possibile traccia olfattiva.

Tramite il test dell'interazione sociale sono stati studiati gli effetti del trattamento acuto con la PEA (1, 2 mg/kg) ed il clofibrato (12.5, 25 mg/kg) e l'effetto del trattamento cronico con la PEA (1 mg/kg) e clofibrato (25 mg/kg).

1.5. Analisi statistica

I dati rappresentati in questo studio sono espressi come MEDIA \pm SEM.

L'analisi dei dati riguardanti il test dell'attività motoria è stata eseguita tramite ANOVA a due vie (studio dell'interazione Trattamento x Tempo). In caso di significatività statistica è stato applicato il Bonferroni post hoc test per le comparazioni multiple. I dati derivanti dai test: "Elevated plus maze", "interazione sociale" (trattamento acuto) e del test del nuoto forzato sono stati analizzati tramite ANOVA ad una via (studio del fattore trattamento tra i gruppi) e post hoc test di Newman Keuls. Mentre i dati che si riferiscono agli studi di antagonismo e d'interazione tra antidepressivi, ottenuti tramite il test del nuoto forzato, sono stati analizzati attraverso ANOVA a due vie (studio dell'interazione Trattamento con agonista x Trattamento con antagonista o Trattamento con agonista x Trattamento con antidepressivo) seguita da ANOVA ad una via e successivo post-hoc test di Newman Keuls per le comparazioni multiple. Mentre i dati ottenuti dai test: "Elevated plus maze" e di interazione sociale (trattamento cronico) sono stati analizzati tramite Unpaired t Student test, per la valutazione delle differenze tra i gruppi. La significatività statistica è stata impostata per $P < 0.05$. Le analisi sono state condotte con l'utilizzo di Graph Pad Prism versione 5.

RISULTATI

1 Effetti comportamentali dopo somministrazione acuta e sub-acuta di clofibrato

1.1 Test dell'attività motoria

1.1.1 Valutazione del trattamento acuto con l'agonista dei recettori PPAR α , clofibrato, nel test dell'attività motoria

Nelle figure 1 e 2 (a, b) è rappresentata l'analisi dell'attività motoria riportata dagli animali in seguito alla somministrazione acuta di dosi crescenti dell'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato (12.5, 25, 50, 100 mg/kg) e del corrispettivo veicolo.

Considerando l'attività orizzontale, valutata per un periodo complessivo di 60 min, osserviamo che gli animali trattati con le dosi più elevate del composto (50, 100 mg/kg) mostrano una significativa riduzione di tale parametro rispetto al gruppo di animali trattati con il veicolo e verso le dosi minori di clofibrato [ANOVA ad una via ($F_{4,24} = 12.31$; $P < 0.0001$)], mentre considerando l'attività verticale, valutata durante lo stesso periodo sopra indicato, osserviamo che solo la dose più alta del farmaco (100 mg/kg) induce una significativa riduzione di tale parametro rispetto agli animali di controllo o verso le dosi minori di clofibrato [ANOVA ad una via ($F_{4,24} = 5.501$; $P = 0.0037$)] (Fig 1a e 2a).

Dall'analisi della curva temporale (valori dell'attività motoria raccolti ad intervalli di 10 minuti per un periodo complessivo di 60 minuti), riportata nelle Fig. 1b e 2b, è stato rilevato che la riduzione sia dell'attività orizzontale che dell'attività verticale, è significativamente punto per punto osservabile principalmente alla dose di (100 mg/kg) nei primi 30 minuti del test [ANOVA a due vie: Trattamento ($F_{4,114} = 13.47$; $P < 0.0001$ attività orizzontale, $F_{4,114} = 9.856$; $P < 0.0001$ attività verticale); Tempo ($F_{5,114} = 137,1$; $P < 0.0001$ attività orizzontale, $F_{5,114} = 93.89$; $P < 0.0001$ attività verticale); interazione

Trattamento x Tempo ($F_{20,114} = 0.6619$; $P = ns$ attività orizzontale, $F_{20,114} = 0.7666$; $P = ns$ attività verticale)]. Per quanto riguarda l'attività al centro e ai margini della gabbia sperimentale, non è stata notata alcuna differenza significativa tra gli animali trattati con le varie dosi di clofibrato.

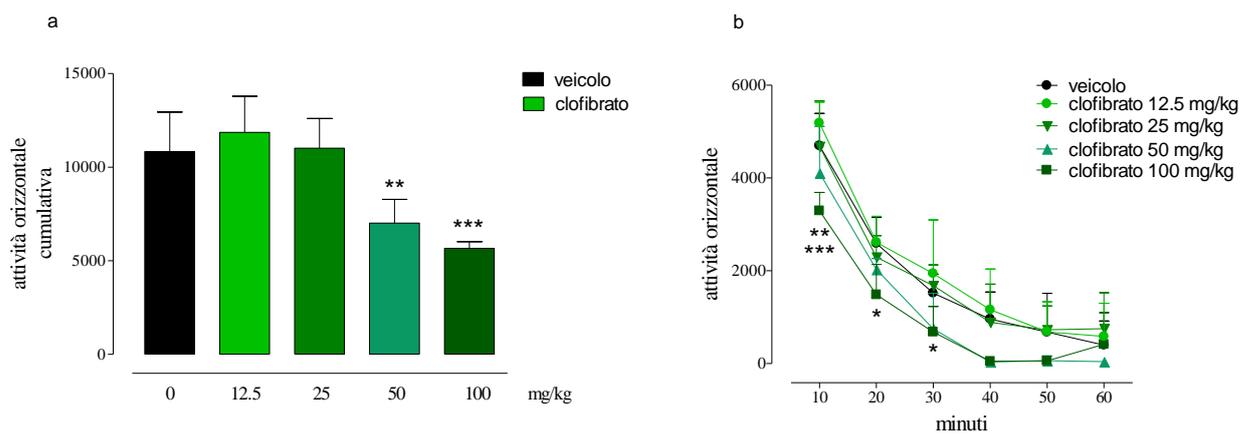


Fig. 1. Effetti dell'agonista dei recettori PPAR α , clofibrato, sull'attività orizzontale nel test dell'attività motoria.

Il grafico rappresenta gli effetti di crescenti dosi di clofibrato sull'attività orizzontale nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM ($n=6/4$ animali per gruppo).

(a): attività orizzontale cumulativa. ** $P < 0.01$ clofibrato 50 mg/kg vs veicolo, clofibrato 12.5 e 25 mg/kg; *** $P < 0.001$ clofibrato 100 mg/kg vs veicolo, clofibrato 12.5 e 25 mg/kg, post hoc test di Newman Keuls.

(b): curva temporale dell'attività orizzontale. ** $P < 0.01$ clofibrato 100 mg/kg vs veicolo e clofibrato 25 mg/kg, *** $P < 0.001$ clofibrato 100 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg (10 minuti); * $P < 0.05$ clofibrato 100 mg/kg vs veicolo (20 minuti); * $P < 0.05$ clofibrato 100 mg/kg e clofibrato 50 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg (30 minuti); post hoc test di Bonferroni.

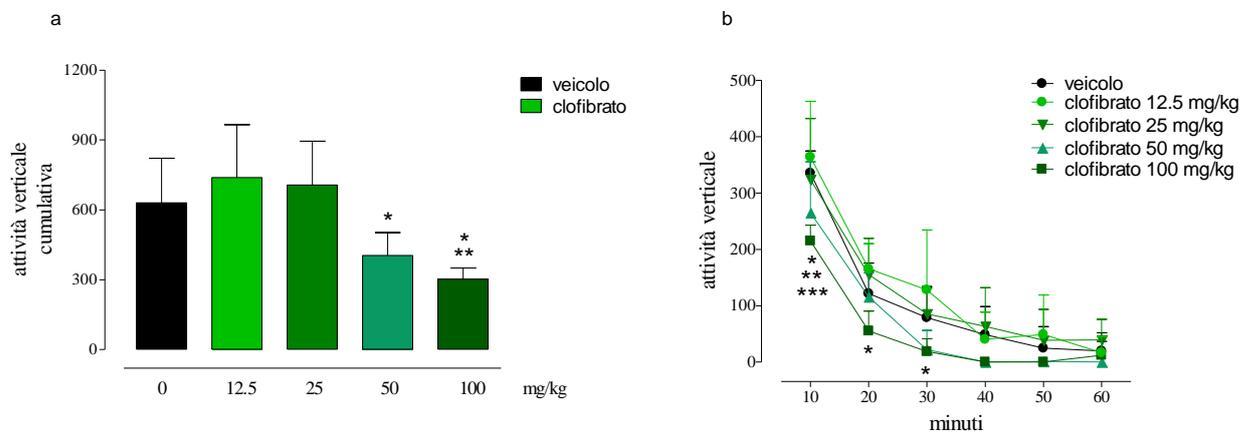


Fig. 2. Effetti dell'agonista dei recettori PPAR α , clofibrato, sull'attività verticale nel test dell'attività motoria.

Il grafico rappresenta gli effetti di crescenti dosi di clofibrato sull'attività verticale nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/4 animali per gruppo).

(a): attività verticale cumulativa. * $P < 0.05$ clofibrato 100 mg/kg vs veicolo e clofibrato 25 mg/kg; clofibrato 50 vs clofibrato 12.5 e 25 mg/kg; ** $P < 0.01$ clofibrato 100 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg, post hoc test di Newman Keuls.

(b): curva temporale dell'attività verticale. * $P < 0.05$ clofibrato 100 mg/kg vs clofibrato 25 mg/kg; clofibrato 50 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg; ** $P < 0.01$ clofibrato 100 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ clofibrato 100 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg; (10 minuti); * $P < 0.05$ clofibrato 100 mg/kg vs clofibrato 12.5 e 25 mg/kg (20 minuti); * $P < 0.05$ clofibrato 100 mg/kg e clofibrato 50 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg (30 minuti), post hoc test di Bonferroni.

1.2 Test comportamentale per la valutazione dello stato depressivo

1.2.1 *Effetto del trattamento subacuto con l'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato, nel test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"*

In tale test sono stati utilizzati come farmaci di riferimenti due antidepressivi classici, caratterizzati da un differente meccanismo d'azione. Il farmaco triciclico amitriptilina (15 mg/kg) e l'antidepressivo fluoxetina (5 mg/kg) appartenente alla classe degli SSRI, entrambi somministrati in regime subacuto. Come è possibile osservare dalla Fig. 3 la somministrazione di amitriptilina (colonna gialla) alla dose utilizzata, ha determinato rispetto al corrispettivo veicolo (colonna nera) effetto antidepressivo, con una riduzione del tempo totale d'immobilità dell'animale (immobility time) nei 5 minuti di test, mentre la somministrazione di fluoxetina (colonna azzurra) non produce alcun effetto statisticamente significativo su tale parametro (Fig 3a) [ANOVA ad una via ($F_{2,16} = 6.183$; $P = 0.01$)]. Entrambi gli antidepressivi di riferimento, alla dose utilizzata, producono un incremento statisticamente significativo del tempo di swimming (Fig.3b) [ANOVA ad una via ($F_{2,16} = 21.77$; $P < 0.0001$)]. In particolare il post hoc di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo sull'immobility: ** $P < 0.001$ amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo - swimming: *** $P < 0.001$ amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ** $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo.

Nello stesso grafico sono riportati i dati riguardanti la somministrazione di due diverse dosi di clofibrato (12.5, 25 mg/kg) (colonne verdi), con regime di somministrazione subacuto.

Analizzando gli stessi parametri comportamentali valutati per i farmaci di riferimento, è possibile notare che solo la dose di più elevata di clofibrato (25 mg/kg) (colonna verde scuro) induce una diminuzione dell'immobility (Fig.3a) ed un aumento dello swimming (Fig.3b) rispetto al gruppo di animali trattati con il corrispettivo veicolo (colonna grigia) e alla dose inferiore di clofibrato (12.5mg/kg) [ANOVA ad una via ($F_{2,17} = 12.11$; $P = 0.0007$, immobility; $F_{2,17} = 6.619$; $P = 0.0087$, swimming)]. Il post hoc di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobility: *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo, ** $P < 0.01$ vs clofibrato 12.5 mg/kg - swimming: ** $P < 0.01$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo e * $P < 0.05$ clofibrato 25 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg.

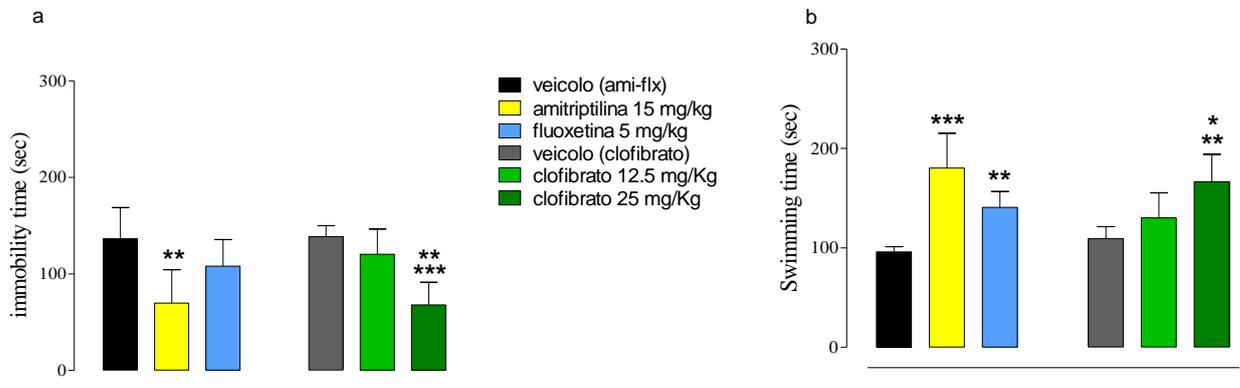


Fig. 3. Effetti del trattamento subacuto con l'agonista dei recettori PPAR α , clofibrato, nel test di depressione del nuoto forzato.

I grafici mostrano gli effetti della somministrazione dell'amitriptilina (15 mg/kg), della fluoxetina (5mg/kg) dell'agonista del recettore PPAR α , clofibrato (12.5 e 25 mg/kg) e dei corrispettivi veicoli nel test del nuoto forzato, nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/5 animali per gruppo). In particolare la figura mostra:

(a) immobility: ** $P < 0.01$ amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo (ami-flx); ** $P < 0.01$ clofibrato 25 mg/kg vs clofibrato 12.5 mg/kg; *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo (clofibrato)

(b) swimming: *** $P < 0.001$ amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo (ami-flx); ** $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo (ami-flx); ** $P < 0.01$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo (clofibrato) e * $P < 0.05$ vs clofibrato 12.5 mg/kg; post hoc test di Newman Keuls.

1.2.2 Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB1, SR141716A, sull'attività antidepressiva dell'agonista PPAR α , clofibrato, nel test comportamentale del "nuoto forzato"

La somministrazione dello specifico antagonista dei recettori PPAR α , MK886 (1 mg/kg) da solo, non determina modificazioni comportamentali negli animali sottoposti al test del nuoto forzato.

Come mostrato dal grafico in Fig.4, ripetuto il trattamento con 25 mg/kg dell'agonista sintetico PPAR α , clofibrato (colonna verde), si è confermato il marcato effetto antidepressivo-simile, in precedenza illustrato. Infatti, gli animali trattati presentano una riduzione significativa del tempo trascorso in immobility associato ad un aumento del tempo trascorso nello swimming.

La somministrazione combinata dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 (1 mg/kg) in acuto e del clofibrato (25 mg/kg) in subacuto, abolisce completamente l'effetto antidepressivo-simile indotto dall'agonista sintetico e riscontrato nel trattamento con il singolo farmaco. Infatti, il gruppo di animali trattati con la combinazione di farmaci, agonista ed antagonista, presenta un comportamento con valori di immobility e swimming del tutto simili a quelli mostrati dal gruppo di animali trattati con il solo veicolo. [ANOVA a due vie: clofibrato ($F_{1,20} = 10.28$, $P = 0.004$, immobility; $F_{1,20} = 31.23$; $P < 0.0001$, swimming) MK886 ($F_{1,20} = 8.19$; $P = 0.009$, immobility; $F_{1,20} = 24.27$; $P < 0.0001$, swimming) interazione clofibrato x MK886 ($F_{1,20} = 13.86$; $P = 0.0013$, immobility, $F_{1,20} = 17.97$; $P = 0.0004$, swimming)].

Contrariamente la cosomministrazione dell'antagonista/agonista inverso dei recettori CB1, SR141716A (1 mg/kg), che di *per se* non induce effetti nel test del nuoto forzato, non

reverte l'effetto antidepressivo-simile indotto dall'agonista sintetico. Si può, infatti, osservare che il gruppo di animali trattati con la combinazione di farmaci, agonista dei recettori PPAR α ed antagonista/agonista inverso dei recettori CB1, presenta valori di immobility e swimming del tutto simili a quelli mostrati dal gruppo di animali trattati con il solo agonista PPAR α . L'ANOVA a due vie condotta su i parametri di immobility e swimming mostra: clofibrato ($F_{1,18} = 36.95$, $P = 0.0001$, immobility; $F_{1,18} = 60.39$; $P < 0.0001$, swimming), SR141716A ($F_{1,18} = 1.99$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 0.8497$; $P = ns$, swimming) Interazione clofibrato x SR141716A ($F_{1,18} = 0.18$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 2.737$; $P = ns$, swimming).

L'ANOVA ad una via mostra un effetto significativo del trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobility (Fig. 4a) ($F_{5,33} = 14.20$; $P < 0.0001$) e swimming (Fig. 4b) ($F_{5,33} = 22.14$; $P < 0.0001$). In particolare il post hoc test di Newman Keuls riporta un effetto statisticamente significativo su immobility *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo, ### $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs clofibrato 25 mg/kg; +++ $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo e SR141716A 1 mg/kg – swimming, *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo, ### $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs clofibrato 25 mg/kg; +++ $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo e SR141716A 1 mg/kg.

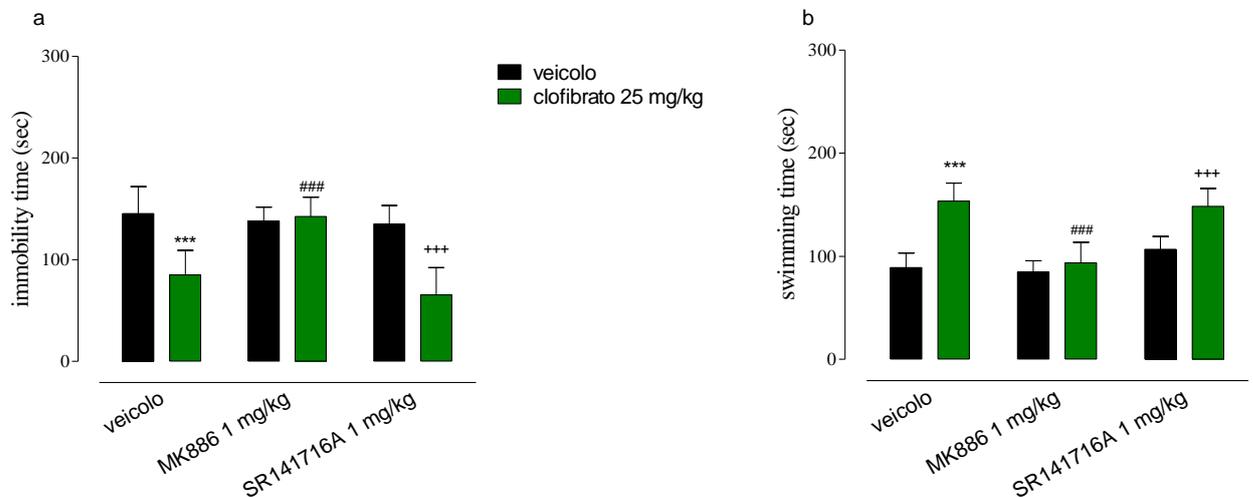


Fig. 4. Effetto dell'antagonista specifico dei recettori PPAR α , MK886 e dell'antagonista cannabinoide CB1, SR141716A, sull'effetto del clofibrato 25 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.

I grafici mostrano gli effetti del clofibrato 25 mg/kg, dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 (1 mg/kg), dell'antagonista/agonista inverso CB1, SR141716A (1 mg/kg), sia singolarmente che ciascuno in combinazione con clofibrato rispetto al gruppo trattato con veicolo nel test del nuoto forzato. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/4 animali per gruppo). In particolare la figura mostra:

(a) immobility: *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo, ### $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs clofibrato 25 mg/kg; *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo e SR141716A 1 mg/kg,

(b) swimming: *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo, ### $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs clofibrato 25 mg/kg; *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo e SR141716A 1 mg/kg; post hoc test di Newman Keuls.

1.2.3 Valutazione dalla possibile interazione tra l'effetto antidepressivo-simile dell'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato, e l'antidepressivo fluoxetina o amitriptilina, nel test comportamentale del "nuoto forzato".

La somministrazione subacuta di clofibrato ad una dose bassa di 12.5 mg/kg (colonna verde) come atteso non produce modificazioni comportamentali negli animali sottoposti al test del nuoto forzato. Allo stesso modo, la somministrazione subacuta di una bassa dose di fluoxetina (2 mg/kg) non produce modificazioni comportamentali in tale test. Infatti, il gruppo di animali trattati con il solo agonista sintetico dei recettori PPAR α , o con la sola fluoxetina, mostrano valori di immobility e swimming, del tutto paragonabili a quelli riportati dal gruppo di animali trattati con il solo veicolo. Al contrario il trattamento con la combinazione dei due farmaci, clofibrato+fluoxetina, produce un marcato effetto antidepressivo-simile. Il gruppo di animali sottoposti a tale trattamento presentano una significativa riduzione del tempo di immobility e contemporaneo aumento del tempo di swimming rispetto agli animali trattati con il solo veicolo.

L'analisi statistica tramite ANOVA a due vie su immobility e swimming riporta: clofibrato ($F_{1,18} = 6.764$; $P = 0.02$, immobility; $F_{1,18} = 15.14$; $P = 0.001$, swimming), fluoxetina ($F_{1,18} = 3.4$; $P < 0.08$, immobility; $F_{1,18} = 9.1$; $P = 0.007$, swimming) Interazione clofibrato x fluoxetina ($F_{1,18} = 6.3$; $P = 0.02$, immobility; $F_{1,18} = 10.1$; $P = 0.005$, swimming).

Abbiamo voluto valutare anche l'effetto dell'antidepressivo tricyclico, amitriptilina (0.3 mg/kg) in combinazione con l'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato (12.5 mg/kg), nel test del nuoto forzato. Come è possibile osservare la somministrazione subacuta di amitriptilina (0.3 mg/kg) non produce di *per se* modificazioni comportamentali in tale test. Contrariamente a quanto osservato nell'esperimento di

combinazione precedente (clofibrato+fluoxetina) il trattamento con la combinazione dei due farmaci, clofibrato+amitriptilina non produce alcun effetto statisticamente rilevabile, infatti, il gruppo di animali sottoposti a tale trattamento, presentano un profilo comportamentale paragonabile a quello degli animali trattati con il solo veicolo.

L'ANOVA ad una via mostra un effetto significativo del trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobility (Fig. 5a) ($F_{5,33} = 5.99$; $P = 0.0007$) e swimming (Fig. 5b) ($F_{5,33} = 6.19$; $P = 0.0006$). In particolare il post hoc test di Newman Keuls riporta un effetto statisticamente significativo su immobility ** $P < 0.01$ clofibrato 12.5 mg/kg + fluoxetina 2 mg/kg vs veicolo, fluoxetina 2 mg/kg e clofibrato 12.5 mg/kg,– swimming *** $P < 0.001$ clofibrato 12.5 mg/kg + fluoxetina 2 mg/kg vs veicolo, ** $P < 0.01$ vs clofibrato 12.5 mg/kg e fluoxetina 2 mg/kg.

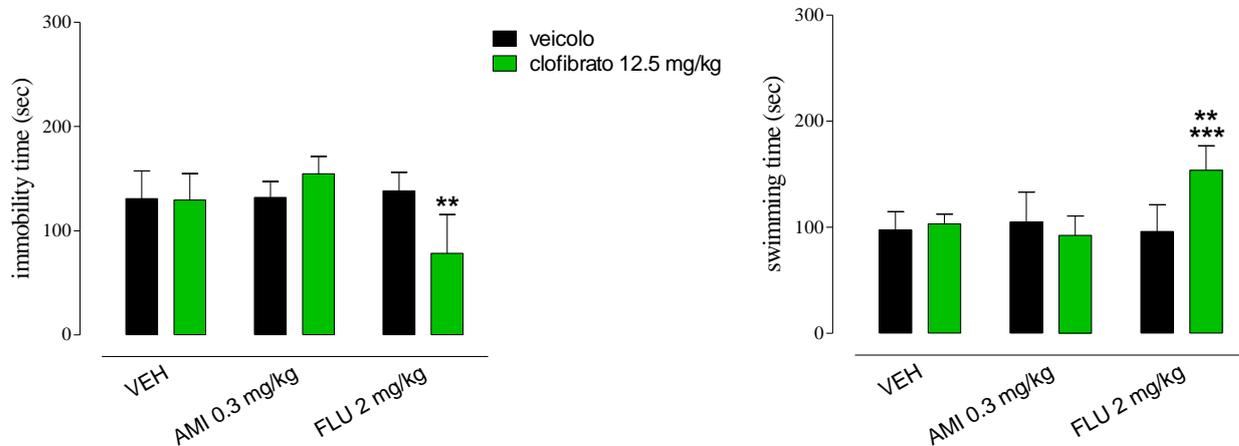


Fig. 5. Effetto della cosomministrazione sub-acuta di clofibrato 12.5 mg/kg, fluoxetina 2 mg/kg o amitriptilina 0.3 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.

I grafici mostrano gli effetti del clofibrato 12.5 mg/kg, della fluoxetina (5 mg/kg), dell'amitriptilina (0.3 mg/kg), sia singolarmente che in combinazione con clofibrato, rispetto al gruppo trattato con veicolo nel test del nuoto forzato. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/4 animali per gruppo). In particolare la figura mostra

(a) immobility: ** $P < 0.01$ clofibrato 12.5 mg/kg + fluoxetina 2 mg/kg vs veicolo, fluoxetina 2 mg/kg e clofibrato 12.5 mg/kg;

(b) swimming: *** $P < 0.001$ clofibrato 12.5 mg/kg + fluoxetina 2 mg/kg vs veicolo, ** $P < 0.01$ vs clofibrato 12.5 mg/kg e fluoxetina 2 mg/kg, post hoc test di Newman Keuls.

1.2.4 Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB1, SR141716A, sull'attività antidepressiva del farmaco SSRI, fluoxetina, nel test comportamentale del "nuoto forzato"

In questo esperimento si è voluto indagare sul possibile coinvolgimento del recettore PPAR α nell'effetto antidepressivo della fluoxetina, nel test del nuoto forzato, tramite la cosomministrazione acuta dell'antagonista specifico per tale recettore lo MK886 (1 mg/kg). Come osservato nei precedenti esperimenti anche in questo l'antagonista di *per se* non determina modificazioni comportamentali negli animali sottoposti al test di depressione rispetto agli animali trattati con il veicolo. La somministrazione subacuta dell'antidepressivo di riferimento, fluoxetina (5 mg/kg) (colonna azzurra) conferma il suo effetto antidepressivo, osservabile come aumento del tempo trascorso in swimming dagli animali, quando comparati a quelli trattati con il singolo veicolo. Il trattamento in singolo con l'antagonista del recettore PPAR α , MK886 (1 mg/kg), non modifica l'effetto antidepressivo proprio dalla fluoxetina. Il gruppo di animali trattati con la combinazione di farmaci, antidepressivo fluoxetina ed antagonista dei recettori PPAR α , presenta un comportamento con valori di immobility e swimming del tutto simili a quelli mostrati dal gruppo di animali trattati con la sola fluoxetina.

L'ANOVA a due vie condotta sui gruppi sperimentali trattati con fluoxetina e MK866 rivela un effetto statisticamente significativo sia sull'immobility (Fig 6a) che sullo swimming (Fig 6b), a carico della sola fluoxetina ($F_{1,18} = 8.9$; $P = 0.008$, immobility; $F_{1,18} = 24.70$; $P < 0.0001$, swimming), mentre non viene riportata nessuna significatività a carico dell'MK866 ($F_{1,18} = 0.03$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 0.11$; $P = ns$, swimming) e dell'interazione tra fluoxetina x MK866 ($F_{1,18} = 0.02$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 0.01$; $P = ns$, swimming).

In seguito abbiamo analizzato l'effetto del trattamento con l'antagonista/agonista inverso CB1, SR141617A (1 mg/kg), da solo e in combinazione con l'antidepressivo, fluoxetina. La somministrazione acuta di SR141617A non produce alcuna variazione nel comportamento animale durante il test del nuoto forzato, confermando il dato precedentemente riportato in questa tesi e risulta essere inefficace nell'antagonizzare l'effetto antidepressivo proprio della fluoxetina. L'analisi statistica riporta un effetto significativo su entrambi i parametri valutati, immobility e swimming [ANOVA a due vie: fluoxetina ($F_{1,18} = 7.36$; $P = 0.0143$, immobility; $F_{1,18} = 24.39$; $P < 0.0001$, swimming), SR141716A ($F_{1,18} = 0.35$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 1.6$; $P = ns$, swimming) e interazione fluoxetina x SR141716A ($F_{1,18} = 0.06$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 0.48$; $P = ns$, swimming)].

L'ANOVA ad una via sui gruppi sperimentali trattati con fluoxetina e MK866 o SR141716A rivela un effetto statisticamente significativo all'interno dei gruppi sperimentali su immobility ($F_{5,31} = 2.62$; $P = 0.048$), su swimming ($F_{5,31} = 7.48$; $P = 0.002$). In particolare il post hoc test di Newman Keuls riporta un effetto statisticamente significativo su swimming: ** $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo, ### $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs veicolo, # $P < 0.05$ vs MK886 1 mg/kg, ++ $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo.

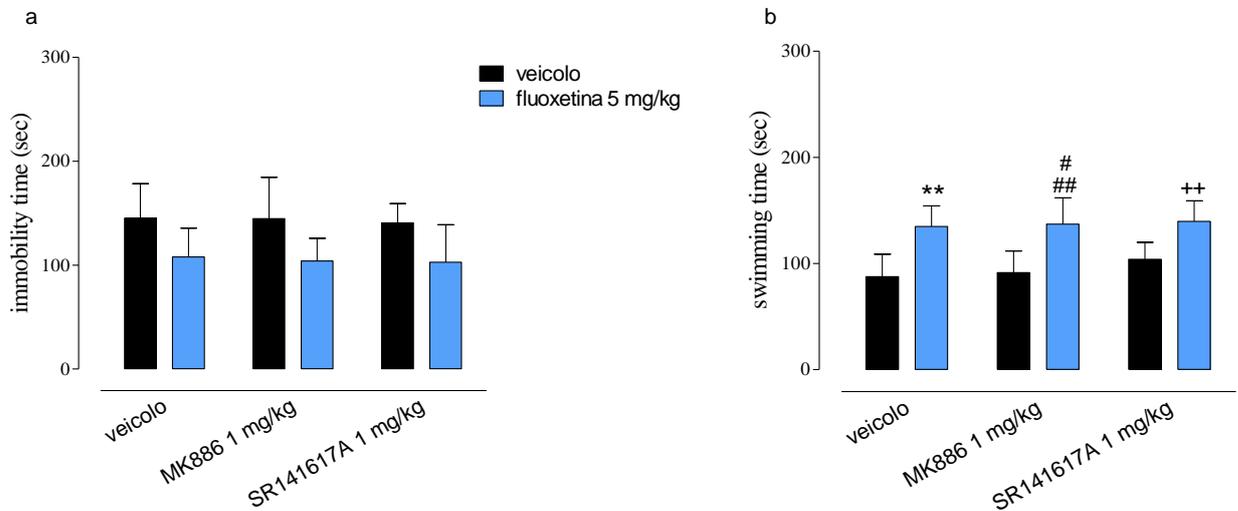


Fig. 6. Effetto dell'antagonista specifico dei recettori PPAR α , MK886, e dell'antagonista/agonista inverso CB1, SR141716A sull'effetto della fluoxetina 5 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.

I grafici mostrano gli effetti della fluoxetina 5 mg/kg, dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 (1 mg/kg) dell'antagonista/agonista inverso CB1r, SR141716A (1 mg/kg) e della loro combinazione con la fluoxetina rispetto al gruppo trattato con veicolo nel test del nuoto forzato. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/4 animali per gruppo). In particolare la figura mostra:

(a) immobility

(b) swimming: ** $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo, ## $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs veicolo, # $P < 0.05$ vs MK886 1 mg/kg, ++ $P < 0.01$ fluoxetina 5 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls.

1.2.5 Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB1, SR141716A, sull'attività antidepressiva del farmaco triciclico, amitriptilina, nel test comportamentale del "nuoto forzato"

Abbiamo voluto valutare anche la combinazione (Fig.7) della somministrazione dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886, in combinazione con l'antidepressivo triciclico, amitriptilina (15mg/kg). Come in precedenza la dose di MK886 utilizzata per tale test non induce modificazioni comportamentali durante il test del nuoto forzato. Mentre la somministrazione subacuta di amitriptilina (colonna gialla) induce un potente effetto antidepressivo, osservabile come riduzione di immobility (Fig 7a) e concomitante aumento dello swimming (Fig. 7b) rispetto al gruppo di animali di controllo trattati con il solo veicolo. Il trattamento con l'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 (1 mg/kg), non antagonizza l'effetto antidepressivo indotto dall'amitriptilina. Il gruppo di animali trattati con la combinazione di farmaci, antidepressivo ed antagonista, presenta un comportamento con valori di immobility e swimming del tutto simili a quelli mostrati dal gruppo di animali trattati con il solo antidepressivo.

L'ANOVA a due vie rivela un effetto statisticamente significativo sia sull'immobility (Fig 7a) che sullo swimming (Fig 7b), a carico del solo amitriptilina ($F_{1,18} = 46.61$; $P < 0.0001$, immobility; $F_{1,18} = 63.39$; $P < 0.0001$, swimming), mentre non viene riportata nessuna significatività a carico dell'MK886 ($F_{1,18} = 0.29$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 1.36$; $P = ns$, swimming) e dell'interazione tra amitriptilina x MK886 ($F_{1,18} = 0.59$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 1.08$; $P = ns$, swimming).

L'esperimento successivo è stato studiare l'effetto del trattamento con l'antagonista/agonista inverso CB1, SR141716A (1 mg/kg), in combinazione con

l' amitriptilina. La somministrazione acuta di SR141716A non produce alcuna modificazione del comportamento animale durante il test del nuoto forzato, confermando il dato già in precedenza riportato, né nel bloccare l'effetto antidepressivo indotto dall' amitriptilina. L'analisi statistica riporta un effetto significativo su entrambi i parametri valutati, immobility e swimming [ANOVA a due vie: amitriptilina ($F_{1,18} = 38.94$; $P < 0.0001$, immobility; $F_{1,18} = 41.86$; $P < 0.0001$, swimming), SR141716A ($F_{1,18} = 0.23$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 2.80$; $P = ns$, swimming) e interazione amitriptilina x SR141716A ($F_{1,18} = 0.00$; $P = ns$, immobility; $F_{1,18} = 0.00$; $P = ns$, swimming)].

L'ANOVA ad una via rivela un effetto statisticamente significativo all'interno dei gruppi sperimentali su immobility ($F_{5,31} = 12.10$; $P < 0.0001$) e swimming ($F_{5,31} = 14.76$; $P < 0.0001$). In particolare il post hoc test di Newman Keuls riporta un effetto statisticamente significativo su immobility: *** $P < 0.001$ amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo, ### $P < 0.01$ amitriptilina 15 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs veicolo e MK866 1 mg/kg, +++ $P < 0.001$ amitriptilina 15 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo ed SR141716A 1 mg/kg – swimming *** $P < 0.001$ amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo, ### $P < 0.01$ amitriptilina 15 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs veicolo e MK866 1 mg/kg, +++ $P < 0.001$ amitriptilina 15 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo ed SR141716A 1 mg/kg.

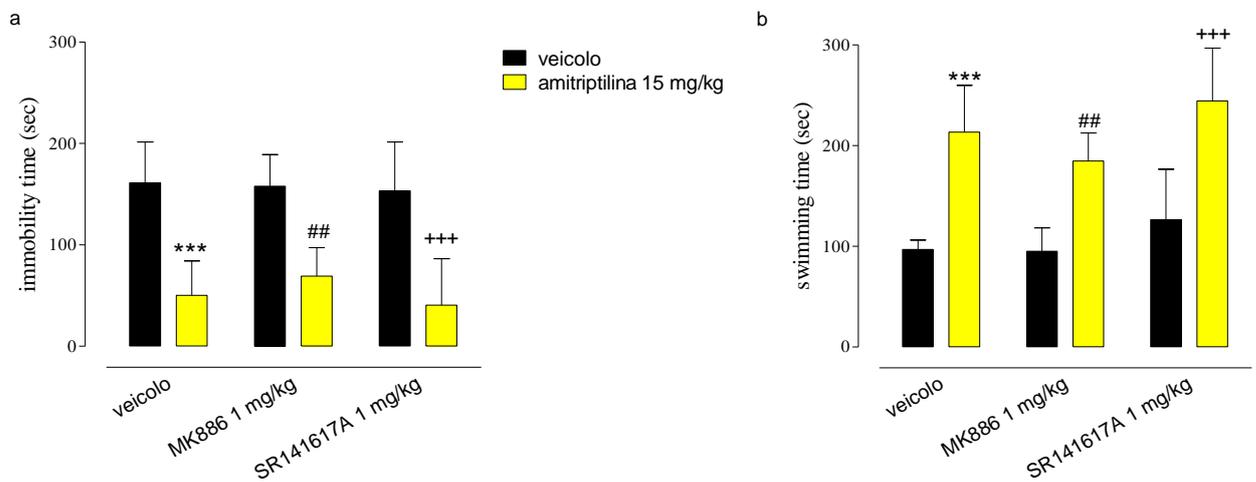


Fig. 7. Effetto dell'antagonista specifico dei recettori PPAR α , MK886, e dell'antagonista/agonista inverso CB1, SR141716A sull'effetto dell'amitriptilina 15 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.

I grafici mostrano gli effetti dell'amitriptilina 15 mg/kg, dell'antagonista dei recettori PPAR α , MK886 (1 mg/kg) dell'antagonista/agonista inverso CB1r, SR141716A (1 mg/kg) e della loro combinazione con l'amitriptilina rispetto al gruppo trattato con veicolo nel test del nuoto forzato. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/4 animali per gruppo). In particolare la figura mostra

(a) immobility: *** P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo, ## P<0.01 amitriptilina 15 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs veicolo e MK866 1 mg/kg, +++ P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo ed SR141716A 1 mg/kg

(b) swimming: *** P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo, ## P<0.01 amitriptilina 15 mg/kg + MK886 1 mg/kg vs veicolo e MK866 1 mg/kg, +++ P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg + SR141716A 1 mg/kg vs veicolo ed SR141716A 1 mg/kg, post hoc test di Newman Keuls.

1.3 Test comportamentali per la valutazione dello stato ansioso

1.3.1 Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test comportamentale di ansia “elevated plus maze”

I grafici (Fig. 9 e Fig 10) raffigurano gli effetti del trattamento acuto con l'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato (12.5, 25mg/kg) e con l'agonista endogeno dei recettori PPAR α , PEA (1, 2 mg/kg), nel comportamento dell'animale nel test per la valutazione dello stato d'ansia l'“elevated plus maze”. Come possibile osservare dai grafici sia il trattamento con il clofibrato (Fig 9) (colonne verdi) che con la PEA (Fig 10) (colonne azzurre), alle dosi utilizzate non inducono effetti nè ansiolitici né ansiogeni, infatti, non modificano in maniera significativa i parametri considerati, sia i parametri classici (% numero di entrate nei bracci aperti, % di tempo nei bracci aperti e numero di ingressi nei bracci chiusi) che dei parametri etologici (head-dipping, risk-assesment) rispetto al gruppo di controllo trattato con il veicolo (colonne nere). L'unico dato riscontrato (Fig 10c) riguarda l'effetto della somministrazione della PEA (2 mg/kg) sul numero di entrate nei bracci chiusi, che risulta essere significativamente inferiore al numero di entrate degli animali di controllo [ANOVA a una via ($F_{2,17} = 5.248$; $P < 0.018$)]. In particolare il post hoc di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su tale parametro * $P < 0.05$ PEA 2 mg/kg vs veicolo. Tale dato preso singolarmente non risulta essere sufficiente per indicare un cambiamento nello stato emotivo degli animali trattati con il farmaco.

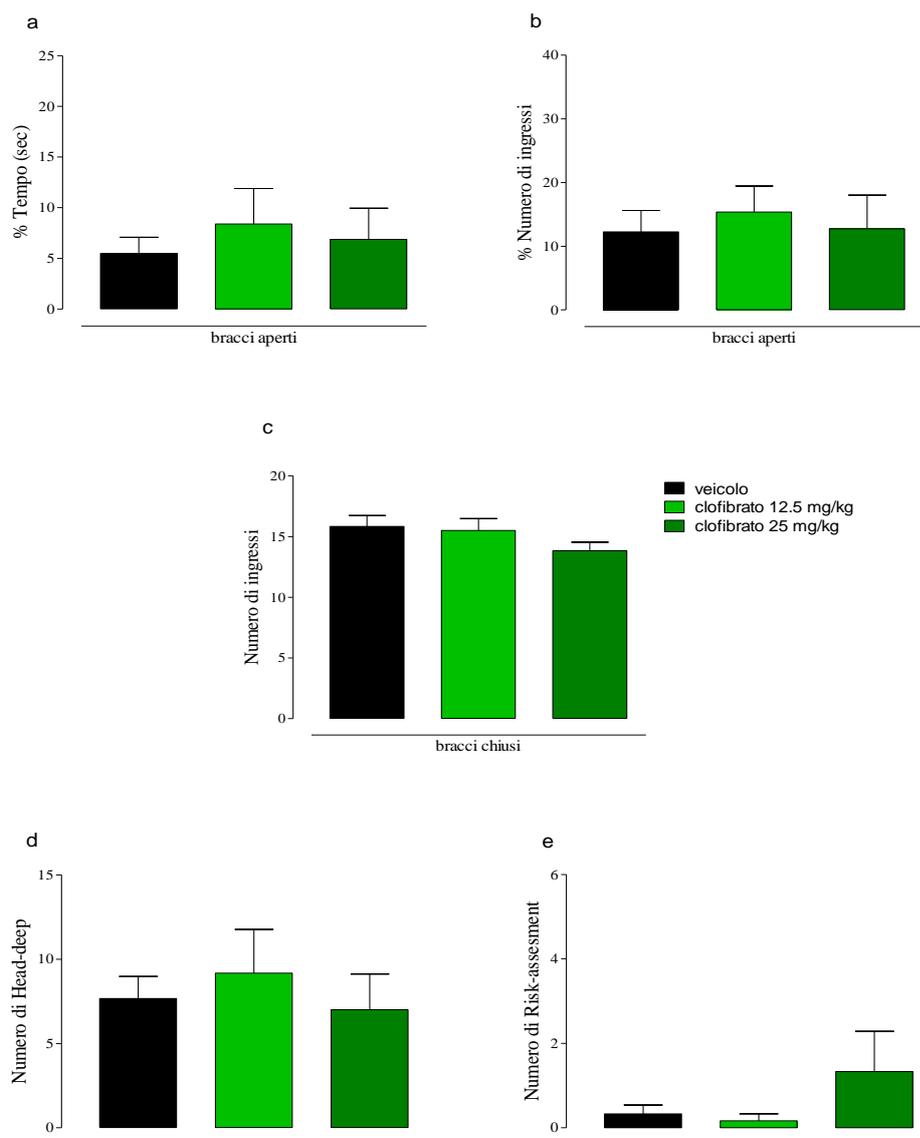


Fig. 9 Effetto del trattamento acuto con l'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato, nel test comportamentale d'ansia elevated plus maze.

I grafici riportano gli effetti del clofibrato (12.5 e 25 mg/kg) nell'elevated plus maze nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n = 6 animali per gruppo). **(a)** Percentuale (%) di tempo trascorso nei bracci aperti. **(b)** % Numero di ingressi nei bracci aperti. **(c)** Numero di entrate nei bracci chiusi. **(d)** Numero di head-dipping. **(e)** Numero di risk-assessment; post hoc test di Newman Keuls.

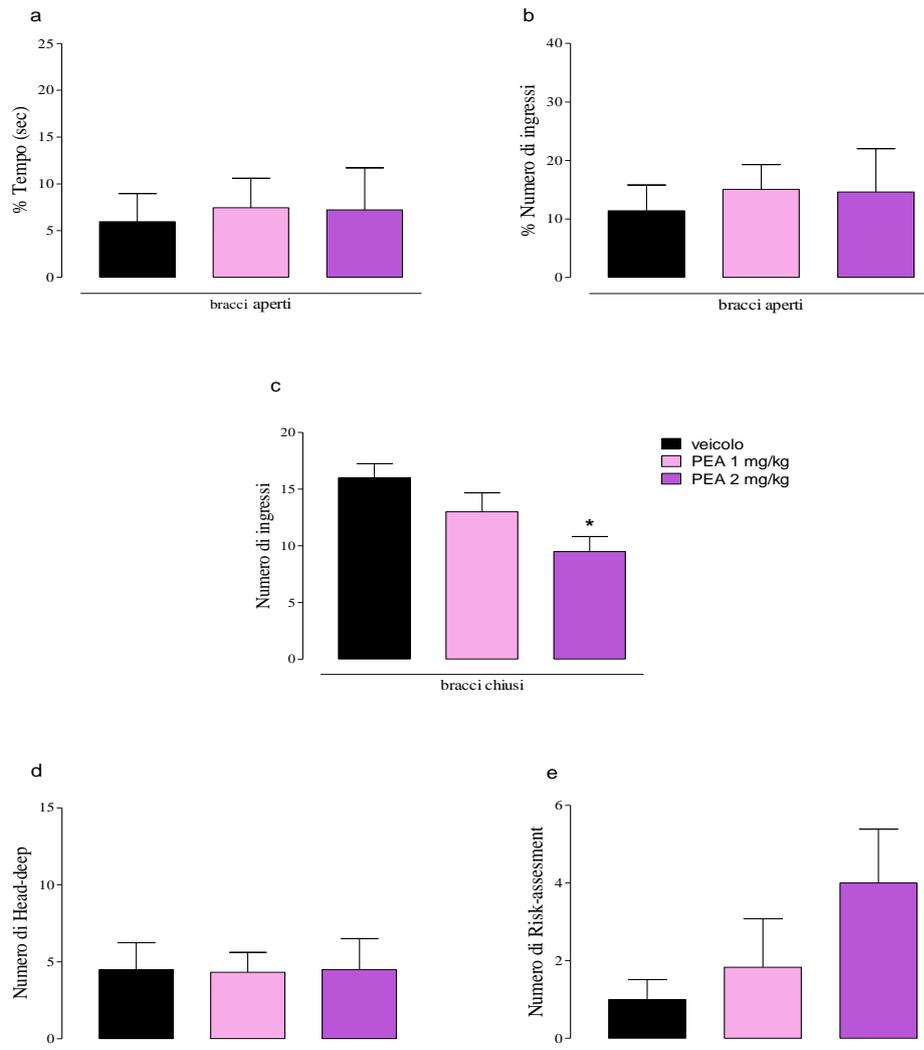


Fig. 10 Effetto del trattamento acuto con l'agonista endogeno dei recettori PPAR α , PEA nel test comportamentale d'ansia elevated plus maze.

I grafici riportano gli effetti della PEA (1 e 2 mg/kg) nell'elevated plus maze nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM ($n = 6$ animali per gruppo). **(a)** Percentuale (%) di tempo trascorso nei bracci aperti. **(b)** % Numero di ingressi nei bracci aperti. **(c)** Numero di entrate nei bracci chiusi: * $P < 0.05$ PEA 2mg/kg vs veicolo **(d)** Numero di head-dipping. **(e)** Numero di risk-assessment; post hoc test di Newman Keuls.

1.3.2 Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test comportamentale di ansia "interazione sociale".

I pannelli riportati nella figura 11 mostrano l'effetto del trattamento acuto con clofibrato (12.5, 25mg/kg) e PEA (1, 2 mg/kg), nel comportamento dell'animale durante il test di interazione sociale.

Come è possibile osservare dal grafico (Fig. 11a) il trattamento acuto con clofibrato alle dosi utilizzate non modifica il numero di interazioni sociali tra i due animali conspecifici (colonne verdi), rispetto al gruppo di animali trattati con il solo veicolo (colonna nera). Tuttavia, è stato riscontrato un effetto ansiogenico, osservabile nei dati come riduzione del tempo trascorso in interazioni sociali tra gli animali in studio (Fig. 11b). L'ANOVA ad una via ha rivelato un effetto statisticamente significativo del trattamento all'interno dei gruppi sperimentali sul tempo trascorso in interazioni sociali ($F_{2,17} = 9.606$; $P = 0.0021$). In particolare il post-hoc test di Newman Keuls evidenzia un effetto statisticamente significativo su quest'unico parametro: ** $P < 0.01$ clofibrato 12.5 e 25 mg/kg vs veicolo.

In maniera del tutto simile il trattamento acuto con l'agonista endogeno PEA (1 e 2 mg/kg) non modifica il numero di interazioni sociali tra i due conspecifici (Fig. 11 c) (colonne azzurre), rispetto al gruppo di animali trattati con il solo veicolo (colonna nera), mentre entrambe le dosi di PEA (1 e 2 mg/kg) inducono una riduzione del tempo trascorso in interazioni sociali (Fig. 11 d). L'ANOVA ad una via ha rivelato un effetto statisticamente significativo del trattamento all'interno dei gruppi sperimentali sul tempo trascorso in interazioni sociali ($F_{2,15} = 8.047$; $P = 0.0053$). In particolare il post-hoc test di Newman Keuls evidenzia un effetto statisticamente significativo su tale parametro: * $P < 0.05$ PEA 1 mg/kg vs veicolo; ** $P < 0.01$ PEA 2 mg/kg vs veicolo.

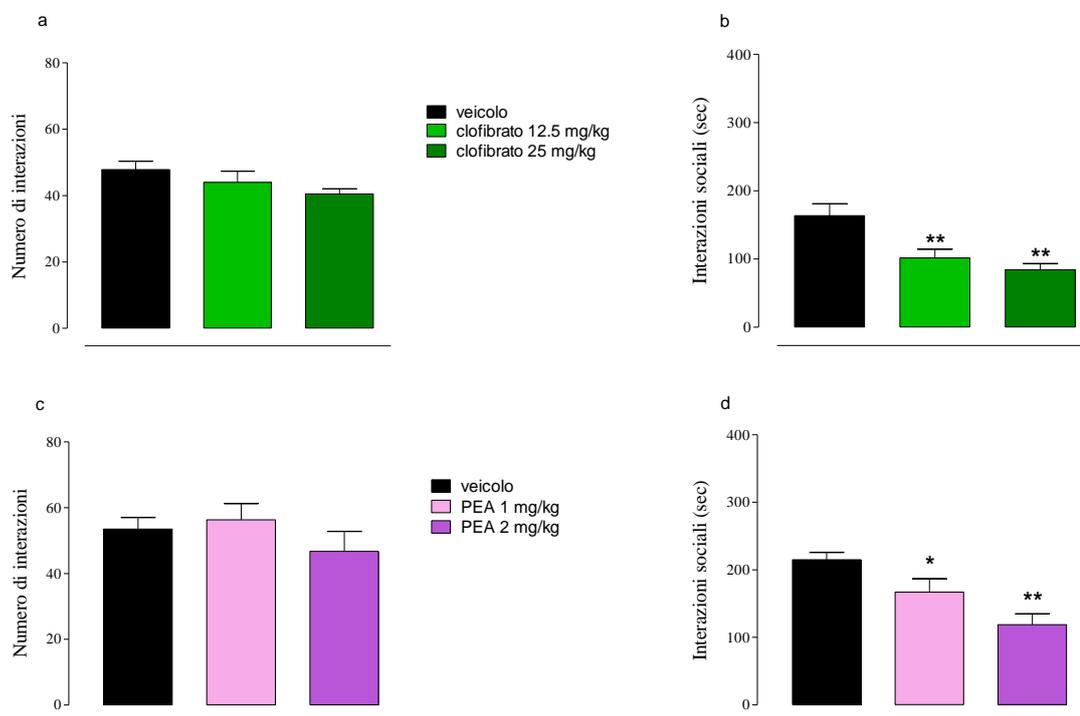


Fig. 11. Valutazione del trattamento acuto con l'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato e con l'agonista endogeno dei recettori PPAR α , PEA, nel test comportamentale d'ansia d'interazione sociale.

I grafici riportano gli effetti del clofibrato (12.5 e 25 mg/kg) e della PEA (1 e 2 mg/kg) nel test d'interazione sociale condotto sul ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n = 6/4 animali per gruppo). **(a-c) Numero di interazioni sociali. (b-d) Tempo trascorso in interazioni sociali** : ** P<0.01 clofibrato 12.5 e 25 mg/kg vs veicolo; * P<0.05 PEA 1 mg/kg vs veicolo; ** P<0.01 PEA 2 mg/kg vs veicolo; post-hoc test di Newman Keuls.

2 Effetti comportamentali dopo somministrazione cronica di clofibrato

2.1 Test dell'attività motoria

2.1.1 Valutazione del trattamento cronico con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato nel test dell'attività motoria

Nelle figure 12 e 13 (a, b) sono riportati i dati riguardanti l'analisi dell'attività motoria degli animali dopo somministrazione cronica dell'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato (25mg/kg), dell'agonista endogeno, PEA (1 mg/kg) e del corrispettivo veicolo.

Considerando sia l'attività orizzontale che l'attività verticale, valutata per un periodo complessivo di 60 min, osserviamo che gli animali trattati con clofibrato (25 mg/kg) o PEA (1 mg/kg) non mostrano evidenti modificazioni di tali parametri rispetto agli animali di controllo.

Anche dall'analisi della curva temporale (valori dell'attività motoria raccolti ad intervalli di 10 minuti per un periodo complessivo di 60 minuti), riportata nelle Fig. 12b e 13b, non è stato rilevata alcuna modificazione statisticamente significativa dei parametri considerati in seguito alla somministrazione in regime cronico di entrambi gli agonisti PPAR α .

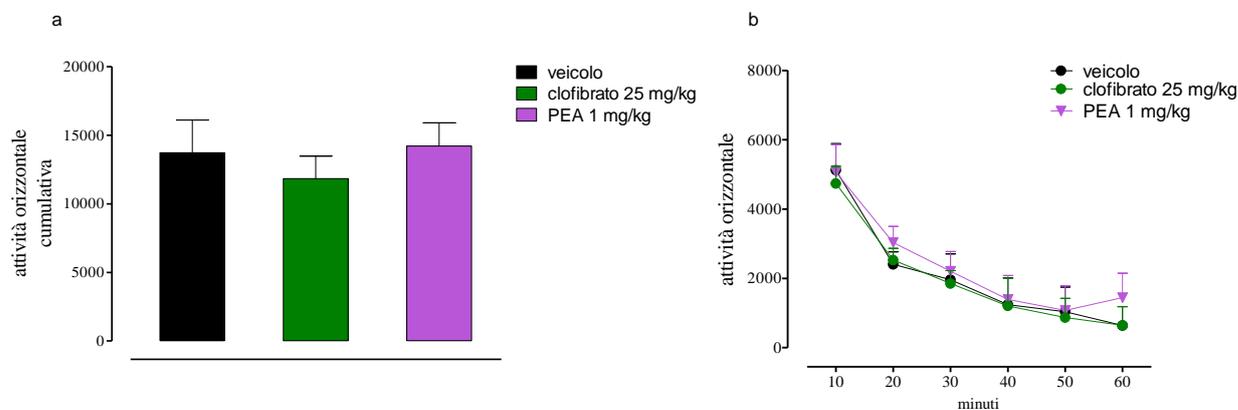


Fig. 12. Effetti degli agonisti dei recettori PPAR α , clofibrato e PEA, sull'attività orizzontale nel test dell'attività motoria.

Il grafico rappresenta gli effetti della somministrazione in regime cronico di clofibrato (25 mg/kg) e PEA (1 mg/kg) sull'attività orizzontale, nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/4 animali per gruppo).

(a): attività orizzontale cumulativa; post hoc test di Newman Keuls.

(b): curva temporale dell'attività orizzontale; post hoc test di Bonferroni.

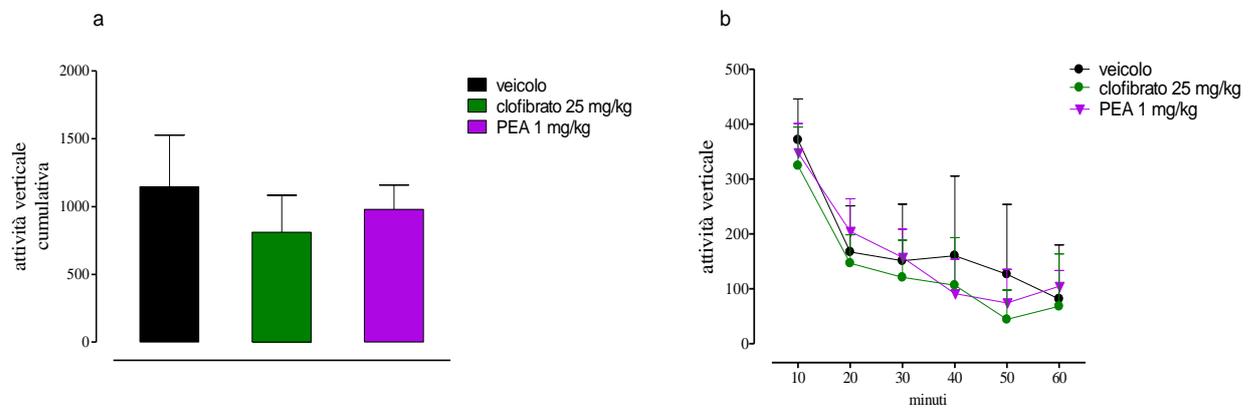


Fig. 13. Effetti degli agonisti dei recettori PPAR α , clofibrato e PEA, sull'attività verticale nel test dell'attività motoria.

Il grafico rappresenta gli effetti della somministrazione in regime cronico di clofibrato (25 mg/kg) e PEA (1 mg/kg) sull'attività orizzontale, nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=6/4 animali per gruppo).

(a): attività verticale cumulativa; post hoc test di Newman Keuls.

(b): curva temporale dell'attività verticale; post hoc test di Bonferroni.

2.2 Test comportamentale per la valutazione dello stato depressivo

2.2.1 *Effetto del trattamento cronico con l'agonista endogeno e sintetico dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"*

Nella sperimentazione cronica per la valutazione dell'effetto antidepressivo simile è stato utilizzato come farmaco di riferimento l'antidepressivo fluoxetina (5 mg/kg). Come è possibile osservare dal Fig. 8 la fluoxetina (colonna azzurra) alla dose utilizzata, ha determinato rispetto all'animale trattato con il corrispettivo veicolo (colonna nera) una riduzione del tempo totale di immobilità dell'animale (immobility time) nei 5 minuti di test, (Fig. 8 a) associato ad un incremento statisticamente significativo del tempo di swimming (Fig.8 b) indicativi di un effetto antidepressivo. Allo stesso modo la somministrazione cronica dell'agonista sintetico PPAR α , clofibrato (25 mg/kg) (colonna verde) e dell'agonista endogeno, PEA (1 mg/kg) (colonna viola) inducono un marcato effetto antidepressivo-simile, osservabile come: diminuzione dell'immobility (Fig.8 a) [ANOVA ad una via ($F_{3,29} = 22.84$; $P < 0.0001$)] ed aumento dello swimming (Fig.8 b) [ANOVA ad una via ($F_{3,29} = 24.04$; $P < 0.0001$)] rispetto al gruppo di animali trattati con il solo veicolo (colonna nera). In particolare il post hoc di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobility: *** $P < 0.001$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ PEA 1 mg/kg vs veicolo - swimming: *** $P < 0.001$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ PEA 1 mg/kg vs veicolo.

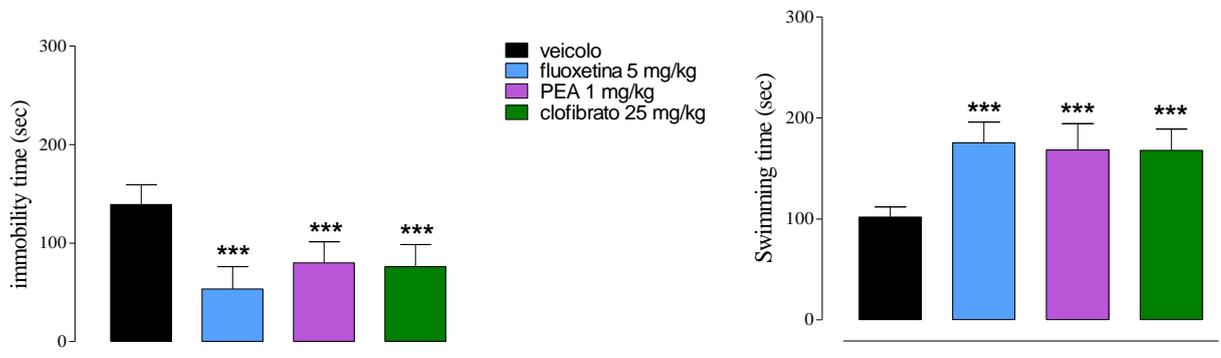


Fig. 8. Effetto del trattamento cronico con l'agonista endogeno e sintetico dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test di depressione del nuoto forzato.

I grafici mostrano gli effetti della fluoxetina (5mg/kg) e degli agonisti del recettore PPAR α , PEA (1mg/kg), clofibrato (25 mg/kg) e del corrispettivo veicolo nel test del nuoto forzato, nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n=8/6 animali per gruppo). In particolare la figura mostra

(a) immobility: *** $P < 0.001$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ PEA 1 mg/kg vs veicolo

(b) swimming: *** $P < 0.001$ fluoxetina 5 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo; *** $P < 0.001$ PEA 1 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls.

2.3 Test comportamentali per la valutazione dello stato ansioso

2.3.1 Valutazione del trattamento cronico con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato nel test comportamentale di ansia "elevated plus maze"

I grafici (Fig. 14 e Fig 15) presentano gli effetti del trattamento cronico con l'agonista sintetico, clofibrato (25mg/kg) e con l'agonista endogeno dei recettori PPAR α , PEA (1 mg/kg), rispettivamente, nel comportamento dell'animale nel test d'ansia "elevated plus maze". Come possibile osservare dai grafici sia il clofibrato (Fig 14 colonne verdi) che la PEA (Fig 15 colonne azzurre), alle dosi utilizzate non determinano aumento o diminuzione di ansia, infatti, non modificano significativamente nessuno dei parametri considerati, né classici né etologici rispetto al gruppo di controllo trattato con il veicolo (colonne nere). L'unico dato significativo (Fig 14b) riguarda l'effetto della somministrazione del clofibrato (25 mg/kg) sulla percentuale di entrate nei bracci aperti, che risulta essere significativamente inferiore al numero di entrate degli animali di controllo trattati con il veicolo, * $P < 0.05$ clofibrato 25 mg/kg vs veicolo. Tale dato preso singolarmente non risulta essere sufficiente per indicare un cambiamento nello stato emotivo degli animali trattati con il farmaco.

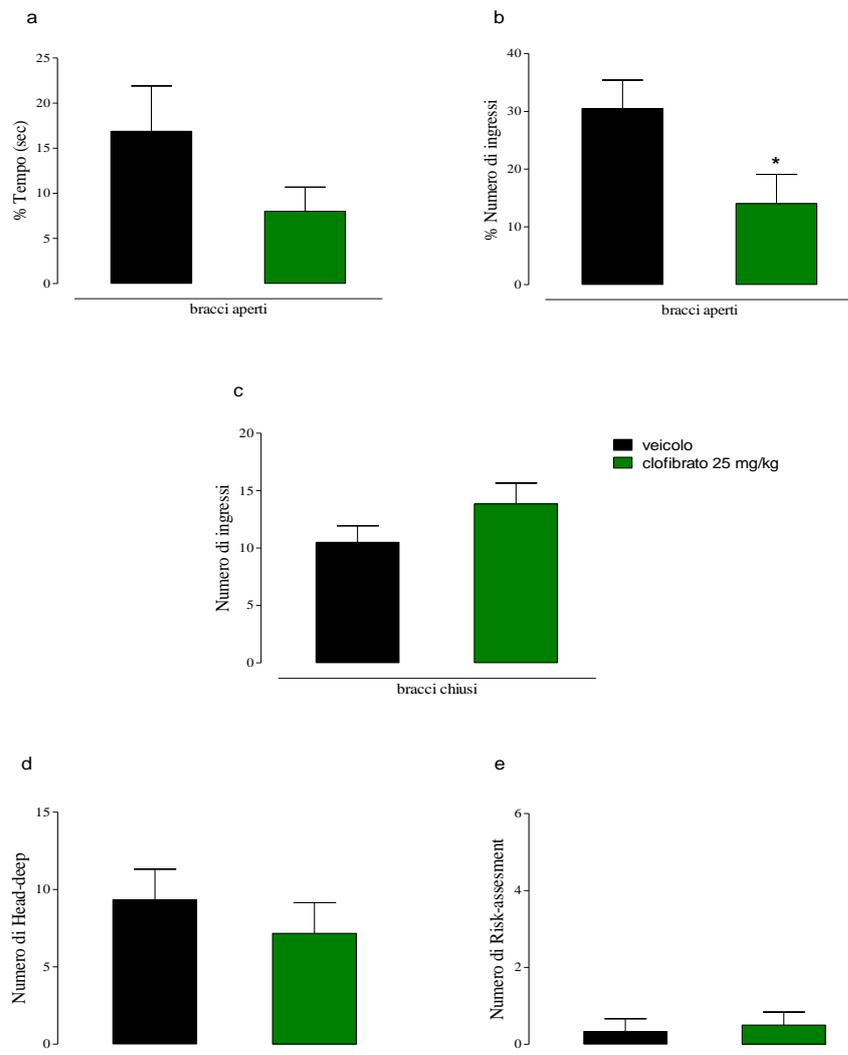


Fig. 14: Effetto del trattamento cronico con l'agonista sintetico dei recettori PPAR α , clofibrato, nel test comportamentale d'ansia elevated plus maze.

I grafici riportano gli effetti del clofibrato (25 mg/kg) nell'elevated plus maze nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n = 6 animali per gruppo). **(a) Percentuale (%) di tempo trascorso nei bracci aperti.** **(b) % Numero di ingressi nei bracci aperti.** * P < 0.05 clofibrato 25mg/kg vs veicolo. **(c) Numero di entrate nei bracci chiusi.** **(d) Numero di head-dipping.** **(e) Numero di risk-assessment;** t Student test.

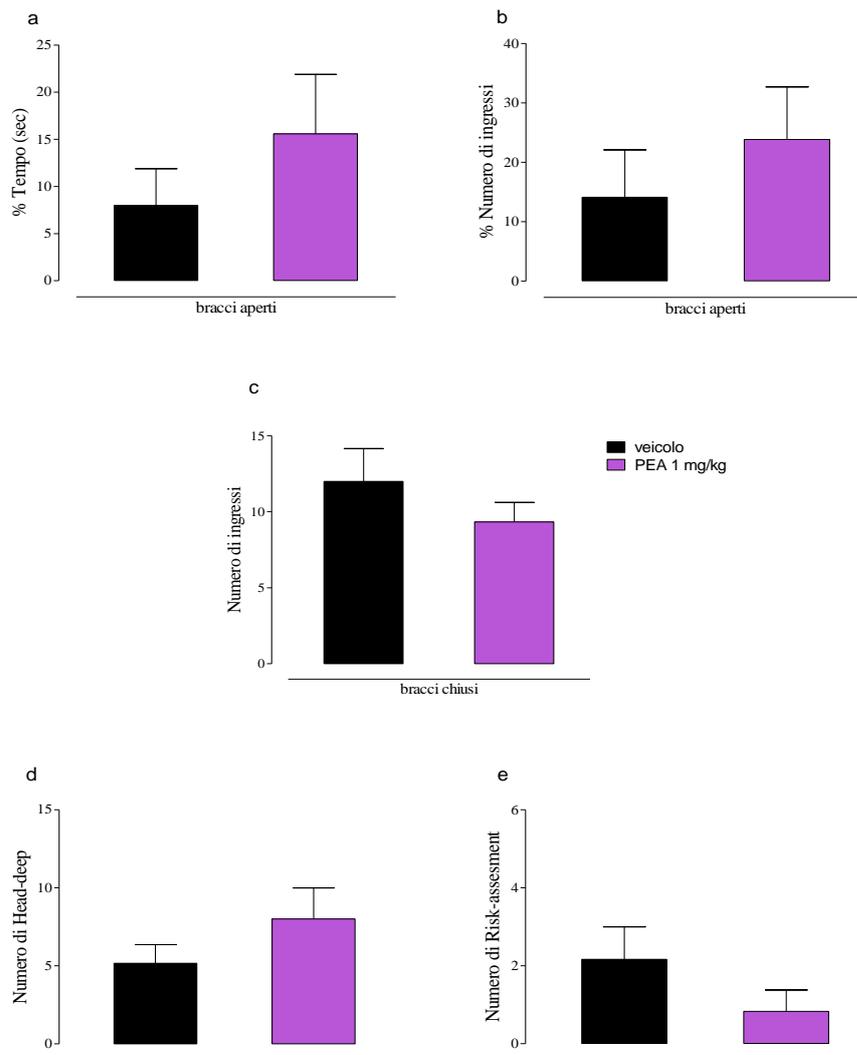


Fig. 15: Effetto del trattamento cronico con l'agonista endogeno dei recettori PPAR α , PEA, nel test comportamentale d'ansia elevated plus maze.

I grafici riportano gli effetti della PEA (1 mg/kg) nell'elevated plus maze nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n = 6 animali per gruppo). (a) Percentuale (%) di tempo trascorso nei bracci aperti. (b) % Numero di ingressi nei bracci aperti. (c) Numero di entrate nei bracci chiusi. (d) Numero di head-dipping. (e) Numero di risk-assesment; t Student test.

2.3.2 Valutazione del trattamento cronico con gli agonisti dei recettori PPAR α , PEA e clofibrato, nel test comportamentale di ansia "interazione sociale".

La Fig. 16. mostra l'effetto del trattamento cronico con clofibrato (25 mg/kg) e PEA (1 mg/kg), nel comportamento dell'animale durante il test di interazione sociale.

Come è possibile osservare dai grafici il trattamento cronico con clofibrato (Fig 16 a-b) (colonna verde) o con PEA (Fig 16 c-d) (colonna azzurra) alle dosi utilizzate non modifica in modo statisticamente significativo il numero di interazioni sociali tra i due conspecifici, così come il tempo trascorso in interazioni sociali rispetto al gruppo di animali trattati con il solo veicolo (colonna nera).

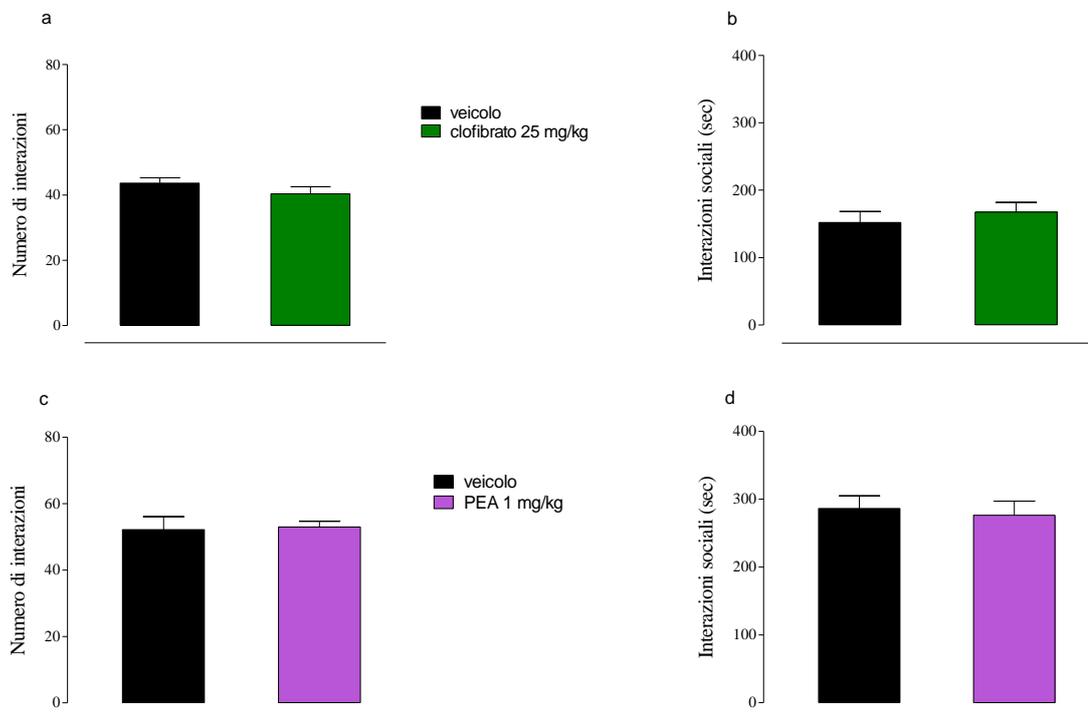


Fig.16. Effetto del trattamento cronico con gli agonisti dei recettori PPAR α , clofibrato e PEA, nel test comportamentale d'ansia d'interazione sociale.

I grafici riportano gli effetti del clofibrato (25 mg/kg) e della PEA (1 mg/kg) nel test d'interazione sociale condotto sul ratto. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM (n = 8/6 animali per gruppo). (a) Numero di interazioni sociali. (b) Tempo trascorso in interazioni sociali; t Student test.

DISCUSSIONE

Lo scopo di questa tesi di dottorato ha avuto come obiettivo principale quello di caratterizzare il profilo farmacologico del clofibrato, agonista sintetico dei recettori PPAR α , mediante l'utilizzo di test comportamentali per la valutazione di attività motoria, ansia e depressione nel ratto dopo diversi regimi di trattamento.

La valutazione dell'attività motoria è stata eseguita come studio preliminare e ha previsto la costruzione di una curva dose risposta per permetterci di individuare dosi del farmaco che potessero provocare effetti comportamentali aspecifici nell'animale e che potessero quindi rappresentare dei falsi positivi o negativi nei test successivi. Si è poi quindi proseguita la sperimentazione con le dosi selezionate (12.5 e 25 mg/kg) non aventi effetti aspecifici sul comportamento motorio dell'animale.

Per lo studio di un possibile profilo antidepressivo dei farmaci, diversi modelli animali utilizzati nella sperimentazione valutano il comportamento simil-depresso indotto da condizioni stressanti basandosi sulla nota associazione riscontrata in clinica tra episodi depressivi ed eventi di vita stressanti.

In particolare il test del nuoto forzato da noi utilizzato, induce nell'animale uno "stato di disperazione" che si manifesta con immobilità nel nuoto e tale immobilità rappresenterebbe una condizione comportamentale simile alla depressione nell'uomo (Carbajal *et al.* 2009). Uno dei principali vantaggi di questa procedura è rappresentata dalla positività del test in oggetto ad una vasta gamma di farmaci antidepressivi delle diverse classi e questo test è considerato dotato di affidabilità e validità predittiva (Porsolt *et al.* 1977 a, b; Steru *et al.* 1985). Il tempo trascorso in immobilità nell'animale

sottoposto al test del nuoto forzato viene marcatamente ridotto dai farmaci efficaci nel trattamento della depressione nell'uomo, come per esempio, fluoxetina, imipramina, amitriptilina e molti altri (Kawashima *et al.* 1986; Castagné *et al.* 2011).

Nel modello di depressione studiato in questo lavoro, la somministrazione subacuta dell'antidepressivo triciclico amitriptilina, come da letteratura, produce un potente effetto antidepressivo (Kawashima *et al.* 1986), osservabile nell'animale trattato, come riduzione del tempo trascorso in immobilità ed aumento del tempo trascorso nel nuoto. La somministrazione subacuta di fluoxetina determina esclusivamente l'aumento del tempo trascorso nel nuoto, in linea con quanto riportato in letteratura sull'effetto della fluoxetina a tale dose e regime di trattamento (Cryan e Lucki 2000, Cryan *et al.* 2002, 2005 a, b).

Il trattamento subacuto con clofibrato induce un effetto antidepressivo-simile osservabile, in maniera del tutto comparabile all'effetto prodotto dall'amitriptilina.

Studi preclinici presenti in letteratura mostrano come la PEA agonista endogeno dei recettori PPAR α produce nel topo un effetto antidepressivo nel test del nuoto forzato e su un modello murino di ansia/depressione indotta dal trattamento cronico con corticosterone. (Yu *et al.* 2011; Crupi *et al.* 2013). Anche nei nostri laboratori sono stati precedentemente ottenuti risultati in tal senso sovrapponibili a quelli dei due lavori sopracitati, non solo dopo trattamento subacuto con PEA ma anche con OEA. A oggi non sono riportati in letteratura né nell'uomo né negli animali di laboratorio dati che dimostrino un eventuale effetto antidepressivo indotto dagli agonisti sintetici di tale recettore utilizzati in clinica per scopi terapeutici molto differenti (dislipidemie).

Diverse evidenze sperimentali hanno negli ultimi anni, ipotizzato un potenziale coinvolgimento del sistema endocannabinoide e del recettore PPAR α nei disturbi psichiatrici come depressione e schizofrenia (Bambico *et al.* 2009; Costa *et al.* 2013). A supporto di ciò uno studio clinico rivela variazioni nei livelli ematici di etanolamidi in donne affette da depressione maggiore, quando sottoposte a situazioni di stress (Hill *et al.* 2009).

Diverse sono le evidenze scientifiche che mettono in relazione recettori PPAR α e sistema endocannabinoide. Tra queste, l'ipotesi che i cannabinoidi possano attivare i PPAR α in modo diretto, comportandosi come degli agonisti (Fu *et al.* 2003; Liu *et al.* 2003; Bouaboula *et al.* 2005; Sun *et al.* 2006; Gasperi *et al.* 2007) ma potrebbero agire anche in modo indiretto, attraverso un legame dei metaboliti cannabinoidi sui recettori PPAR α (Kozak *et al.* 2002). Inoltre, è stato proposto che gli endocannabinoidi una volta legati ai loro recettori specifici sulla superficie della membrana cellulare, possano innescare una cascata di segnali intracellulari che potrebbero ipoteticamente attivare i PPAR α (O'Sullivan 2007) e l'ipotesi attualmente più accreditata sembrerebbe quella del cosiddetto "effetto entourage" secondo cui la PEA potrebbe competere con l'AEA, per il sito di legame con la FAAH, l'enzima responsabile del catabolismo di entrambi i composti endogeni, aumentando in questo modo i livelli di AEA e potenziandone gli effetti (Ho *et al.* 2008).

Sulla base delle evidenze sopraesposte in questo lavoro si è cercato di analizzare il contributo del recettore PPAR α e del sistema endocannabinoide nell'effetto antidepressivo proprio del clofibrato. I risultati ottenuti mostrano un effetto antidepressivo PPAR α -mediato giacché l'effetto è stato totalmente annullato dal

trattamento con l'antagonista specifico dei PPAR α lo MK886. Contrariamente a ciò che avviene in presenza di MK886, l'effetto del clofibrato non viene modificato dall'SR141716A antagonista/agonista inverso dei recettori CB1.

Nei dati riportati in questa tesi, non vi sarebbero quindi, evidenze sperimentali che supportino un'implicazione del sistema endocannabinoide nell'effetto antidepressivo proprio degli agonisti sintetici PPAR α .

Nonostante nei test comportamentali in laboratorio l'effetto antidepressivo di un farmaco sia evidenziabile dopo una somministrazione subacuta (3 somministrazioni nelle 24 ore), in clinica gli antidepressivi necessitano di alcune settimane di somministrazione cronica, minimo due, per produrre un effetto terapeutico sui pazienti depressi (Frazer, 1994).

L'effetto antidepressivo del clofibrato e dell'agonista endogeno PPAR α PEA, dimostrato negli esperimenti precedenti in questa tesi e nei nostri laboratori da un'altra tesi dopo regime subacuto, è stato quindi analizzato anche in seguito a trattamento cronico in parallelo a quello dell'antidepressivo fluoxetina. Sia clofibrato che PEA inducono un potente effetto antidepressivo nel test comportamentale utilizzato dopo trattamento per due settimane consecutive. L'effetto antidepressivo simile della fluoxetina cronica è negli animali più marcato rispetto allo stesso effetto dopo trattamento subacuto, come si può osservare valutando la riduzione del tempo di immobilità e concomitante aumento del tempo trascorso a nuotare (Detke *et al.* 1997).

Sono stati condotti una serie di esperimenti atti alla valutazione della possibile interazione farmacologica tra il clofibrato e ciascuno dei due farmaci antidepressivi di

riferimento studiato nel test del nuoto forzato. Selezionate, con l'aiuto della letteratura ed alcuni esperimenti pilota, dosi che di per se non mostrassero per ciascun farmaco effetti antidepressivi (Cryan *et al.* 2005 a; Martínez-Mota *et al.* 2004), i farmaci oggetto di studio sono stati somministrati in regime di trattamento subacuto, singolarmente e in combinazione (clofibrato+fluoxetina e clofibrato+amitriptilina). È interessante osservare come la cosomministrazione di dosi singolarmente non efficaci di clofibrato e fluoxetina producano un potente effetto antidepressivo, mentre ciò non si manifesta in seguito alla cosomministrazione di clofibrato e amitriptilina. Allo scopo di comprendere meglio quali potessero essere i meccanismi alla base di questa interazione tra i due diversi farmaci e tra i rispettivi recettori e sistemi neuronali, si è valutata cosa era in grado di fare lo specifico antagonista PPAR α , nel revertire l'effetto antidepressivo indotto dalla fluoxetina e dall'amitriptilina.

I risultati ottenuti ci permettono di escludere il possibile coinvolgimento diretto dei recettori PPAR α nell'effetto antidepressivo indotto dai due farmaci di riferimento, ma non permettono di escludere in relazione al differente meccanismo d'azione dei due antidepressivi utilizzati (Tatsumi *et al.* 1997; Gillman 2007) un'ipotetica interazione tra recettore PPAR α e sistema serotoninergico visto il sommarsi degli effetti di clofibrato e fluoxetina quando combinati.

E' ampiamente dimostrata l'esistenza di una correlazione tra una ridotta attività serotoninergica e disturbi affettivi come depressione, disturbo bipolare, disturbi d'ansia e disturbo ossessivo compulsivo (Davis *et al.*, 2002).Farmaci che stimolano l'attività

serotoninergica, in particolare gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), sono efficaci nel migliorare i sintomi di tali disturbi ed i deficit cognitivi ad essi spesso associati (Schmitt *et al.*, 2006). Recentemente evidenze hanno messo in relazione i livelli ematici di triptofano con la sintomatologia depressiva, riportando una stretta correlazione tra ridotti livelli ematici di triptofano, amminoacido precursore della serotonina, ed i sintomi presenti in pazienti affetti da depressione maggiore, in particolare in soggetti non trattati (Ogawa *et al.* 2014). Da tempo è nota la correlazione tra i livelli ematici di triptofano ed i livelli cerebrali di serotonina. Il triptofano si ritrova nel circolo periferico in equilibrio tra la frazione legata alla proteina sierica, albumina, e quella libera. È stato dimostrato che la frazione libera di triptofano rappresenta un fattore importante per l'assorbimento unidirezionale di tale amminoacido nel cervello, pertanto fondamentale nel determinare la sua concentrazione cerebrale (Curzon 1974; Etienne *et al.* 1976; Yuwiler *et al.* 1977) ed il suo catabolismo (Smith e Pogson 1980). La frazione libera di triptofano nel sangue influenza la sintesi della 5-HT (Curzon 1979) infatti, aumenti della frazione libera di tale amminoacido sono stati associati ad un aumento nella sintesi di serotonina a livello cerebrale (Tagliamonte *et al.* 1973; Spano *et al.* 1974 a, b) e tali cambiamenti hanno importanti effetti comportamentali (Young, 1986). Composti endogeni come gli acidi grassi non esterificati, nel particolare l'acido linoleico, oleico e palmitico (Curzon e Knott, 1974 Curzon *et al.* 1973, 1974; Bender *et al.*, 1975), e ligandi esogeni come il composto ipolipemizzante clofibrato (Spano *et al.* 1974 a, b) sono capaci di aumentare la frazione libera di triptofano, e la sintesi di serotonina (Spano *et al.* 1974 a, b). A supporto di tali evidenze uno studio riporta che la somministrazione di clofibrato aumenta significativamente i livelli della frazione libera di triptofano nel sangue di

soggetti depressi rispetto ai soggetti di controllo (Wood e Coppen 1978). In base a queste evidenze risalenti ad anni addietro, nei nostri studi gli effetti riscontrati dopo somministrazione concomitante di clofibrato e fluoxetina a dosaggi non efficaci di per sé, potrebbero essere dovuti ad una capacità dell'agonista PPAR α di potenziare l'effetto antidepressivo indotto dalla fluoxetina favorendo la trasmissione serotoninergica, tramite un aumento dei livelli ematici di triptofano in forma libera.

La caratterizzazione in acuto degli effetti farmacologici dell'agonista endogeno PPAR α , PEA e del sintetico clofibrato, nei modelli animali che permettono di studiare un possibile profilo ansiolitico o ansiogeno, dimostrano che entrambi i composti non inducono alcun effetto comportamentale nel test d'ansia "elevated plus maze". Tale risultato è in linea con risultati ottenuti precedentemente nei nostri laboratori, sugli effetti farmacologici di OEA e PEA nel medesimo test. Mentre negli esperimenti di questa tesi è stato evidenziato dal test di interazione sociale un effetto ansiogeno-simile dose dipendente, caratterizzato da una riduzione del tempo di interazione tra gli animali.

Questo dato da noi riscontrato è confortato dai dati riportati in letteratura dove, la somministrazione acuta di farmaci antidepressivi, in particolare SSRI, inducono un aumento degli stati d'ansia nell'uomo (Goldstein e Goodnick 1998; Masand e Gupta 1999; Spigset 1999; Fergusson *et al.* 2005) e effetto ansiogeno-simile in diversi modelli animali, come il test di interazione sociale (File *et al.* 1999; To e Bagdy 1999; To *et al.* 1999; Bristow *et al.* 2000; Dekeyne *et al.* 2000; Bagdy *et al.* 2001), l' "elevated plus maze" (Silva *et al.* 1999; Silva e Brandao, 2000) e light-dark test (Sánchez e Meier 1997; Artaiz *et al.* 1998). La diretta stimolazione dell'amigdala evoca effetti ansiogeni nel test di interazione sociale (Higgins *et al.* 1991), effetto prodotto anche dalla stimolazione di una specifica

porzione dell'amigdala, la zona basolaterale (BLA) (Gonzalez *et al.* 1996). Tali effetti, non sono rilevati nel test di "elevated plus maze", indicando che i due test comportamentali potrebbero evocare stati di ansia differenti e che questi potrebbero essere mediati dall'attivazione di diverse aree cerebrali (Gonzalez *et al.* 1996). A supporto di tale ipotesi Campolongo e colleghi (2009) riportano che la somministrazione periferica dell'OEA, agonista endogeno PPAR α , favorisce il consolidamento mnemonico, ma non produce effetti sul comportamento ansioso nel test del campo aperto "open field" e nel test di "elevated plus maze". L'effetto sul consolidamento mnemonico è risultato essere PPAR α -mediato, come dimostrato dalla somministrazione dell'antagonista sintetico GW7647 e dal mancato effetto in topi PPAR α *-/-*, inoltre ipotizzano che l'effetto indotto da OEA sia legato ad una indiretta attivazione del BLA. Pertanto tali evidenze potrebbero spiegare il differente risultato ottenuto nei due test, utilizzati nel nostro studio per la valutazione degli effetti degli agonisti dei recettori PPAR α nei test d'ansia. Risultati simili sono stati ottenuti anche nello studio di Mazzola e colleghi (2009) nel quale la somministrazione di URB597, inibitore della FAAH aumenta la memoria e la sua acquisizione con meccanismo PPAR α -mediato, evidenziato tramite trattamento con l'agonista sintetico PPAR α , WY14643 e antagonizzato da MK886.

Poiché nella pratica clinica alcuni antidepressivi come gli SSRI vengono utilizzati non solo nella terapia del disturbo depressivo ma anche nella terapia dei disturbi d'ansia (Sheehan *et al.* 1993; van der Kolk *et al.* 1994; Stokes e Holtz, 1997; Kent *et al.* 1998; Bezchlibnyk-Butler *et al.* 2000; Bondareff *et al.* 2000; Stahl, 2000; Gorman, 2003) in questa tesi abbiamo voluto valutare il trattamento cronico con l'agonista endogeno PPAR α , PEA e il sintetico clofibrato nei test d'ansia dell' "elevated plus maze" e dell'interazione sociale

dopo trattamento cronico. Anche in questo caso i farmaci sono stati in precedenza testati dal punto di vista dei loro possibili effetti motori in modo da evitare dosi che determinassero degli handicap motori. I risultati riportano che entrambi gli agonisti dei recettori PPAR α , alle dosi utilizzate in cronico, non modificano i parametri valutati nel test motorio.

Contrariamente a quanto da noi riportato, Crupi e colleghi 2013 hanno dimostrato che la somministrazione cronica di PEA produce ansiolisi nel modello ansia/depressione indotto farmacologicamente. Nello stesso lavoro sono riportati nell'ippocampo degli animali trattati con PEA effetti neurotrofici con proliferazione neuronale, formazione di nuove spine dendritiche, aumento del BDNF, aumento di fattori anti-apoptotico. É del resto noto che l'ippocampo rappresenta un area cerebrale che svolge un'azione neuro protettiva contro gli insulti dati da stress, mantenendo il tono inibitorio GABAergico mentre la diminuzione di questo neurotrasmettitore è associata a depressione (Nestler *et al.* 2002 b) che a sua volta è caratterizzata anche da decremento di neurogenesi ippocampale e ridotti livelli di BDNF.

Letteratura recente riporta che la somministrazione in animali di laboratorio di URB597 induca un effetto ansiolitico (Saito *et al.* 2010; Kathuria *et al.* 2003; Haller *et al.* 2009; Micale *et al.* 2009; Moreira *et al.* 2008) e antidepressivo (Gobbi *et al.* 2005; Bortolato *et al.* 2007). In particolare l'effetto antidepressivo osservato nel test del nuoto forzato e nel test di sospensione della coda nei roditori, si associa ad un aumento nei livelli di AEA e PEA e concomitante aumento della trasmissione noradrenergica e serotoninergica (Gobbi *et al.* 2005). Uno studio condotto allo scopo di valutare gli effetti delle etanolamidi sulla regolazione dei cicli sonno-veglia riporta che la microiniezione di URB597, OEA e PEA nel

nucleo dorsale del rafe oltre a favorire lo stato di veglia, aumenta l'immunoreattività per c-fos, indice di intensa attività serotoninergica (Murillo-Rodriguez *et al.* 2007). Insieme queste evidenze suggeriscono l'ipotesi di meccanismi neurochimici e neurotrofici alla base degli effetti sullo stato di vigilanza, antidepressivo e ansiolitico-simile indotto dagli agonisti PPAR α . Meccanismi neurochimici, in particolare un potenziamento della trasmissione monoamminergica, e neurotrofici rappresentano la base dell'effetto antidepressivo dei farmaci utilizzati nel trattamento clinico della depressione (Schmitt *et al.* 2006; Numakawa *et al.* 2010).

Vi sono evidenze che indicano che la depressione possa essere associata ad alterazioni del sistema immunitario/infiammatorio (Dantzer *et al.* 2008; Haroon *et al.* 2012; Raison *et al.* 2006). Un aumento della concentrazione di citochine pro-infiammatorie comprese interleuchina (IL) -6 e fattore di necrosi tumorale (TNF) - α così come dei loro recettori si riscontrano alterate nel sangue e nel fluido cerebrospinale di pazienti depressi (Dowlati *et al.* 2010). L'attivazione della risposta infiammatoria sembrerebbe essere correlata non solo agli stati depressivi, ma anche a quelli ansiosi (Hayley *et al.* 2005; Hritcu e Gorman 2014; Raison *et al.* 2006). Sia i fattori di stress cronico che l'attivazione immunitaria infiammatoria, contribuiscono alla fisiopatologia e alle alterazioni comportamentali associate al disturbo depressivo, infatti, studi clinici indicano che i fattori di stress cronico inducono non solo alterazioni comportamentali associate alla depressione maggiore, ma anche l'attivazione della risposta infiammatoria. Lo stress cronico nell'animale di laboratorio provoca un comportamento depressivo-simile e la produzione di citochine pro-infiammatorie (Knapp *et al.* 2011; Shizuya *et al.* 1997, 1998; You *et al.* 2011; Grippo *et*

al. 2005). Allo stesso modo il nuoto forzato, che rappresenta un modello su cui studiare l'effetto degli antidepressivi, provoca un aumento dei livelli di TNF- α e IL-6 negli animali di laboratorio (Guan *et al.* 2014; Connor *et al.* 1997, 1998). Viceversa esistono dati preclinici che dimostrano come la risposta infiammatoria indotta dalla somministrazione dell'endotossina batterica lipopolisaccaride (LPS) produca comportamenti depressivo-simili nei roditori (Kang *et al.* 2011; O'Connor *et al.* 2009), suggerendo una correlazione tra la risposta infiammatoria e gli stati depressivi. Il trattamento con antidepressivi oltre a riportare alla normalità i tratti depressivi comportamentali indotti dall'endotossina batterica, normalizza i livelli di citochine pro-infiammatorie (Castanon 2002; Reynolds *et al.* 2005; Xia 1996; Kaster 2012). È noto che gli agonisti naturali dei recettori PPAR α OEA che PEA possiedono proprietà analgesiche ed antinfiammatorie (Lo Verme *et al.* 2005 a; Suardiaz *et al.* 2007). In particolare, la PEA è una potente molecola antinfiammatoria capace di ridurre significativamente i livelli di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-1 (IL-1), il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), la cicloossigenasi-2 (COX-2), e l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) (Ramanan *et al.* 2008). Alcuni studi riportano che anche l'attivazione dei PPAR α da parte di agonisti sintetici come WY14643, clofibrato e fenofibrato, sopprimerebbe le risposte infiammatorie gliali indotte da LPS espressa sulla membrana batterica. (Lee *et al.* 2005; Paintlia *et al.* 2008 a, b; Xu *et al.* 2005, 2006, 2007). Inoltre, è stato osservato che l'alterazione nello sviluppo degli oligodendrociti, nel cervello fetale, causato dall'esposizione materna alla tossina batterica LPS, sia prevenuta dall'attivazione di PPAR α (Paintlia *et al.* 2008 a, b). In particolare uno studio riporta che la somministrazione sistemica di Wy-14643 e fenofibrato è in grado di aumentare l'attivazione del recettore PPAR α e di aumentare i livelli di mRNA per esso codificante a

livello cerebrale. La somministrazione di LPS a livello cerebrale riduce i livelli di mRNA codificante PPAR α e aumenta i livelli di molecole proinfiammatorie (TNF- α , IL-1, IL-6, iNOS, and COX-2) e di mRNA per proteine di adesione cellulare (ICAM-1, VCAM-1, and PECAM-1). Tale effetto viene revertito dalla somministrazione sistemica di Wy-14643 e fenofibrato (Wang e Namura 2011).

BIBLIOGRAFIA

Abramovits W, Perlmutter A. Steroids versus other immune modulators in the management of allergic dermatoses. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2006). 6(5):345-354

Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signalling in the nervous system. *Chem Rev.* (2008). 108(5):1687-707. Review.

Alexander SP, Kendall DA. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br J Pharmacol.* (2007). 152(5):602-23. Review.

Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions.* (1993) ;39 Spec.

Ambrogini P, Orsini L, Mancini C, Ferri P, Barbanti I, Cuppini R. Persistently high corticosterone levels but not normal circadian fluctuations of the hormone affect cell proliferation in the adult rat dentate gyrus. *Neuroendocrinology.* (2002). 76(6):366-72.

Artaiz I, Zazpe A, Del Río J. Characterization of serotonergic mechanisms involved in the behavioural inhibition induced by 5-hydroxytryptophan in a modified light-dark test in mice. *Behav Pharmacol.* (1998). 9(2):103-12.

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* (1997). 46(8):1319-27.

Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J Biol Chem* (1965). 240:1019-24.

Bagdy G, Graf M, Anheuer ZE, Modos EA, Kantor S. Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol.* (2001). 4(4):399-408.

Bambico FR, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Gobbi G. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. *Curr. Pharm. Des.* (2009). 15(14) 1623-1646.

Bardot O, Aldridge TC, Latruffe N, Green S. PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun.* (1993). 192(1):37-45.

Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* (2006). 116(3):590-7. Review

Bateson MC, Maclean D, Ross PE, Bouchier IA. Clofibrate therapy and gallstone induction. *Am J Dig Dis.* (1978). 23(7):623-8.

Bender DA, Boulton AP, Coulson WF. A simple method for the study of tryptophan binding to serum albumin by small-scale equilibrium dialysis: application to animal and human studies. *Biochem Soc Trans.* (1975). 3(1):193-4.

Bento-Abreu A, Tabernero A, Medina JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. *J Neurochem.* (2007). 103(3):871-81.

Benvenuti F, Lattanzi F, De Gori A, Tarli P. Activity of some derivatives of palmitoylethanolamide on carragenine-induced edema in the rat paw. *Boll Soc Ital Biol Sper.* (1968). 44(9):809-13.

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* (2002). 53, 409-435.

Bezchlibnyk-Butler K, Aleksic I, Kennedy SH. Citalopram—a review of pharmacological and clinical effects. *J Psychiatry Neurosci.* (2000). 25(3):241-54.

Blumstein LK, Crawley JN. Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* (1983). 18(1):37-40.

Bondareff W, Alpert M, Friedhoff AJ, Richter EM, Clary CM, Batzar E. Comparison of sertraline and nortriptyline in the treatment of major depressive disorder in late life. *Am J Psychiatry.* (2000). 157(5):729-36.

Borrelli F, Aviello G, Romano B, Orlando P, Capasso R, Maiello F, Guadagno F, Petrosino S, Capasso F, Di Marzo V, Izzo AA. Cannabidiol, a safe and non-psychotropic ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *J Mol Med (Berl).* (2009). 87(11):1111-21.

Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry.* (2007). 62(10):1103-10.

Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPAR gamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol.* (2005). 517(3):174-81.

Bouchard JF, Lépicier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci.* (2003). 72(16):1859-70.

Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*. (2002). 298(5599):1793-6.

Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR α , β , and δ in the adult rat. *Endocrinology*. (1996). 137(1):354-66.

Bristow LJ, O'Connor D, Watts R, Duxon MS, Hutson PH. Evidence for accelerated desensitisation of 5-HT_{2C} receptors following combined treatment with fluoxetine and the 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY 100,635, in the rat. *Neuropharmacology*. (2000). 39(7):1222-36.

Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. (2007). 152(5):567-75. Review.

Brown PJ, Winegar DA, Plunket KD, Moore LB, Lewis MC, Wilson JG, Sundseth SS, Koble CS, Wu Z, Chapman JM, Lehmann JL, Kliewer SA, Willson TM. A ureido-thioisobutyric acid (GW9578) is a subtype-selective PPAR alpha agonist with potent lipid-lowering activity. *J. Med. Chem.*(1999). 42(19):3785-8

Brooks DA, Etgen GJ, Rito CJ, Shuker AJ, Dominianni SJ, Warshawsky AM, Ardecky R, Paterniti JR, Tyhonas J, Karanewsky DS, Kauffman RF, Broderick CL, Oldham BA, Montrose-Rafizadeh C, Winneroski LL, Faul MM, McCarthy JR. Design and synthesis of 2-methyl-2-[4-(2-[5-methyl-2-aryloxazol-4-yl]ethoxy)phenoxy]propionic acids: a new class of dual PPAR alpha/gamma agonists. *J Med Chem.*(2001). 44(13):2061-4.

Brunton L, Chabner B, Knollman B, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics ed., McGraw-Hill Professional, 17 dicembre 2010, p. 1808, ISBN978-0-07-162442-8.

Burns KA, Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*.(2007). 1771(8):952-60.

Cabrero A, Llaverías G, Roglans N, Alegret M, Sánchez R, Adzet T, Laguna JC, Vázquez M. Uncoupling protein-3 mRNA levels are increased in white adipose tissue and skeletal muscle of bezafibrate-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun*. (1999). 260(2):547-56.

Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci*. (1997). 17(4):1226-42.

Cadas H, Schinelli S, Piomelli D. Membrane localization of N-acyl phosphatidylethanolamine in central neurons: studies with exogenous phospholipases. *J Lipid Mediate Cell Signal*. (1996). 14(1-3):63-70

Calignano A, La Rena G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. (1998). 394(6690):277-81.

Calignano A, La Rena G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol*. (2001). 419(2-3):191-8.

Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Cuomo V, Astarita G, Fu J, McGaugh JL, Piomelli D. Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. (2009). 106(19), 8027-8031.

Capasso R, Izzo AA, Fezza F, Pinto A, Capasso F, Mascolo N, Di Marzo V. Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br J Pharmacol*. (2001). 134(5):945-50.

Carbajal D, Ravelo Y, Molina V, Mas R, Arruzazabala Mde L. D-004, a lipid extract from royal palm fruit, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. (2009). 92(3):465-8.

Carey MP and Fry JP. An evaluation of light aversion as a measure of anxiolytic benzodiazepine activity in the mouse. *Eur J Neurosci Suppl.* (1988). 343.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* (2005). 29:1193–205.

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

Castanon N, Leonard BE, Neveu PJ, Yirmiya R. Effects of antidepressants on cytokine production and actions. *Brain Behav Immun.* (2002). 16(5):569-74.

Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab.* (2008). 19(8):300-7.

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* (1998). 273(40):25573-80.

Chourbaji S, Urani A, Inta I, Sanchis-Segura C, Brandwein C, Zink M, Schwaninger M, Gass P. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis.* (2006). 23(3):587-94.

Cimini A, Benedetti E, Cristiano L, Sebastiani P, D'Amico MA, D'Angelo B, DiLoreto S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience.* (2005). 130(2):325-37.

Citraro R, Russo E, Scicchitano F, van Rijn CM, Cosco D, Avagliano C, Russo R, D'Agostino G, Petrosino S, Guida F, Gatta L, van Luijtelaar G, Maione S, Di Marzo V, Calignano A, De Sarro G. Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*. (2013). 69:115-26.

Connor TJ, Kelly JP, Leonard BE. Forced swim test-induced neurochemical endocrine, and immune changes in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. (1997). 58(4):961-7.

Connor TJ, Kelly JP, Leonard BE. Forced swim test-induced endocrine and immune changes in the rat: effect of subacute desipramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav*. (1998). 59(1):171-7.

Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol*. (2002). 135(1):181-7.

Coppola M, Mondola R. Is there a role for palmitoylethanolamide in the treatment of Depression? *Med Hypotheses*. (2014). 82(5):507-11.

Costa M, Squassina A, Congiu D, Chillotti C, Niola P, Galderisi S, Pistis M, Del Zompo M. Investigation of endocannabinoid system genes suggests association between peroxisome proliferator activator receptor- α gene (PPARA) and schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. (2013). 23(7):749-59.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. (1996). 384(6604):83-7.

Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2004). 101(29):10821-6.

Crawley JN, Blumstein LK, Baldino F Jr. Anxiolytic-like properties of fominoben. *Eur J Pharmacol.* (1984). 97(3-4):277-81.

Crupi R, Paterniti I, Ahmad A, Campolo M, Esposito E, Cuzzocrea S. Effects of palmitoylethanolamide and luteolin in an animal model of anxiety/depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* (2013). 12(7):989-1001.

Cryan JF, Lucki I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* (2000). 295(3):1120-6.

Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* (2002). 23(5):238-45. Review.

Cryan JF, Page ME, Lucki I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl).* (2005 a). 182(3):335-44

Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev.*(2005 b). 29(4-5):547-69. Review.

Curzon G. Availability of tryptophan to the brain and some hormonal and drug influences on it. *Adv Biochem Psychopharmacol.* (1974). 10:263-71. Review.

Curzon G, Friedel J, Katamaneni BD, Greenwood MH, Lader MH Unesterified fatty acids and the binding of tryptophan in human plasma. *Clin Sci Mol Med.* (1974). 47(5):415-24.

Curzon G, Friedel J, Knott PJ. The effect of fatty acids on the binding of tryptophan to plasma protein. *Nature.* (1973). 242(5394):198-200.

Curzon G, Knott PJ. Effects on plasma and brain tryptophan in the rat of drugs and hormones that influence the concentration of unesterified fatty acid in the plasma. *Br J Pharmacol.*(1974). 50(2):197-204.

Curzon G. Relationships between plasma, CSF and brain tryptophan. *J Neural Transm Suppl.*(1979);(15):81-92.

D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid- β 25-35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacology.* (2012). 37(7):1784-92.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* (2008). 9(1):46-56.

Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemerhoff C. (Eds.), Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. *American College of Neuropsychopharmacology.* (2002).

Dekeyne A, Denorme B, Monneyron S, Millan MJ. Citalopram reduces social interaction in rats by activation of serotonin (5-HT)_{2C} receptors. *Neuropharmacology.* (2000). 39(6):1114-7.

De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V. Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. *FEBS Lett.* (2001). 506(3):253-6

Desarnaud F, Cadas H, Piomelli D. Anandamide amido hydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J Biol Chem.* (1995). 270(11):6030-5.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* (1999). 20(5),649-688.

Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol.* (1997). 5(2):107-12.

Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res.* (1996). 73(1-2):43-6. Review.

Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* (1996). 384(6604):39-43.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* (1994). 372(6507):686-91.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* (2010). 67(5):446-57.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* (1992). 68(5):879-87.

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* (2006). 15;59(12):1116-27. Review.

Ericsson CG, Nilsson J, Grip L, Svane B, Hamsten A. Effect of bezafibrate treatment over five years on coronary plaques causing 20% to 50% diameter narrowing (the bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial [BECAIT]). *Am. J. Cardiol.* (1997). 80(9):1125-9.

Esciva H, Langlois MC, Mendonça RL, Pierce R, Laudet V. Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci.* (1998). 15;839:143-6.

Esposito E, Paterniti I, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. GW0742, a high-affinity PPAR- δ agonist, mediates protection in an organotypic model of spinal cord damage. *Spine (Phila Pa 1976).* (2012). 37(2):E73-8.

Etgen GJ, Oldham BA, Johnson WT, Broderick CL, Montrose CR, Brozinick JT, Misener EA, Bean JS, Bensch WR, Brooks DA, Shuker AJ, Rito CJ, McCarthy JR, Ardecky RJ, Tyhonas JS, Dana SL, Bilakovics JM, Paterniti JR Jr, Ogilvie KM, Liu S, Kauffman RF. A tailored therapy for the metabolic syndrome: the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist LY465608 ameliorates insulin resistance and diabetic hyperglycemia while improving cardiovascular risk factors in preclinical models. *Diabetes*. (2002). 51(4):1083-7

Etienne P, Young SM, Sourkes TL. Inhibition by albumin of tryptophan uptake by rat brain. *Nature*.(1976). 262(5564):144-5.

Farquhar-Smith WP, Rice AS. Administration of endocannabinoids prevents a referred hyperalgesia associated with inflammation of the urinary bladder. *Anesthesiology*. (2001). 94(3):507-13

Farquhar-Smith WP, Rice AS. A novel neuroimmune mechanism in cannabinoid-mediated attenuation of nerve growth factor-induced hyperalgesia *Anesthesiology*. (2003). 99(6):1391-401.

Fergusson D, Doucette S, Glass KC, Shapiro S, Healy D, Hebert P, Hutton B. Association between suicide attempts and selective serotonin reuptake inhibitors: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ*. (2005) Feb 19;330(7488):396. Review.

Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*. (2004). 53 Suppl 1, S43-50.

File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*. (1978). Jan;62(1):19-24.

File SE, Ouagazzal AM, Gonzalez LE, Overstreet DH. Chronic fluoxetine in tests of anxiety in rat lines selectively bred for differential 5-HT_{1A} receptor function. *Pharmacol Biochem Behav*. (1999). 62(4):695-701.

File SE, Seth P. A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol.* (2003). 463(1-3):35-53. Review.

Forman BM, Chen J, Evans RM,. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997) 94:4312-4317.

Fournier N, Tuloup-Minguez V, Pourci ML, Théron P, Jullian JC, Wien F, Leroy M, Dallongeville J, Paul JL, Leroy A. Fibrate treatment induced quantitative and qualitative HDL changes associated with an increase of SR-BI cholesterol efflux capacities in rabbits *Biochimie.* (2013). 95(6):1278-87.

Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol.* (2003). 65:261-311. Review.

Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci.* (2003). 23(21):7767-75.

Frazer A. Antidepressant drugs. *Depression.* (1994)2: 1–19

Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, Mäenpää H, Mälkönen M, Mänttari M, Norola S, Pasternack A, Pikkarainen J, Romo M, Sjöblom T, Nikkilä EA. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med.* (1987). 317(20):1237-45.,

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F *et al.* Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* (2003). 425:90-93.

Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*. (2005). 48(8):1147-53.

Gaetani S, Oveisi F, Piomelli D. Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamide. *Neuropsychopharmacology*. (2003). 28(7):1311-6.

Galan-Rodriguez B, Suarez J, Gonzalez-Aparicio R, Bermudez-Silva FJ, Maldonado R, Robledo Pet al. Oleoylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology*. (2009). 56:653-664.

Ganley OH, Graessle OE, Robinson HJ: Anti-inflammatory activity of compounds obtained from egg yolk, peanut oil and soybean lecithin. *J Lab Clin Med* (1958). 51(5):709-14.

Gardner OS, Dewar BJ, Graves LM. Activation of mitogen activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: an example of non genomic signaling. *Mol. Pharmacol*. (2005). 68(4), 933-941.

Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agrò AF, Maccarrone M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci*. (2007). 64(2):219-29.

Ghafouri N, Ghafouri B, Larsson B, Stensson N, Fowler CJ, Gerdle B. Palmitoylethanolamide and stearoylethanolamide levels in the interstitium of the trapezius muscle of women with chronic widespread pain and chronic neck-shoulder pain correlate with pain intensity and sensitivity. *Pain*. (2013). 154(9):1649-58.

Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol*. (2007). 151(6):737-48.

- Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M *et al.* Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2005). 102:18620-18625
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2009). 89(3-4):105-11.
- Goldstein BJ, Goodnick PJ. Selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of affective disorders--III. Tolerability, safety and pharmacoeconomics. *J Psychopharmacol.* (1998). 12(3 Suppl B):S55-87. Review.
- Gonzalez LE, Andrews N, File SE. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res.* (1996). 732(1-2):145-53.
- Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992). 89(10):4653-7.
- Gorman JM. Treating generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry.* (2003). 64 Suppl 2:24-9. Review.
- Green S, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: finding the orphan a home. *Mol Cell Endocrinol.* (1994). 100(1-2):149-53
- Grippe AJ, Francis J, Beltz TG, Felder RB, Johnson AK. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav.* (2005).13;84(5):697-706.
- Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* (1998). 81(4A):18B-25B.

Guan XT, Shao F, Xie X, Chen L, Wang W. Effects of aspirin on immobile behavior and endocrine and immune changes in the forced swimming test: comparison to fluoxetine and imipramine. *Pharmacol Biochem Behav.* (2014). 124:361-6.

Guy AP, Gardner CR. Pharmacological characterisation of a modified social interaction model of anxiety in the rat. *Neuropsychobiology.* (1985). 13(4):194-200.

Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem.* (2004). 279(27):27849-54.

Haller J, Barna I, Barsvari B, Gyimesi Pelczér K, Yasar S, Panlilio LV, Goldberg S. Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology* (2009). 204(4):607-16.

Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem.* (1998). 70(2):671-6.

Hansen HS, Diep TA. N-acylethanolamines, anandamide and food intake. *Biochem Pharmacol.* (2009). 78(6):553-60. Review

Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology.* (2012). 37(1):137-62.

Hawke RL, Chapman JM, Winegar DA, Salisbury JA, Welch RM, Brown A, Franzmann KW, Sigel C. Potent hypocholesterolemic activity of novel ureido phenoxyisobutyrate correlates with their intrinsic fibrate potency and not with their ACAT inhibitory activity. *J Lipid Res.* (1997). 38(6):1189-203

Hayley S, Poulter MO, Merali Z, Anisman H. The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*. (2005). 135(3):659-78.

Helyes Z, Németh J, Thán M, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci*. (2003). 73(18):2345-53.

Heneka MT, Landreth GE, Hüll M. Drug insight: effects mediated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in CNS disorders. *Nat Clin Pract Neurol*. (2007). 3(9):496-504. Review.

Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J. Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J. Biol. Chem*. 1995. 270(22):13470-5.

Higgins GA, Jones BJ, Oakley NR, Tyers MB. Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. (1991);104(4):545-51.

Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*. (2009). 34(8):1257-62

Hillard CJ, Edgemond WS, Campbell WB. Characterization of ligand binding to the cannabinoid receptor of rat brain membranes using a novel method: application to anandamide. *J Neurochem*. (1995). 64(2):677-83

Hirschfeld RM. The Comorbidity of Major Depression and Anxiety Disorders: Recognition and Management in Primary Care. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. (2001). 3(6):244-254.

Ho WS, Barrett DA, Randall MD. 'Entourage' effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* (2008). 155(6):837-46.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* (1996). 54(1):21-30. Review.

Hritcu L, Gorgan LD. Intranigral lipopolysaccharide induced anxiety and depression by altered BDNF mRNA expression in rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2014). 51:126-32

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* (1990). 347(6294):645-50.

Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther.* (2010). 126(1):21-38.

Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain.* (1998). 76(1-2):189-99.

Jun M, Foote C, Lv J, Neal B, Patel A, Nicholls SJ, Grobbee DE, Cass A, Chalmers J, Perkovic V. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* (2010). 375(9729):1875-84.

Kahlich R, Klíma J, Cihla F, Franková V, Masek K, Rosický M, Matousek F, Bruthans J. Studies on prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin) in acute respiratory infections. Serologically controlled field trials. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* (1979). 23(1):11-24.

Kang A, Hao H, Zheng X, Liang Y, Xie Y, Xie T, Dai C, Zhao Q, Wu X, Xie L, Wang G. Peripheral anti-inflammatory effects explain the ginsenosides paradox between poor brain distribution and anti-depression efficacy. *J Neuroinflammation*. (2011). 8:100.

Kaster MP, Gadotti VM, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology*. (2012). 62(1):419-26.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. (2003). 9(1):76-81.

Kawashima K, Araki H, Aihara H. Effect of chronic administration of antidepressants on duration of immobility in rats forced to swim. *Jpn J Pharmacol*. (1986). 40(2):199-204.

Kehrer JP, Biswal SS, La E, Thuillier P, Datta K, Fischer SM, Vanden Heuvel JP. Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) α by MK886. *Biochem J*. (2001) 15;356(Pt 3):899-906.

Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1993). 90(6):2160-4.

Kent JM, Coplan JD, Gorman JM. Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biol Psychiatry*. (1998). 44(9):812-24. Review.

Keppel Hesselink JM, Hekker TA. Therapeutic utility of palmitoylethanolamide in the treatment of neuropathic pain associated with various pathological conditions: a case series. *J Pain Res*. (2012). 5: 437–442.

Keppel Hesselink JM, de Boer T, Witkamp R. Palmitoylethanolamide: a natural body-own anti-inflammatory agent, effective and safe against influenza and common cold. *Int J Inflamm*. (2013) 2013:151028. Review

Keppel Hesselink JM. Chronic idiopathic axonal neuropathy and pain, treated with the endogenous lipid mediator palmitoylethanolamide: a case collection. *Int Med Case Rep J.* (2013). 6:49-53.

Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res.* (2008);2008:132960.

Kessler RC. The costs of depression. *Psychiatr Clin North Am.* (2012). 35(1):1-14.

Kessler RC, Angermeyer M, Anthony JC, DE Graaf R, Demyttenaere K, Gasquet I, DE Girolamo G, Gluzman S, Gureje O, Haro JM, Kawakami N, Karam A, Levinson D, Medina Mora ME, Oakley Browne MA, Posada-Villa J, Stein DJ, Adley Tsang CH, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Lee S, Heeringa S, Pennell BE, Berglund P, Gruber MJ, Petukhova M, Chatterji S, Ustün TB. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry.* (2007).6(3):168-76.

Khan SA, Vanden Heuvel JP. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review), *J Nutr Biochem.* (2003) 14(10):554-67.

Kircik L. A nonsteroidal lamellar matrix cream containing Palmitoylethanolamide for the treatment of atopic dermatitis. *J Drugs Dermatol.* (2010). 9(4):334-8.

Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble C, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997). 29;94(9):4318-23.

Knapp DJ, Whitman BA, Wills TA, Angel RA, Overstreet DH, Criswell HE, Ming Z, Breese GR. Cytokine involvement in stress may depend on corticotrophin releasing factor to sensitize ethanol withdrawal anxiety. *Brain Behav Immun.* (2011). 25 Suppl 1:S146-54.

- Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J. Biol. Chem.* (2002). 277(26), 23278-23286.
- Krook A, Digby J, O'Rahilly S, Zierath JR., Wallberg-Henriksson H. Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes* (1998). 47(9):1528-31.
- Kuehl FA Jr, Jacob TA, Ganley OH, Ormond RE., Meisinger MA P. The identification of N-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. *J Am Chem Soc* (1957).79(19):5577-5578.
- Kupfer D, Frank E, Phillips ML. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspective. *Lancet.* (2012). 379(9820):1045-55.
- Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem.* (1999). 6: 757–773.
- Lambert DM, Muccioli GG. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new molecular players. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* (2007). 10(6):735-44. Review.
- Lambert DM, Vandevoorde S, Diependaele G, Govaerts SJ, Robert AR. Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia.* (2001). 42(3):321-7.
- Lee JH, Joe EH, Jou I. PPAR-alpha activators suppress STAT1 inflammatory signaling in lipopolysaccharide-activated rat glia. *Neuroreport.* (2005). 16(8):829-33.
- Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol.*(1995) Jun;15(6):3012-22.

Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* (2006). 116(3):571-80.

Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci.* (1996). 19(11):514-520.

Libby P, Hansson GK, Pober J. Atherogenesis and inflammation. In: *Chien KR, ed. Mol. Basis Cardiovasc. Dis.* (1999). 349–366.

Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* (2002). 302(1):73-9.

Liu J, LiH, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD. Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol. Pharmacol.* (2003). 63(5), 983-992.

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A *et al.* The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol.* (2005 a). 67:15-19.

Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci.* (2005 b). 62: 708–716.

LoVerme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* (2005). 77(14):1685-98. Review.

Malmendier CL, Lontie JF, Delcroix C, Dubois DY, Magot T, De Roy L. Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration. *Atherosclerosis* (1989). 77(2-3):139-49.

Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci.* (2004). 61(4):393-416.

Marcus M, Taghi Yasamy M, van Ommeren M, Chisholin D, Saxena S. Depression. A global public health concern; 2013. http://www.who.int/mental_health/management/depression/who_paper_depression_w_fmh_2012.pdf

Martínez-Mota L, Fernández-Guasti A. Testosterone-dependent antidepressant-like effect of noradrenergic but not of serotonergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav.* (2004). 78(4):711-8.

Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPAR alpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation.* (1999). 99(24):3125-31.

Masand PS, Gupta S. Selective serotonin-reuptake inhibitors: an update. *Harv Rev Psychiatry.* (1999). 7(2):69-84. Review.

Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S *et al.* Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol Psychiatry.* (2011). 69:633-641.

Masek K, Perlík F, Klíma J, Kahlich R. Prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin) in acute respiratory tract infections. *Eur J Clin Pharmacol.* (1974). 7(6):415-419.

Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn. Mem.* (2009). 16(5), 332-337.

McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, Bradshaw HB. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci.* (2010). 11:44.

Melis M, Carta S, Fattore L, Tolu S, Yasar S, Goldberg SR *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors- α modulate dopamine cell activity through nicotinic receptors. *Biol Psychiatry.* (2010). 68:256-264.

Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR *et al.* Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci.* (2008). 28:13985-13994.

Metz M, Grundmann S, Stander S. Pruritus: an overview of current concepts. *Vet Dermatol.* (2011). 22(2):121-131.

Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, Di Marzo V. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology.* (2009). 34(3):593-606.

Moreira FA, Kaiser N, Monory K, Lutz B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology.* (2008). 54(1):141-50.

Moreno S, Farioli-Vecchioli S, and Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience.* (2004). 123: 131–145.

Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet.* (2007). 370(9590):851-8.

Murillo-Rodríguez E, Désarnaud F, Prospéro-García O. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci.* (2006). 79(1):30-7.

Murillo-Rodríguez E, Palomero-Rivero M, Millán-Aldaco D, Arias-Carrión O, Drucker-Colín R. Administration of URB597, oleoylethanolamide or palmitoylethanolamide increases waking and dopamine in rats. *PLoS One.* (2011). 6(7):e20766.

Murillo-Rodríguez E, Vázquez E, Millán-Aldaco D, Palomero-Rivero M, Drucker-Colin R. Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on the sleep-wake cycle, c-Fos expression and dopamine levels of the rat. *Eur J Pharmacol.* (2007). 562(1-2):82-91.

Mukherjee R, Jow L, Noonan D, McDonnell DP. Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (1994). 51(3-4):157-66.

Natarajan V, Schmid PC, Reddy PV, Schmid HH. Catabolism of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *J Neurochem.* (1984). 42(6):1613-9.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* (2002 b). 28;34(1):13-25. Review.

Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry.* (2002 a). 15;52(6):503-28. Review.

Noli C, Miolo A. Aliamidi in Dermatologia Veterinaria. Review delle evidenze pre-cliniche e cliniche. *Veterinaria [0301-5092] E DIRETTI, E INDIRETTI* anno:2012 vol:26 iss:3.

Numakawa T, Yokomaku D, Richards M, Hori H, Adachi N, Kunugi H. Functional interactions between steroid hormones and neurotrophin BDNF. *World J Biol Chem.* (2010). 1(5):133-43.

O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. (2009). 14(5):511-22

Ogawa S, Fujii T, Koga N, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Noda T, Higuchi T, Motohashi N, Kunugi H. Plasma L-tryptophan concentration in major depressive disorder: new data and meta-analysis. *J Clin Psychiatry*. (2014).75(9):e906-15.

Oliver MF, Heady JA, Morris JN, Cooper J. WHO cooperative trial on the primary prevention of ischemic heart disease with clofibrate to lower serum cholesterol: final mortality follow-up. *Lancet* (1984). 2(8403):600-4.

Oliver MF. Reduction of serum-lipid and uric-acid levels by an orally active androsterone. *Lancet*. (1962). 1(7243):1321-3.

Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*. (2006). 3(3):167-75.

Paintlia MK, Paintlia AS, Contreras MA, Singh I, Singh AK. Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: attenuation by N-acetyl cysteine. *Exp Neurol*. (2008 a). 210(2):560-76.

Paintlia MK, Paintlia AS, Khan M, Singh I, Singh AK. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activity by N-acetyl cysteine attenuates inhibition of oligodendrocyte development in lipopolysaccharide stimulated mixed glial cultures. *J Neurochem*. (2008 b). 105(3):956-70.

Palazidou E. The neurobiology of depression. *Br Med Bull*. (2012). 101:127-45.

Palmer CN, Hsu MH, Muerhoff AS, Griffin KJ, Johnson EF. Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha with the retinoid X receptor alpha unmasks a cryptic peroxisome proliferator response element that overlaps an ARP-1-binding site in the CYP4A6 promoter. *J. Biol. Chem.* (1994). 269(27):18083-9.

Panlilio LV, Justinova Z, Mascia P, Pistis M, Luchicchi A, Lecca S, Barnes C, Redhi GH, Adair J, Heishman SJ, Yasar S, Aliczki M, Haller J, Goldberg SR. Novel use of a lipid-lowering fibrate medication to prevent nicotine reward and relapse: preclinical findings. *Neuropsychopharmacology.* (2012). 37(8):1838-47.

Papakostas GI. The efficacy, tolerability, and safety of contemporary antidepressants. *J Clin Psychiatry.* (2010). 71 Suppl E1:e03.

Patel S, Carrier EJ, Ho WS, Rademacher DJ, Cunningham S, Reddy DS, Falck JR, Cravatt BF, Hillard CJ. The postmortal accumulation of brain N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) is dependent upon fatty acid amide hydrolase activity. *J Lipid Res.* (2005). 46(2):342-9.

Pellow S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodent valid? *Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology.* (1986). 8:557-565.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* (1985). 14:149-67.

Perlik F, Raskova H, Elis J: Anti-inflammatory properties of N(2-hydroxyethyl)palmitamide. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* (1971). 39(4):395-400

Petrosino S, Iuvone T, Di Marzo V. N-palmitoyl-ethanolamine: Biochemistry and new therapeutic opportunities. *Biochimie.* (2010). 92(6):724-7.

- Pistis M, Melis M. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem.* (2010). 17(14):1450-67. Review.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* (1978). 47(4):379-91.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arc. Int. Pharmacodyn. Ther.* (1977 a). 229(2), 327-336.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* (1977 b). 266:730-732.
- Porta N, Vallée L, Lecointe C, Bouchaert E, Staels B, Bordet R, Auvin S. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, exerts anticonvulsive properties. *Epilepsia.* (2009). 50(4):943-8.
- Puffenbarger RA. Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* (2005). 4(6):625-31
- Puligheddu M, Pillolla G, Melis M, Lecca S, Marrosu F, De Montis MG, Scheggi S, Carta G, Murru E, Aroni S, Muntoni AL, Pistis M. PPAR- α agonists as novel antiepileptic drugs: preclinical findings. *PLoS One.* (2013). 8(5):e64541.
- Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* (2006). 27(1):24-31.
- Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *PPAR Res.* (2010).;2010. pii: 612089
- Ramanan S, Kooshki M, Zhao W, Hsu FC, Robbins ME. PPAR α ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF- κ B and AP-1 pathways. *Free Radic Biol Med.* (2008). 45(12):1695-704.

Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, Sperbeck SJ, Osumi T, Hashimoto T, Lalwani ND *et al.* Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1986). 83(6):1747-51.

Rénéric JP, Lucki I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl).* (1998). 136(2):190-7.

Reynolds JL, Ignatowski TA, Sud R, Spengler RN. An antidepressant mechanism of desipramine is to decrease tumor necrosis factor-alpha production culminating in increases in noradrenergic neurotransmission. *Neuroscience.* (2005);133(2):519-31.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* (1997). 30(3):289-304. Review.

Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J *et al.* An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* (2001). 414:209-212.

Ropero AB, Juan-Pico P, Rafacho A, Fuentes E, Bermudez-Silva FJ, Roche E, Quesada I, de Fonseca FR, Nadal A. Rapid non-genomic regulation of Ca²⁺ signals and insulin secretion by PPAR alpha ligands in mouse pancreatic islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* (2009). 200(2), 127-138.

Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem.* (2001). 276(41):37731-4.

Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* (1999). 341(6):410-8.

Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry*. (2006). 163(11):1905-17.

Rutolo G, Ericsson CG, Tettamanti C, Karpe F, Grip L, Svane B, Nilsson J, De Faire U, Hamsten A. Treatment effects on serum lipoprotein lipids, apolipoproteins and low density lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial (BECAIT). *J. Am. Coll. Cardiol.* (1998). 32(6):1648-56.

Ryberg E, Vu HK, Larsson N, Groblewski T, Hjorth S, Elebring T, Sjogren S, Greasley PJ. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett.* (2005). 579(1), 259-264.

Saito VM, Wotjak CT, Moreira FA Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders?. *Rev Bras Psiquiatr.* (2010). 32 Suppl 1:S7-14. Review.

Sánchez C, Meier E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology (Berl)*. (1997). 129(3):197-205.

Sasso O, Russo R, Vitiello S, Raso GM, D'Agostino G, Iacono A, Rana GL, Vallée M, Cuzzocrea S, Piazza PV, Meli R, Calignano A. Implication of allopregnanolone in the antinociceptive effect of N-palmitoylethanolamide in acute or persistent pain. *Pain*. (2010). 153(1):33-41, 2012.

Scherma M, Panlilio LV, Fadda P, Fattore L, Gamaledin I, Le Foll B, Justinová Z, Mikics E, Haller J, Medalie J, Stroik J, Barnes C, Yasar S, Tanda G, Piomelli D, Fratta W, Goldberg SR. Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-3-yl ester

(URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* (2008). 327(2):482-90.

Schmid HH. Pathways and mechanisms of N-acylethanolamine biosynthesis: can anandamide be generated selectively? *Chem Phys Lipids.* (2000). 108(1-2):71-87. Review.

Schmitt JA, Wingen M, Ramaekers JG, Evers EA, Riedel WJ. Serotonin and human cognitive performance *Curr Pharm Des.* (2006).12(20):2473-86. Review.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPAR alpha and PPAR gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* (1996 a). 15(19):5336-48.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* (1996 b). 37(5):907-25. Review

Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, Giuffrida A. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids.* (2002). 121(1-2):211-27. Review.

Scuderi C, Valenza M, Stecca C, Esposito G, Carratù MR, Steardo L. Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator-activated receptor- α . *J Neuroinflammation.* (2012). 9:49.

Seldenrijk A, van Hout HP, van Marwijk HW, de Groot E, Gort J, Rustemeijer C, Diamant M, Penninx BW. Carotid atherosclerosis in depression and anxiety: Associations for age of depression onset. *WorldJ Biol Psychiatry.* (2011). 12(7):549-58.

Seligman ME, Maier SF. Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol.* (1967). 74(1):1-9.

Shearer BG, Hoekstra WJ. Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science. *Curr Med Chem.* (2003). 10(4):267-80. Review.

Sheehan DV, Raj BA, Trehan RR, Knapp EL. Serotonin in panic disorder and social phobia. *Int Clin Psychopharmacol.* (1993). 8 Suppl 2:63-77.

Sheerin AH, Zhang X, Saucier DM, Corcoran ME. Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia.* (2004). 45(10):1184-8.

Shepherd J. Lipoprotein metabolism: an overview. *Drugs* (1994). 47 Suppl 2:1-10. Review.

Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry.* (1993). 32(21):5598-604.

Shizuya K, Komori T, Fujiwara R, Miyahara S, Ohmori M, Nomura J. The influence of restraint stress on the expression of mRNAs for IL-6 and the IL-6 receptor in the hypothalamus and midbrain of the rat. *Life Sci.* (1997). 61(10):PL 135-40.

Shizuya K, Komori T, Fujiwara R, Miyahara S, Ohmori M, Nomura J. The expressions of mRNAs for interleukin-6 (IL-6) and the IL-6 receptor (IL-6R) in the rat hypothalamus and midbrain during restraint stress. *Life Sci.* (1998). 62(25):2315-20

Silva MT, Alves CR, Santarem EM. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res.* (1999). 32(3):333-9.

Silva RC, Brandão ML. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacol Biochem Behav.* (2000). 65(2):209-16.

Simpson EL. Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Curr Med Res Opin.* (2010). 26(3):633-640.

Smart D, Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Fowler CJ. 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol.* (2002). 136(3):452-8.

Smith SA, Pogson CI. The metabolism of L-tryptophan by isolated rat liver cells. Effect of albumin binding and amino acid competition on oxidation of tryptophan by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem J.* (1980). 15;186(3):977-86.

Soria-Gómez E, Guzmán K, Pech-Rueda O, Montes-Rodríguez CJ, Cisneros M, Prospéro-García O. Oleoylethanolamide affects food intake and sleep-waking cycle through a hypothalamic modulation *Pharmacol Res.* (2010). 61(5):379-84.

Spano MS, Fattore L, Cadeddu F, Fratta W, Fadda P. Chronic cannabinoid exposure reduces phencyclidine-induced schizophrenia-like positive symptoms in adult rats. *Psychopharmacology (Berl).* (2012). 225(3):531-42.

Spano PF, Szyszka K, Galli CL, Ricci A. Effect of clofibrate on free and total tryptophan in serum and brain tryptophan metabolism. *Pharmacol Res Commun.* (1974). 6(2):163-73 a.

Spano PF, Szyszka K, Pozza G, Sirtori CR. Influence of clofibrate on serum tryptophan in man. *Res Exp Med (Berl).* (1974). 163(3):265-9 b

Spigset O. Adverse reactions of selective serotonin reuptake inhibitors: reports from a spontaneous reporting system. *Drug Saf.* (1999). 20(3):277-87

Staels B. Fibrates in CVD: a step towards personalised medicine. *Lancet.* (2010). 375(9729):1847-8.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* (1998 a). 98(19):2088-93

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR alpha but not by PPAR gamma activators. *Nature* (1998 b). 393(6687):790-3.

Staels B, Maes M, Zambon A. Fibrates and future PPAR alpha agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* (2008) 5(9):542-53.

Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase: a potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J. Clin. Invest.* (1995). 95(2):705-12.

Stahl SM. Placebo-controlled comparison of the selective serotonin reuptake inhibitors citalopram and sertraline. *Biol Psychiatry.* (2000). 48(9):894-901.

Stander S, Weisshaar E, Luger TA. Neurophysiological and neurochemical basis of modern pruritus treatment. *Exp Dermatol* (2008). 17(3):161-9.

Stella N, Piomelli D. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* (2001). 425:189-196.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* (1985). 85(3), 367-370.

Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* (2007). 2007:95974.

Stokes PE, Holtz A. Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. *Clin Ther.* (1997). 19(5):1135-250.

Suardiaz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain.* (2007). 133(1-3):99-110.

Sun Y, Alexander SP, Kendall DA, Bennett AJ. Cannabinoids and PPAR alpha signalling. *Biochem Soc Trans.* (2006). 34(Pt 6):1095-7.

Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res.* (2007). 2007:23513.

Tagliamonte A, Biggio G, Vargiu L, Gessa GL. Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci II.* (1973). 12(6):277-87

Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol.* (1997). 11;340(2-3):249-58.

Thurberg BL.; Collins T. The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* (1998). 9(5):387-96. Review.

To CT, Anheuer ZE, Bagdy G. Effects of acute and chronic fluoxetine treatment of CRH-induced anxiety. *Neuroreport.* (1999). 10(3):553-5.

To CT, Bagdy G. Anxiogenic effect of central CCK administration is attenuated by chronic fluoxetine or ipsapirone treatment. *Neuropharmacology.* (1999). 38(2):279-82.

Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* (1993). 44:463-9.

Tsuboi K, Takezaki N, Ueda N. The N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Chem Biodivers.* (2007). 4(8):1914-25.

Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M; STAR*D Study Team. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR/D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry.* (2006). 163(1):28-40.

Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem.* (1995). 270(40):23823-7.

van der Kolk BA, Dreyfuss D, Michaels M, Shera D, Berkowitz R, Fisler R, Saxe G. Fluoxetine in posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry.* (1994). 55(12):517-22.

Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV, Reddy JK. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem.* (1996). 271(4):2147-55

Wang G, Namura S. Effects of chronic systemic treatment with peroxisome proliferator-activated receptor α activators on neuroinflammation induced by intracerebral injection of lipopolysaccharide in adult mice. *Neurosci Res.* (2011). 70(2):230-7.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* (2005). 52: 90–110.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.*(2000). 43(4):527-50. Review.

Wood K, Coppen A. The effect of clofibrate on total and free plasma tryptophan in depressed patients. *Neuropharmacology*. (1978). 17(6):428-30.

Xia Z, DePierre JW, Nässberger L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology*. (1996). 34(1):27-37.

Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM, Stimmel JB. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature*. (2002). 415(6873):813-7.

Xu J, Chavis JA, Racke MK, Drew PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes. *J Neuroimmunol*. (2006). 176(1-2):95-105.

Xu J, Racke MK, Drew PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist fenofibrate regulates IL-12 family cytokine expression in the CNS: relevance to multiple sclerosis. *J Neurochem*. (2007). 103(5):1801-10.

Xu J, Storer PD, Chavis JA, Racke MK, Drew PD. Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. *J Neurosci Res*. (2005). 81(3):403-11.

You Z, Luo C, Zhang W, Chen Y, He J, Zhao Q, Zuo R, Wu Y. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. *Behav Brain Res*. (2011). 20;225(1):135-41.

Young SN, Pihl RO, Ervin FR The effect of altered tryptophan levels on mood and behavior in normal human males. *Clin Neuropharmacol*. (1986) ;9 Suppl 4:516-8.

Yu HL, Deng XQ, Li YJ, Li YC, Quan ZS, Sun XY. N-palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice. *Pharmacol Rep.* (2011) .63(3):834-9.

Yu S, Reddy JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* (2007). 1771(8), 936-951

Yuwiler A, Oldendorf WH, Geller E, Braun L. Effect of albumin binding and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. *J Neurochem.* (1977). 28(5):1015-23.