



Università degli Studi di Pisa

Corso di Dottorato in "Neurobiologia e clinica dei disturbi affettivi"

Anno Accademico 2005-2006

Titolo della Tesi:

Ruolo del Brain Derived Neurotrophic Factor nella terapia con farmaci antidepressivi.

Candidato:

Dr Claudio Mannari

Tutor:

Prof. Luca Giovannini

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La depressione è una patologia psichiatrica che interessa, in modo variabile per sintomatologia, durata e gravità, circa il 20% della popolazione, con prevalenza femminile. Un altro 1-2% è affetto da Disturbi Bipolari (o "Maniaco-Depressivi"), equamente distribuiti nei due sessi [Blazer, 2000]. La patologia depressiva era già stata descritta intorno al IV sec. A.c. da Ippocrate, che usò il termine "melanconia" [Akisal, 2000]: molti dei sintomi oggi conosciuti erano già stati descritti, come anche l'esistenza di una certa predisposizione individuale e il contributo di fattori esterni.

Studi epidemiologici dimostrano che circa il 40-50% dei fattori di rischio è di tipo genetico [Sanders et al., 1999; Fava and Kendler, 2000], tuttavia lo studio della genetica della depressione si è dimostrato decisamente ostico e difficoltoso proprio per la complessità di questa patologia, che coinvolge numerosi geni [Burmeister, 1999].

A complicare la cosa sta il fatto che, comunque, la vulnerabilità alla depressione è solo in parte genetica: importanti fattori sono lo stress, gli eventi traumatici, alcune infezioni virali (ad es. Borna virus) e processi random durante lo sviluppo encefalico [Akisal, 2000; Fava and Kendler, 2000].

La sindrome depressiva - indistinguibile dalla depressione Maggiore come definita dal DSMIV - si può manifestare come patologia secondaria in numerose condizioni patologiche, come nei disturbi endocrini (iper- o ipo-colesterolemia), nel Parkinson, in alcune forme di cancro, asma, diabete ed infarto.

1.1 I Circuiti Neuronali della Depressione

La comprensione della circuiteria che sta alla base dell'umore e delle sue manifestazioni patologiche è ancora approssimativa: più regioni sono interessate nella manifestazione dei sintomi depressivi [Nestler et al, 2002].

Questo aspetto è stato delineato grazie a studi di *Brain Imaging* che mostrano cambiamenti nel flusso sanguigno in alcune aree del cervello, tra cui regioni della corteccia prefrontale e cingolata, dell'Ippocampo, dell'Amigdala e del Talamo [Drevets, 2001; Mayberg et al., 2004]. Studi anatomici da autopsie di pazienti depressi, hanno riportato l'esistenza di anomalie a livello di queste strutture [Zhu et al., 1999; Manji et al., 2001; Drevets, 2001; Rajkowska, 2000a].

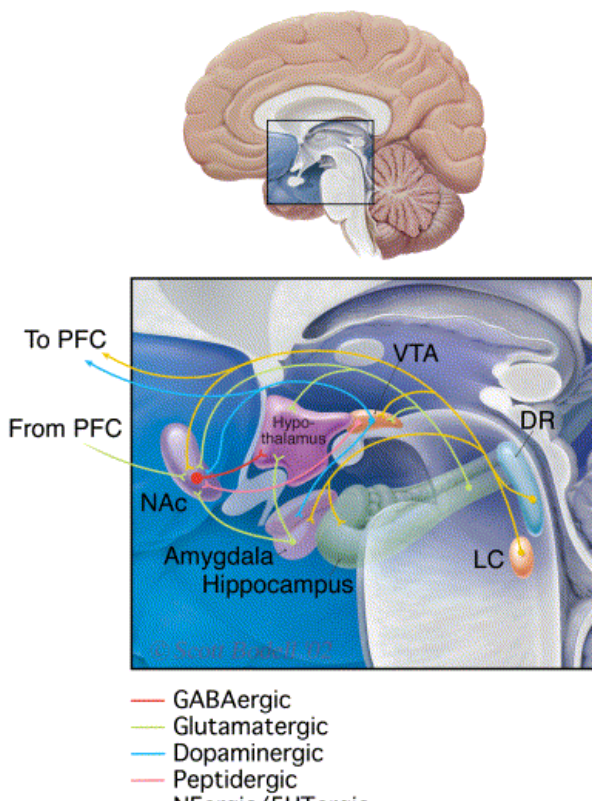


Fig.1 Circuiti Neuronali della Depressione (Nestler et al, 2002): PFC Pre Frontal cortex; NAc Nucleus Accumbens; VTA Ventral Tegmental Area; LC Locus Coeruleus; DR Dorsal Raphe

Tra le aree interessate, Neocortex ed Ippocampo possono mediare gli aspetti cognitivi della depressione, come la disturbo della memoria, sentimenti di inutilità, sfiducia, senso di colpa, desiderio di morte e tendenza al suicidio.

Lo striato (in particolare lo striato ventrale ed il Nucleus Accumbens (Nac) e l'Amigdala, con le relative aree encefaliche, sono invece importanti soprattutto nella memoria emotiva, per cui possono determinare anedonia, ansia, ridotta motivazione [Nestler et al, 2002].

1.2 Ippocampo, stress e depressione

Sebbene non si conoscano con esattezza i substrati neurobiologici della depressione, attualmente molte ricerche si focalizzano sull'ippocampo e sui meccanismi ne regolano la risposta allo stress. La scelta dell'Ippocampo è dovuta a numerosi fattori, tra loro correlati.

- ✚ In primo luogo, l'ippocampo esprime alti livelli dei recettori per gli ormoni glucocorticoidi, e un innalzamento dell'attività dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (HPA) è uno dei marker meglio caratterizzati della depressione maggiore [Holsboer and Barden, 1996].
- ✚ In secondo luogo, l'ippocampo ha un ruolo fondamentale nella regolazione del feedback inibitorio dell'asse HPA, spesso disinibito nei pazienti depressi, che controlla il rilascio dei glucocorticoidi da parte della ghiandola surrenale [Young and Haskett, 1991; Sapolsky, 2001].
- ✚ In terzo luogo, aspetto strettamente legato ai precedenti, lo stress cronico o elevati livelli di glucocorticoidi possono provocare atrofia dei neuroni ippocampali o, nei casi più gravi, la loro morte. Tutto ciò può comportare un'ulteriore perdita del feedback inibitorio esercitato dall'ippocampo sull'asse HPA, ma può anche svolgere un ruolo cruciale nella comparsa dei deficit cognitivi che possono accompagnare la depressione [McEwen, 1999].
- ✚ Infine, l'ippocampo ha importanti connessioni anatomiche e funzionali con l'amigdala e la corteccia prefrontale, anch'esse implicate nell'eziopatogenesi della depressione [Drevets, 2001].

1.2.1 L'Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (HPA)

La depressione è spesso descritta come una patologia collegata allo stress e ci sono evidenze che confermano come episodi depressivi si verificano in un contesto stressante; comunque lo stress, *per se*, non è sufficiente per causare depressione. Infatti, molti individui non sviluppano tratti depressivi successivamente ad esperienze fortemente stressanti, mentre altri manifestano sintomatologia depressiva in contesti che per altri sono solo moderatamente stressanti. È altresì vero che particolari esperienze traumatiche, come quelle sperimentate in combattimento o in seguito ad uno stupro, sono alla base dello sviluppo della complessa sintomatologia della Sindrome da Stress Post-Traumatico (PTSD) [Nestler et al, 2002].

Il principale meccanismo con cui il SNC reagisce a stress acuto/cronico è l'attivazione dell'HPA: i neuroni presenti nel Nucleo para Ventricolare (PVN) dell'Ipotalamo secernono il Corticotropin Releasing Factor (CRF), che stimola la sintesi e la secrezione dell' Ormone Areno CorticoTropo (ACTH) dall'Ipofisi Anteriore. L'ACTH stimola a sua volta sintesi e

rilascio dei glucocorticoidi (Cortisolo) dalla corteccia del surrene. I glucocorticoidi esercitano molteplici funzioni sul metabolismo generale e sono in grado di influenzare l'umore attraverso azioni dirette in numerose aree encefaliche.

L'attività dell'asse HPA è sotto il controllo di alcune vie, che comprendono l'ippocampo (che inibisce i neuroni ipotalamici che secernono CRF attraverso un circuito polisinaptico) e l'amigdala (che invece esercita un'azione di tipo eccitatorio).

I Glucocorticoidi, regolando i neuroni ippocampali e del PVN, influenzano in modo potente le risposte dell'asse HPA: in condizioni normali, aumentano l'inibizione ippocampale sull'attività dell'HPA; tuttavia, incrementi sostenuti dei glucocorticoidi, in condizioni di stress prolungato ed intenso, possono danneggiare i neuroni ippocampali, specialmente i neuroni piramidali CA3, con riduzione della ramificazione dendritica e la perdita delle spine dendritiche altamente specializzate da cui i neuroni ricevono i loro input sinaptici glutamatergici [McEwen, 2000; Sapolsky 2000].

Il danno a livello ippocampale determina un feedback positivo, in quanto viene a ridursi il tono inibitorio ippocampale sull'asse HPA, contribuendo all'ulteriore aumento dei livelli di glucocorticoidi circolanti: questo aspetto è coinvolto nella patologia depressiva, dove una eccessiva attivazione dell'HPA si osserva in circa metà dei soggetti affetti da depressione, e tale anomalia risulta recuperata dopo la terapia [Sachar and Baron 1979; De Kloet et al. 1988; Arborelius et al. 1999 and Holsboer 2001].

1.2.2. Iperattività di HPA e depressione

Il coinvolgimento del cortisolo nella patologia depressiva è ben documentato: i livelli di cortisolo in alcuni pazienti depressi possono essere talmente elevati da risultare tossici per l'ippocampo: in particolare in condizioni sperimentali di stress sono stati osservati a livello ippocampale riduzione delle arborizzazioni dendritiche e della neurogenesi, aspetti che potrebbero ben relazionarsi con la riduzione del volume ippocampale osservata in alcuni pazienti depressi [Sheline et al. 1999; Bremner et al. 2000].

Del resto, l'alterata funzionalità dell'ippocampo può spiegare lo sviluppo di alcune anomalie cognitive, che possono comunque essere recuperate in seguito al trattamento farmacologico.

Ulteriori paralleli tra alcuni aspetti della risposta allo stress, la depressione e gli effetti dovuti alla somministrazione centrale di CRF: questi includono aumento dello stato di eccitazione e vigilanza, riduzione dell'appetito, aumentata portata cardiaca e pressione sanguigna [Arborelius et al. 1999; Holsboer, 2001]; ciò ha portato a proporre l'ipotesi che l'iperattività dell'asse HPA possa contribuire alla depressione non solo attraverso l'ipercortisolismo, ma anche aumentando la trasmissione di CRF nell'ipotalamo ed in altre

regioni innervate da questi neuroni. Resta sconosciuto se anomalie di HPA sia la causa primaria della depressione o, piuttosto, secondaria ad altri eventi.

Lo stress e la conseguente ipercolesterolemia tra l'altro riduce la neurogenesi dei neuroni ippocampali del giro dentato nell'adulto [Fuchs and Gould, 2000], aspetto che potrebbe contribuire alla formazione della memoria.

Del resto, in regioni che non dipendono né dal PVN che da HPA, CRF esercita importanti azioni: ad esempio, a livello dell'amigdala CRF è critico nel "fear conditioning" ed in altre forme di memoria emotiva.

CAPITOLO 2

I FARMACI ANTIDEPRESSIVI

2.1 Meccanismo d'azione e teoria monaminergica della depressione

Gli antidepressivi sono farmaci con struttura chimica e azioni farmacologiche assai diverse, che vengono accomunati per l'effetto sul tono dell'umore; sulla base del meccanismo d'azione è possibile individuare diverse classi di farmaci antidepressivi:

- inibitori delle monoaminossidasi (IMAO),
- inibitori non selettivi della ricaptazione delle monoamine (antidepressivi triciclici, ATC),
- inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI),
- inibitori selettivi della ricaptazione della noradrenalina (NARI),
- inibitori misti (SNRI),
- inibitori recettoriali (NASSA).

I farmaci antidepressivi di maggiore impiego clinico inducono un aumento della disponibilità sinaptica di Noradrenalina (NA) e/o Serotonina (5HT) sia bloccando la ricaptazione neuronale di tali neurotrasmettitori, sia riducendo il catabolismo attraverso l'inibizione delle MAO, sia rimuovendo il tono inibitorio sul rilascio o sull'attività neuronale attraverso l'interazione recettoriale.

Attualmente sono dunque disponibili diversi farmaci antidepressivi che permettono un trattamento adeguato dei disturbi dell'umore, occorre però ricordare che alcune categorie di antidepressivi comportano scarsa maneggevolezza, se non reali pericoli, nei pazienti anziani.

Le differenti classi di antidepressivi disponibili sul mercato, e talora diversi composti di una stessa classe, presentano, a seconda delle specifiche caratteristiche farmacodinamiche, un profilo di tollerabilità differente. Il rischio che gli effetti indesiderati della terapia antidepressiva siano più frequenti e più gravi negli anziani è riconducibile alla maggiore frequenza di modificazioni farmacodinamiche e farmacocinetiche, di comorbidità somatica e di polifarmacoterapia caratteristica dell'età avanzata.

- ❖ La cardiotoxicità degli ATC ne controindica l'impiego nella patologia cerebrovascolare.
- ❖ I farmaci ad azione serotoninergica richiedono cautela in corso di patologie gastriche in atto
- ❖ Tutti i farmaci ad azione anticolinergica comportano rischi di aggravamento dei disturbi cognitivi ecc.

L'osservazione che l'effetto acuto dei principali composti antidepressivi, indipendentemente dal meccanismo d'azione primario, è un aumento dei livelli di 5HT e NA nello spazio intersinaptico aveva portato alla formulazione dell' ipotesi monaminergica della depressione, pietra miliare per la ricerca neurofarmacologica, che individuava in una disfunzione del sistema delle monoamine la base biologica della sintomatologia depressiva e delle manifestazioni comportamentali associate alla patologia [Schildkraut, 1965; Charney, 1998].

Nondimeno, il meccanismo d'azione di questi farmaci (aumentata biodisponibilità dei neurotrasmettitori) è un evento acuto che si manifesta entro minuti od ore dalla loro somministrazione: questo mal si concilia con la realtà clinica, in cui occorrono da settimane a mesi di trattamento continuato con farmaci per ottenere una risposta adeguata. Questa è una delle principali considerazioni che hanno portato all' evoluzione dell'ipotesi monaminergica, per cui, pur restando valido il ruolo fondamentale dei sistemi serotoninergico e noradrenergico nella fisiopatologia dei disturbi dell'umore, si cerca di identificare i veri bersagli molecolari a lungo termine dell'azione degli antidepressivi.

2.2 I sistemi di trasduzione del segnale di NA e 5HT

L'aumento della concentrazione sinaptica dei neurotrasmettitori ha come conseguenza immediata la stimolazione di numerosi recettori accoppiati a proteine G, la cui attivazione induce la stimolazione dell'attività dell'enzima Adenilato Ciclastasi (AC) con conseguente incremento della concentrazione cellulare dell' adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e l'attivazione della protein Chinasi A (PKA), con successiva fosforilazione di varie proteine bersaglio; una aumentata attività della AC e della PKA è stata osservata nel trattamento cronico con farmaci antidepressivi [Charney, 1998].

Diversamente, la stimolazione dei recettori α o dei recettori 5HT₂ attiva la Fosfolipasi C (PLC) e mobilita del Ca^{++} intracellulare, con la conseguente attivazione della Protein Chinasi calcio-calmodulina dipendente (PKC): numerosi farmaci antidepressivi (ad esempio fluoxetina, desipramina e reboxetina) provocano infatti un marcato incremento nell'attività enzimatica delle PKC II e IV nella corteccia del ratto [Tiraboschi *et al.*, 2004].

2.2.1 Ruolo della trasduzione del segnale

Nei neuroni, l'attivazione della PKA e delle PKC provoca la fosforilazione di numerose proteine substrato; tra queste una delle più importanti e meglio rappresentate è il fattore di trascrizione CREB (*cAMP Response Element Binding*), che fosforilato è in grado di legarsi a livello della sequenza CRE a livello della zona promotrice di alcuni importanti geni che regolano la sopravvivenza cellulare e la rigenerazione assonale. La PKA attiva il fattore

di trascrizione CREB trasferendo un gruppo fosfato sulla Ser133; questo è il primo di una cascata di eventi attraverso cui CREB controlla la trascrizione di numerosi geni [Yamamoto et al., 1988; Mayr and Montminy , 2001].

CREB è coinvolto nella regolazione dell'espressione genica in risposta ai più svariati stimoli, quali neurotrasmettitori, ormoni peptidici, fattori di crescita e attività neuronale [Shaywitz and Greenberg, 1999]. Ciò indica che CREB è un punto chiave nel controllo delle risposte adattative cellulari, modulando numerosi aspetti dell'attività neuronale, per esempio l'eccitazione, lo sviluppo, i fenomeni di plasticità sinaptica; alcune delle proteine la cui sintesi è regolata da CREB sono, ad esempio, coinvolte nella crescita sinaptica, meccanismo mediante il quale le informazioni di recente acquisizione vengono consolidate.

Tra molteplici geni target che sono regolati da CREB e che potrebbero giocare un ruolo chiave nell'azione terapeutica degli antidepressivi e nella fisiopatologia della depressione c'è la neurotrofina BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*).

CAPITOLO 3

GLI STUDI POST-MORTEM, LA PLASTICITÀ NEURONALE E LA NEUROGENESI

3.1 Studi *post mortem* e depressione

Studi post mortem su pazienti depressi hanno evidenziato una riduzione della dimensione neuronale nella corteccia orbito-frontale, una riduzione sia in numero che in dimensione dei neuroni e cellule gliali a livello della corteccia prefrontale ed orbitofrontale, così come in alcune porzioni del cingolato anteriore, oltre ad una riduzione nello spessore corticale e nel volume dei gangli basali in pazienti con depressione [Manji et al., 2001, Ongur et al., 1998, Rajkowska, 2000 (a), (b)]; il numero delle cellule può viceversa incrementare nell'Ipotalamo, il che può spiegare i sintomi neurovegetativi di questo disordine.

Anomalie gliali sono state evidenziate sia nei bipolari che negli unipolari, e riduzioni della densità gliale risulta specifico dei disturbi dell'umore [Rajkowska, 1999; 2000 (b)].

Sono state registrate, inoltre, anomalie a livello dendritico e dei terminali sinaptici, a conferma di una plasticità sinaptica aberrante o di danno nello sviluppo neuronale, anche se questi aspetti sembrano essere un marker selettivo per il disturbo bipolare. Nonostante ripetute dimostrazioni di atrofia ippocampale, resta comunque da chiarire se si verifica quanto dimostrato su modelli animali, cioè la riduzione della cellularità e della neurogenesi [Czeh et al., 2001].

La riduzione del numero delle cellule gliali osservata fa escludere il coinvolgimento di una risposta di tipo infiammatorio nella perdita neuronale (in tal caso si osserverebbe un aumento del numero delle cellule della glia associato a gliosi), mentre l'aspetto atrofico delle popolazioni cellulari suggerisce l'innescarsi di fenomeni di morte cellulare per apoptosi.

Le cellule gliali svolgono molte funzioni e sono partners attivi nella trasmissione neuronale; il ridotto numero di questo tipo cellulare può essere coinvolto in quanto osservato dagli studi di neuro imaging sul ridotto metabolismo del glucosio a livello della corteccia prefrontale [Tsacopoulos and Magistretti, 1996]; questi studi di hanno fornito inoltre una gran quantità di informazioni riguardanti cambio di dimensione e funzione non solo della corteccia prefrontale, ma anche dell'Ippocampo e dell'Amigdala [Campbell et al., 2004; Mayberg and Fossati, 2004; Bench et al., 1995].

In particolare i lavori di Sheline et al. [1996, 2003] hanno dimostrato:

1. una riduzione del volume ippocampale nei pazienti depressi,
2. una correlazione tra alterazioni morfo-anatomiche e durata della patologia
3. un recupero della perdita volumetrica successivamente alla terapia farmacologica.

In questo studio le osservazioni emerse dal gruppo di pazienti in terapia ha anche evidenziato come il fenomeno dell'atrofia ippocampale peggiori all'aumentare degli episodi depressivi, la qual cosa dimostra che l'atrofia è il risultato piuttosto che al causa della patologia.

Questi dati, affiancati a quanto già descritto per studi di *brain imaging*, mostrano pertanto come l'eziopatogenesi della patologia depressiva possa considerarsi assimilabile a quella di altre patologie neurodegenerative.

A conferma della compromissione neuro-anatomica complessa, risultante da anomalie funzionali a livello molecolare, ulteriori studi autoptici hanno evidenziato una riduzione di importanti meccanismi molecolari di regolazione genica a livello della corteccia temporale (che include l'Ippocampo) in pazienti depressi, con particolare attenzione al già citato fattore di trascrizione CREB [Dowlatshahi et al., 1998]: si assiste infatti ad una riduzione dei livelli di attivazione di CREB.

Il ruolo di CREB nella depressione è ormai accettato, se è vero che CREB costituisce uno dei possibili futuri target per l'azione di farmaci specifici, tra cui inibitori delle fosfodiesterasi, gli enzimi che degradano cAMP; a tal proposito, alcuni gruppi hanno riportato, tra le azioni degli antidepressivi, l'upregulation del pathway del cAMP a livello di Ippocampo e Neocortex [Nestler et al. 1989; Duman et al. 1997; Thome et al. 2000].

3.2 Plasticità neuronale e Neurogenesi

Una chiave di svolta nella comprensione dei meccanismi alla base delle patologie neurodegenerative e delle alterazioni funzionali coinvolte anche nei meccanismi che regolano l'apprendimento e la memoria, è stata fornita dalle scoperte riguardanti le capacità adattive del cervello e l'esistenza di popolazioni neuronali con potenzialità replicative nel cervello adulto. Queste nuove acquisizioni consentono di poter considerare il cervello un sistema aperto e dinamico, capace di adattarsi, per cui la degenerazione patologica della funzione nervosa, ben osservabile nei disturbi dell'umore, potrebbe verosimilmente essere associata ad una sofferenza funzionale a carico di uno od entrambi i meccanismi, per cui la depressione sarebbe la conseguenza della incapacità adattativa patologica del SNC del soggetto [Fossati et al., 2004].

3.2.1 La plasticità neuronale

La plasticità neuronale è un meccanismo cruciale attraverso il quale il cervello, sia maturo che in sviluppo, si adatta ai cambiamenti ambientali; si tratta di un complesso ed articolato meccanismo che regola gli aspetti funzionali del sistema nervoso e, in particolare, all'apprendimento e alla memoria. I cambiamenti nella plasticità possono avvenire a livello molecolare e sinaptico, coinvolgendo le proteine e il numero e l'efficienza sinaptica.

Le principali conseguenze della plasticità neuronale sono le modifiche sinaptiche attività-dipendenti, i cambiamenti nell'eccitabilità dell'elemento postsinaptico, la riorganizzazione della mappa corticale (promossa dai neurotrasmettitori e dai loro recettori) e l'estensione di aree specializzate in seguito a patologie neurologiche o all'apprendimento.

La plasticità del SNC si manifesta a livello cellulare con modifiche della crescita dendritica, dello sviluppo delle arborizzazioni assonali, del rimodellamento sinaptico, e della creazione di nuove sinapsi; questi aspetti sono strettamente correlati col fenomeno della neurogenesi [Mesulam, 1999].

Tra questi eventi, il rimodellamento sinaptico e la sinaptogenesi sono ampiamente influenzati dai fattori neurotrofici [Patapoutian and Reichardt, 2001].

3.2.2 La Neurogenesi

L'Ippocampo è una delle due zone neurogeniche, ben documentate, del SNC adulto; l'altra è a livello dei ventricoli telencefalici, la zona subventricolare, che dà origine ad i neuroni del bulbo olfattorio. Nell' Ippocampo le cellule progenitrici sono localizzate a livello della zona subgranulare e si dividono per dar origine a nuove cellule che migrano nello strato delle cellule granulari dove si differenziano in neuroni [Gage, 2000; Gould et al., 2000]; questi

neuroni sono altamente plastici, immaturi ed altamente suscettibili a cambiamenti in seguito all'influenza ambientale.

I nuovi neuroni estendono i loro dendriti fino allo strato molecolare e gli assoni allo strato piramidale CA3, e hanno caratteristiche sia morfologiche che fisiologiche tipiche delle cellule granulari [Gage, 2000].

L'esistenza di questi nuovi neuroni, che vanno ad integrare nella circuitria ippocampale, può verosimilmente giocare un ruolo nell'apprendimento e memoria [Barnea and Nottebohm, 1994; Gross, 2000].

La percentuale di proliferazione e sopravvivenza dei nuovi neuroni è regolata positivamente o negativamente da tutta una serie di stimoli [Duman et al., 2004]; ad esempio, lo stress è uno dei più forti fattori di regolazione negativa della neurogenesi: l'esposizione a stress acuto o ripetuto riduce la neurogenesi nell'ippocampo adulto [Duman et al., 2004].

Diversamente, la neurogenesi aumenta in condizioni stimolanti l'attività neuronale (per es. enriched environment, apprendimento, esercizio), suggerendo che questo processo sia anche positivamente regolato e dipenda dalla plasticità neuronale [Gould et al., 1999a; Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999]

Nuove cellule con caratteristiche di neuroni sono state trovate anche a livello della neocortex di ratti adulti e macachi [Gould et al., 1999b; Rietze et al., 2000]. Inoltre fenomeni di neurogenesi sono stati dimostrati in altre regioni encefaliche successivamente ad un insulto [Arvidsson et al., 2002; Gould and Tanapat, 1997; Magavi et al., 2000; Nakatomi et al., 2002]

CAPITOLO 4

LE NEUROTROFINE E LA TEORIA NEUROTROFICA DELLA DEPRESSIONE

Gli effetti patologici dello stress sull'ippocampo hanno contribuito alla formulazione di una recente ipotesi, quella che propone il ruolo dei fattori neurotrofici nell'eziologia della depressione e nel suo trattamento [Duman et al. 1997 ; Altar, 1999].

I fattori neurotrofici, il cui capostipite è l' NGF (*Nerve Growth Factor*), sono peptici isolati nel SNC, inizialmente caratterizzati per la loro capacità nel regolare la crescita neuronale e la differenziazione durante lo sviluppo, ma sono ormai noti come potenti regolatori della plasticità e della sopravvivenza di neuroni e glia anche nell'adulto.

L'ipotesi neurotrofica della depressione attribuisce alla riduzione del supporto neurotrofico la responsabilità patologica a livello ippocampale durante lo sviluppo della depressione, e pertanto l'azione degli antidepressivi su queste molecole può essere la chiave interpretativa nella regressione dalla sintomatologia. A tal proposito la neurotrofina BDNF sembra giocare un ruolo fondamentale: in modelli animali su ratto, stress sia acuto che cronico sono in grado di ridurre l'espressione del BDNF a livello del giro dentato e delle cellule piramidali dell'ippocampo [Smith et al., 1995].

4.1 La famiglia delle neurotrofine

Studi condotti dal premio nobel Rita Levi Montalcini et al., portarono alla scoperta che cellule maligne di topo, del tipo noto come Sarcoma 180, sintetizzano e rilasciano una molecola che svolge un ruolo essenziale nel differenziamento e nella funzionalità delle cellule nervose sensitive e simpatiche [Levi-Montalcini and Hamburger, 1953; Cohen and Levi-Montalcini, 1956; Cohen et al., 1954]: questa molecola è stata denominata fattore di crescita del nervo (NGF) ed è oggi il prototipo della famiglia proteica delle neurotrofine (NTs); successivamente a questa scoperta sono stati intrapresi molti studi atti ad isolare altre molecole strutturalmente e funzionalmente correlate all'NGF:

nel 1982, Barde et al. hanno isolato dal cervello di maiale il fattore (BDNF) [Barde et al., 1982; Leibrock J et al., 1989]. A seguire sono stati identificate la neurotrofina 3 (NT-3) e la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) [Barde,1990].

Le NTs sono generate come precursori pre-pro-neurotrofinici all'interno del reticolo endoplasmatico, lunghi approssimativamente 240-260 amminoacidi (aa), processati e secrete come proteine omodimeriche mature nello spazio extracellulare (lunghezza del monomero: 118-129 aa ; 12 KDa) [Merighi, 2002; Rothman et Orci, 1992].

4.2 I recettori delle neurotrofine

Le neurotrofine attivano due differenti tipi di recettore:

- 1) i recettori Trks (chinasi tropomiosina-connessa) appartenenti alla famiglia di recettori tirosin-chinasici
- 2) il recettore p75, un membro della superfamiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF).

Ogni NT lega uno specifico recettore Trk, in particolare NGF attiva TrkA, mentre BDNF e NT-4/5 attivano TrkB e NT-3 attiva TrkC [Kaplan and Miller, 2000]; per quanto riguarda p75 studi in vitro hanno dimostrato come questo recettore legghi preferenzialmente la forma immatura delle NTs [Lee et al., 2001].

Tra i recettori della famiglia Trk, TrkB è quello che presenta la maggior distribuzione a livello corticale, il che contribuisce ad avvalorare l'importanza proprio del BDNF nelle patologie neurodegenerative [Aloyz et al., 1999].

Il legame della neurotrofina al recettore Trk provoca la dimerizzazione del recettore e cambio conformazionale, con successiva attivazione del dominio tirosin-chinasico intracellulare e delle vie di traduzione Ras/ERK (extracellular signal regulated kinase), PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3-OH kinase) e PLC- γ 1 [Kaplan and Miller, 2000; Pawson and Nash, 2000], che culminano nell'attivazione di alcuni fattori di trascrizione che alterano l'espressione genica.

Il recettore p75, se coespresso con i recettori Trks, aumenta l'affinità di legame delle diverse NTs per i loro specifici recettori. Il segnale di p75 è tuttavia duplice, in quanto innesca un segnale che regola la sopravvivenza cellulare, ed un secondo segnale con attività apoptotica. Il legame delle NTs al recettore p75 attiva il fattore di trascrizione NF- κ B, la Jun-chinasi e la sfingomielinasi acidica: NF- κ B promuove la sopravvivenza [Maggirwar et al., 1998], mentre la Jun chinasi e la sfingomielinasi promuovono l'apoptosi; in condizione di coespressione, il segnale di Trk sopprime l'attivazione della Jun chinasi e della sfingomielinasi [Dobrowsky et al., 1995], ma non l'induzione di NF- κ B.

Pertanto, in condizioni fisiologiche il legame delle NTs mature ai recettori Trks e p75 promuove la sopravvivenza cellulare, poichè il segnale di sopravvivenza mediato da Trk sopprime il segnale pro-apoptotico proveniente da p75 ed agisce sinergicamente col segnale anti-apoptotico proveniente da p75 [Dobrowsky et al., 1995; Yoon et al., 1998; Mazzoni et al., 1999; Hamanoue et al., 1999].

Negli stati patologici invece predomina il segnale pro-apoptotico proveniente da p75. L'apoptosi è innescata quando non si ha più una situazione di equilibrio tra i due recettori, perchè p75 è up-regolato o perchè è aumentata la concentrazione della pro-NT, che da studi in vitro è dimostrato legarsi ed attivare preferenzialmente p75 [Lee et al., 2001].

4.3 Trasporto retrogrado e anterogrado delle neurotrofine

Le NTs sono state originariamente scoperte come fattori target derivati, prodotti cioè dalle cellule che costituiscono il target dell'innervazione, in grado di regolare la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni innervanti. Nel far questo le NTs sfruttano il ben noto trasporto assonale retrogrado delle proteine dal terminale al corpo cellulare: successivamente alla somministrazione di NTs, a livello del terminale assonale si forma un complesso ligando-recettore attivato che viene endocitato e racchiuso in vescicole trasportate attivamente lungo i microtubuli [Ehlers et al., 1995; Watson et al., 1999a]; il recettore all'interno delle vescicole rimane cataliticamente attivo e trasmette segnali anche lungo gli assoni.

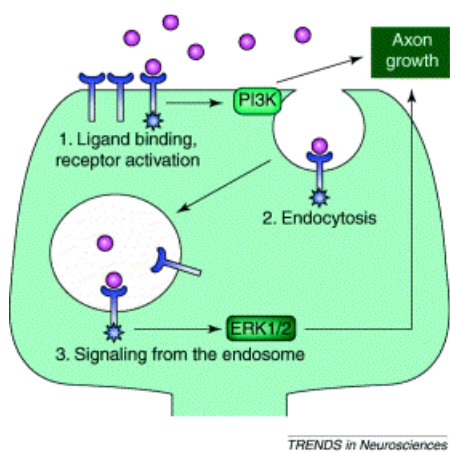


Fig.3 segnale a livello del terminale assonale

La formazione di questo complesso ligando-recettore dà luogo a due tipi di segnale: un segnale locale a livello del terminale assonale, a prescindere dalla formazione degli endosomi, e un segnale che agisce nei corpi cellulari trasmesso dai recettori attivati trasportati dagli endosomi.

Per quanto riguarda il segnale locale, a livello del terminale assonale, la fosforilazione dei Trks assonali [Riccio et al., 1997; Watson et al., 1999b] induce l'attivazione locale di ERK1/2 [Atwal et al., 2000], segnale che determina la crescita dell'assone [Campenot, 1977; York et al., 2000] (Fig.3); oltre a questa, all'interno dell'assone è stata osservata

l'attivazione della cascata PI3K-Akt, anch'essa coinvolta nella crescita dell'assone [Atwal et al., 2000; Kuruvilla et al., 2000].

La stimolazione neurotrofica a livello dei corpi cellulari attiva, invece, PI3K [Kuruvilla et al., 2000] e di ERK5 [Watson et al., 2001], le cui attivazioni hanno significato nella promozione della sopravvivenza neuronale [Brunet et al., 2001; Bonni et al., 1999].

Qualora Trk si trovi a livello del soma, determinando una stimolazione diretta sui corpi cellulari, si verifica, invece, la fosforilazione e la traslocazione nucleare sia di ERK 5 che di ERK 1/2.

Recentemente è stato documentato che BDNF può anche essere trasportate in modo anterogrado [Altar and Di Stefano, 1998 ;Nawa and Takei ,2001]: questo significa che, oltre ad avere una secrezione attività - dipendente, anche sotto l'aspetto del trasporto il BDNF presenta similitudini funzionali con i neurotrasmettitori classici.

Pur non essendo un vero e proprio neurotrasmettitori, il BDNF ha comunque molte caratteristiche che lo accomunano ai classici neurotrasmettitori: la sintesi presinaptica, l'immagazzinamento vescicolare, il rilascio evocato dalla depolarizzazione, la localizzazione

post-sinaptica di TrkB, le azioni post-sinaptiche, l'inattivazione ed il suo riciclaggio [Altar et al., 1998].

Il meccanismo d'azione dei due tipi di trasporto sono schematizzati in Fig.4.

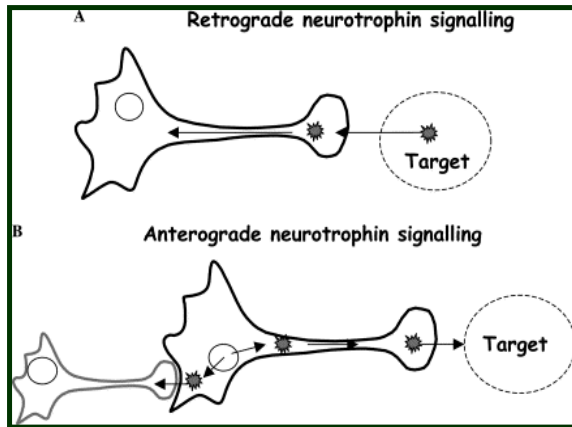


Fig. 4 Trasporto retrogrado (A) ed anterogrado (B)

CAPITOLO 5

IL BDNF (BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR)

Tra le NTs, il BDNF è la molecola neurotrofica maggiormente diffusa nel cervello dei mammiferi, sia adulti che in fase di sviluppo. Il BDNF regola la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni del sistema nervoso periferico (PNS) [Frittsch et al., 1997], mentre nel sistema nervoso centrale (CNS) sembra avere essenzialmente un ruolo nella differenziazione e nella modulazione delle funzioni neuronali [Murer et al., 2001].

Il passaggio da pro-NT a proteina matura avviene ad opera dell'enzima "Furina" o di specifiche convertasi [Seidah et al., 1996]. Le vescicole di secrezione sono diverse, a seconda che il meccanismo di secrezione costitutivo o regolato:

- 🚩 i granuli secretori della via costitutiva si fondono con la membrana plasmatica anche in assenza di uno specifico meccanismo d'attivazione [Halban ed Irminger, 1994; Hokfelt et al., 2000; Harter e Reinhard, 2000].
- 🚩 le vescicole della via regolata sono più grandi e si fondono successivamente ad un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} [Lang et al., 2001], il che fa del BDNF una molecola con comportamento simile ai classici neurotrasmettitori.

5.1 Espressione del BDNF nel SNC

L'espressione del BDNF nel ratto adulto è abbondante nell'ippocampo, nella neocorteccia, nell'amigdala, nel cervelletto [Ernfors et al., 1990, 1992; Maisonpierre et al., 1990; Hofer et al., 1990] inoltre l'mRna del BDNF è stato ritrovato anche nell'ipotalamo, nel setto e nei nuclei adrenergici del tronco encefalico [Castren et al., 1995; Katoh-Semba et al., 1997].

Nel SNC, l'espressione del BDNF è regolata positivamente dall'attività neuronale [Lindholm et al., 1994; Lindvall et al., 1994]; questo fenomeno è stato ben documentato nell'ippocampo dove l'espressione del BDNF è fortemente influenzata dai livelli fisiologici e patofisiologici dell'attività neuronale [Zafra et al., 1990; Ernfors et al., 1991; Isackson et al., 1991].

Analisi in vitro ed in vivo effettuate nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale e nell'ipotalamo del ratto hanno dimostrato che la regolazione attività-dipendente di BDNF è mediata dai neurotrasmettitori classici : in generale, l'mRNA del BDNF è up-regolato dal glutammato, dall'acetilcolina e dalla serotonina, mentre è down-regolato dal GABA.

Il significato biologico di questa regolazione è duplice:

- 1) un aumento localizzato provvede ad un feedback positivo sulla funzione sinaptica;
- 2) un aumento in seguito ad un insulto neuronale può proteggere i neuroni dall'eccitotossicità [Lindholm et al., 1994; Lindvall et al., 1994; Marty et al., 1997].

Alla luce della regolazione attività dipendente del BDNF, le patologie che sono caratterizzate da una riduzione dei livelli di BDNF centrale possono considerarsi il risultato di una ridotta attività e plasticità neuronali.

5.2 Espressione periferica del BDNF e del recettore TrkB

Oltre che nelle popolazioni neuronali, l'mRNA del BDNF è stato trovato anche in molti tessuti ed organi periferici non neuronali. Alcuni studi effettuati sul ratto riportano la sua presenza nell'aorta [Scarlsbrick IA. et al., 1993], nei reni, nelle ghiandole sottomandibolari, nelle ovaie, nei gangli della radice dorsale [Ernfors P. et al., 1990], nel cuore [Hiltunen JO. et al., 1996], nella retina, nei muscoli, nei polmoni [Maisonpierre PC. et al., 1990; Maisonpierre PC. et al., 1991] e nelle cellule endoteliali.

Il BDNF è presente anche nel circolo ematico: la prima evidenza della presenza di BDNF nel plasma e nel siero umano è emersa circa una decina di anni fa [Rosenfeld et al 1995; Radka et al., 1996]. Gli alti livelli di BDNF nel siero sono dovuti al fatto che le piastrine, pur non sintetizzandolo, contengono grandi quantità di BDNF, che rilasciano in seguito alla loro attivazione durante il processo di coagulazione [Fujimura et al., 2002].

Potenziati sorgenti di BDNF presente nel plasma umano sono l'endotelio vascolare, la muscolatura liscia [Maisonpierre et al., 1991], i macrofagi e i linfociti attivati [Braun et al., 1999; Gielen A et al., 2003; Kerschensteiner M et al., 1999] ed eosinofili [Noga et al., 2003]. La funzione principale del BDNF contenuto in queste popolazioni cellulari e nelle piastrine è quella di supportare la sopravvivenza neuronale e di stimolare la riparazione neuronale e assonale nei siti dell'infiammazione [Kerschensteiner et al., 1999] e durante le lesioni assonali che si verificano nelle ferite [Batchelor et al, 2002].

Anche il recettore del BDNF (TrkB) è stato ritrovato anche su target periferici tra cui endotelio vascolare [Donovan et al., 2000], muscolatura liscia vascolare [Nemoto et al., 1998], gangli della radice dorsale [McMahon et al., 1994], cellule di Schwann [Alderson RF. et al., 2000], milza [Perez-Perez et al., 1999], linfociti B [D' Onofrio et al., 2000], linfociti T [Maroder et al., 1996], cellule del ganglio intestinale, glia [Hoehner et al., 1996] e cellule endocrine [Esteban et al., 1995]; quest' aspetto lascia presupporre che le attività promosse dal BDNF nel circolo ematico non siano ristrette alle popolazioni neuronali, ma anche a queste popolazioni cellulari, il che apre una discussione sul ruolo sistemico di questa neurotrofina.

5.3 Ruolo del BDNF sulla NEUROGENESI e la NEUROPLASTICITÀ

La sopravvivenza del singolo neurone dipende dalle sue connessioni sinaptiche [Goldberg and Barres, 2000]: studi condotti su colture cellulari dimostrano che l'attivazione della via del cAMP o l'esposizione a fattori neurotrofici aumenta la sopravvivenza e la crescita dei neuroni [Ghosh et al., 1994; Goldberg and Barres, 2000; McAllister et al., 1996].

La sopravvivenza e la crescita attività-dipendenti dei neuroni possono verificarsi con diversi meccanismi [Goldberg and Barres, 2000]:

1. un aumento del numero delle connessioni sinaptiche e dell'attività neuronale può elevare l'espressione di fattori neurotrofici, tra cui BDNF, nelle cellule post-sinaptiche;
2. un aumento nel numero delle connessioni sinaptiche può essere il risultato di un aumento della secrezione di BDNF da parte delle cellule pre-sinaptiche, nel caso del trasporto anterogrado del BDNF;
3. la depolarizzazione o l'attivazione della cascata del cAMP nei neuroni post-sinaptici può aumentare la responsività alla stimolazione con fattori neurotrofici, oltre ad aumentarne la sintesi.

Gli eventi che caratterizzano lo sviluppo e che quindi sono responsabili della plasticità sono la proliferazione, il differenziamento, la formazione dei contatti sinaptici, il rimodellamento assonale, la crescita assonale e la crescita dell'albero dendritico [Kandel ER et al., 2003]: tutti questi eventi sono indotti da vari fattori tra i quali ritroviamo le NTs e in particolare il BDNF. Questi eventi sono il risultato dell'attivazione di meccanismi molecolari complessi che hanno come target la modulazione dell'espressione di specifici geni; in tutto questo CREB riveste un ruolo centrale.

Come schematizzato in Fig.5, l'attivazione dei segnali a valle del recettore TrkB promuovono la sopravvivenza cellulare con due meccanismi principali già descritti in precedenza: da una parte la fosforilazione di CREB e la regolazione dell'espressione genica, dall'altra la regolazione negativa di meccanismi proapoptotici, per cui l'importanza delle principali cascate attivate da TrkB, ERK1/2 e PI3K [Almeida et al., 2005], sta appunto non solo nella fosforilazione di fattori di trascrizione, ma anche nell'inibizione fosforilativa di molecole ad attività proapoptotica come BAD.

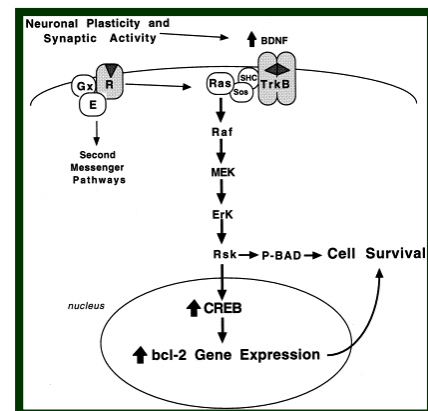


Fig.5 Attivazione di CREB mediata dall'attivazione di TrkB (Duman et al., 2000)

Il ruolo del BDNF nella plasticità sinaptica a lungo termine nell'ippocampo e nella neocorteccia è, oggi, ben documentato [Lessmann, 1998; Schuman, 1999; Schinder and Poo, 2000; Schinder et al., 2000].

Vari esperimenti hanno dimostrato che la sintesi di BDNF è aumentata dai livelli fisiologici dell'attività sinaptica [Patterson et al., 1992; Castren et al., 1992; Dragunow et al., 1993; Rocamora et al., 1996]; questo suggerisce che il BDNF potrebbe esercitare un feedback positivo sulla plasticità sinaptica. In effetti, l'applicazione esogena di BDNF è in grado di aumentare l'efficacia presinaptica aumentando, ad esempio, il rilascio del glutammato nelle sinapsi eccitatorie [Carmignoto et al., 1997; Lessmann et Heumann, 1998; Li et al., 1998a; Li et al., 1998b; Bradley et Sporns, 1999; Schinder et al., 2000; Taniguchi et al., 2000; Paul et al., 2001].

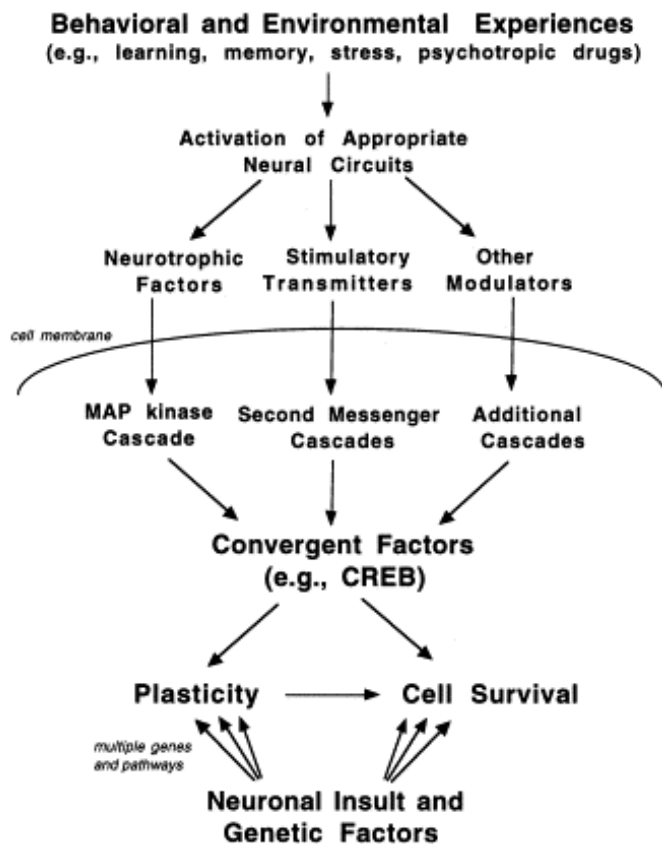


Fig. 6 Duman et al., 2000

In conclusione molteplici studi dimostrano che esiste una reciproca modulazione tra BDNF e CREB e l'attività neuronale, la plasticità e la neurogenesi, pertanto è possibile affermare che il meccanismo della plasticità non è indipendente da quello della neurogenesi, piuttosto esiste una sovrapposizione tra i pathways deputati alla regolazione i due fenomeni neuronali (Fig.6).

Infine, dato che l'attività sinaptica è in grado di regolare positivamente numerosi aspetti, tra cui la responsività alle neurotrofina e la loro concentrazione, è possibile ipotizzare che fenomeni stressanti ed una ridotta attività neuronale siano tra le cause principali di questo tipo di patologie [Duman et al., 2000].

5.4 Il BDNF nelle patologie del sistema nervoso centrale

Dato il ruolo centrale del BDNF nel promuovere la sopravvivenza neuronale e i processi di crescita durante lo sviluppo, nonché di proteggere i neuroni da insulti di varia natura, cambiamenti dei suoi livelli endogeni o della sua biodisponibilità, potrebbero contribuire alla patogenesi di alcune malattie neurologiche. In effetti alterazioni della produzione e della secrezione di BDNF sono state riportate per varie malattie:

- 🚩 patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson, associate con una diminuzione dei livelli di BDNF nel cervello [Connor et al., 1997; Howells et al., 2000; Levivier et al., 1995; Michalski et al., 2003; Parain et al., 1999; Phillips HS. Et al., 1991];
- 🚩 malattie del disturbo dell'umore come la depressione caratterizzata da una minore concentrazione di BDNF sia a livello centrale (cervello) che periferico (sangue) [Altar et al., 1999; Chen et al., 2001; Shimizu et al., 2003]
- 🚩 malattie infiammatorie come la sclerosi multipla associata con un aumento della sintesi di BDNF nei siti dell'infiammazione.

In relazione a quanto precedentemente analizzato sullo stress e l'asse HPA, evidenze sperimentali attestano che stress acuti e cronici diminuiscono l'espressione dell'mRNA del BDNF nell'ippocampo; l'effetto è particolarmente marcato a livello delle cellule granulari del giro dentato, ma si riscontra anche a livello delle cellule piramidali delle aree CA1 e CA3 [Duman and Monteggia, 2006].

Analisi *post mortem* dell'ippocampo hanno dimostrato che l'espressione del BDNF è ridotta nei pazienti depressi morti suicidi, mentre è indotta nei pazienti depressi che al momento del decesso erano in terapia farmacologica [Dwivedi et al., 2003]; un altro studio evidenzia che la proteina ERK risulta ridotta in pazienti depressi morti suicidi [Dwivedi et al., 2001]. Uno studio condotto da Vermetten et al. [2003] ha evidenziato che, nei pazienti depressi, la riduzione del volume ippocampale può essere revertita grazie al trattamento con antidepressivi

5.4.1 Studi clinici sul siero

Fatta eccezione per alcuni studi di tipo autoptico, la maggior parte degli studi condotti su pazienti depressi utilizza come parametro il BDNF sierico.

La principale limitazione di questi studi sul siero risiede nella difficoltà di attribuire un significato al BDNF all'esterno del cervello. Tuttavia, in letteratura vi sono evidenze di altri fattori trofici espressi nei tessuti periferici (*Insulin Growth Factor -1, IGF-1; Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*) che sono in grado di passare la barriera ematoencefalica. Ciò permette di ipotizzare che anche il BDNF presente nel sangue (principalmente immagazzinato nelle piastrine) sia in grado di influenzare le funzioni del sistema nervoso centrale.

Gli studi presenti in letteratura su pazienti con depressione riportano che i valori sierici di BDNF risultano ridotti in pazienti depressi ed inversamente correlati con la gravità della sintomatologia depressiva [Karege et al., 2002; Karege F. and Vaudan G., 2005]; inoltre la concentrazione sierica di BDNF in pazienti depressi, non in trattamento, è significativamente inferiore rispetto a quello di pazienti in terapia antidepressiva e di soggetti sani, suggerendo che il ritorno alla normalità dei valori di BDNF e la riduzione dei sintomi depressivi sia attribuibile al trattamento antidepressivo, analogamente a quanto riportato per il tessuto cerebrale negli studi su modelli animali [Shimizu et al., 2003].

Tra i lavori di più recente pubblicazione, si riporta quello di Aydemir *et al.* [2006], dove gli autori riportano come in donne affette da depressione maggiore i livelli di BDNF nel siero risultassero significativamente inferiori rispetto ai livelli misurati nel gruppo controllo; tuttavia in seguito al trattamento con 10 mg/die di escitalopram questa differenza risultava scomparsa.

5.5 BDNF e antidepressivi

Il fatto che la risposta terapeutica ai farmaci antidepressivi si manifesti solo in seguito a un trattamento prolungato ha indotto a ipotizzare che, affinché essa si produca, sia necessario l'instaurarsi di modificazioni nella plasticità strutturale e funzionale [Duman *et al.*, 1997; Nestler *et al.*, 2002].

Nel 1995 il gruppo di Duman ha dimostrato per la prima volta che il trattamento cronico, ma non quello acuto, con diversi antidepressivi (ATC, SSRI, IMAO e stimolo elettroconvulsivante) era in grado di indurre, nell'ippocampo del ratto, l'espressione di BDNF e del suo recettore TrkB [Nibuya *et al.*, 1995].

Osservazioni da modelli animali di stress, hanno permesso di evidenziare che alcune classi di antidepressivi permettono di recuperare la riduzione delle arborizzazioni dendritiche dei neuroni piramidali ippocampali [Kuroda and McEwen, 1998;

Norrholm and Ouimet, 2001], così come di aumentare la neurogenesi nel giro dentato [Malberg *et al.*, 2000; Duman *et al.*, 2001; Manji *et al.*, 2001] (Fig.7).

Le evidenze sperimentali su modelli animali di stress confermano quanto già da tempo ampiamente documentato dalla clinica circa l'efficacia terapeutica, infatti solo la somministrazione cronica di antidepressivi aumenta i livelli di BDNF nelle aree cerebrali interessate [Nibuya *et al.*, 1995; Duman and Vaidya, 1998; Malberg *et al.*, 2000], così come la terapia elettroconvulsiva [Nibuya *et al.*, 1995; Duman and Vaidya, 1998].

Negli studi sopraccitati, gli animali presentavano riduzione dei livelli cerebrali di BDNF; il trattamento terapeutico utilizzato era tuttavia in grado di prevenire o contrastare la riduzione in condizioni di stress.

L'induzione del BDNF da parte degli antidepressivi è almeno in parte mediata dal fattore di trascrizione CREB; infatti l'espressione genica di BDNF è indotta sia in vivo che in vitro da CREB [Tao *et al.* 1998 and Conti *et al.* 2002] e la maggior parte degli antidepressivi è in grado di aumentare l'espressione di CREB in diverse aree cerebrali, compreso l'ippocampo attraverso l'attivazione di sistemi di protein kinasi che ne modulano positivamente l'attivazione, con conseguente traslocazione nucleare ed aumento della sintesi di BDNF, oltre che di molecole antiapoptotiche della famiglia delle Bcl-2 [Nibuya and Nestler, 1996; Thome *et al.* 2000] (Fig.8).

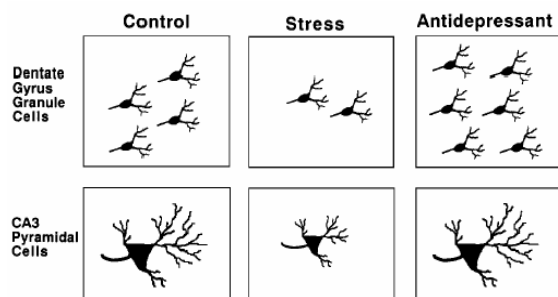


Fig.7 Effetto della somministrazione di antidepressivi sulle cellule del giro dentato e sulle cellule piramidali

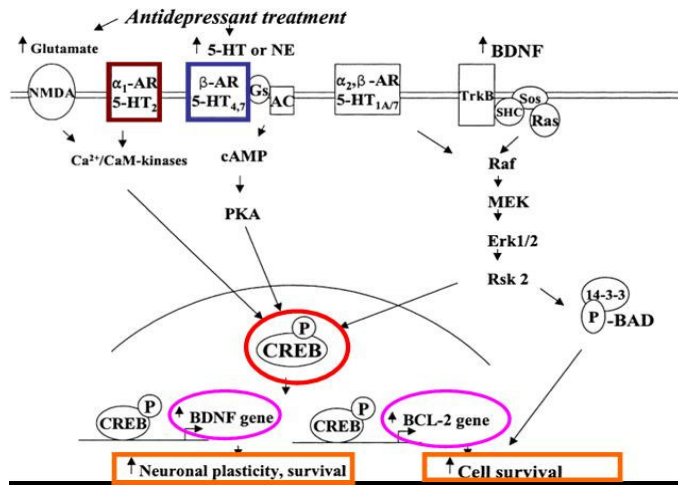


Fig. 8 meccanismo d'azione molecolare di antidepressivi e BDNF

Ulteriori elementi di collegamento tra l'azione farmacologica degli antidepressivi ed il ruolo del BDNF nella patologia, emergono da studi che evidenziano come il trattamento con antidepressivi sia capace di regolare fenomeni complessi come la neurogenesi e la plasticità sinaptica [D'Sa and Duman, 2002].

5.5.1 Antidepressivi e plasticità sinaptica

Il trattamento a lungo termine con i antidepressivi produce un'attivazione prolungata del sistema intracellulare del cAMP e di CREB nell'ippocampo di ratto, con conseguente trascrizione di numerosi geni [Nibuya and Nestler, 1996; Blom and Tascadda, 2002; Thome et al., 2000].

Alcuni studi *post mortem* hanno infatti dimostrato come in pazienti depressi vi sia una ridotta concentrazione di CREB a livello della corteccia temporale rispetto al gruppo di controllo, mentre pazienti depressi in corso di trattamento presentano valori comparabili al gruppo controllo [Dowlatsahi et al. 1998].

5.5.2 Antidepressivi e neurogenesi

L'induzione della neurogenesi è stata osservata dopo somministrazione cronica, ma non acuta, di antidepressivi appartenenti a differenti classi (SSRI, ATC, IMAO e stimolo elettroconvulsivante) [Malberg et al., 2000].

Questi dati sembrano indicare che un aumento della neurogenesi è un target comune ai diversi trattamenti antidepressivi [Duman and Monteggia, 2006]. Inoltre, il trattamento con farmaci antidepressivi blocca o reverte l'inibizione della neurogenesi causata dallo stress [Malberg and Duman, 2003], mentre bloccando la neurogenesi si bloccano anche gli effetti comportamentali dei farmaci antidepressivi, a dimostrazione di un legame diretto

tra neurogenesi ippocampale ed effetti comportamentali dei farmaci antidepressivi [Santarelli et al., 2003].

Santarelli et al. [2003] suggeriscono addirittura che la neurogenesi ippocampale sia necessaria per l'azione antidepressiva: esperimenti *in vitro* dimostrano che l'attivazione della via del cAMP o l'incubazione con BDNF aumenta la differenziazione neuronale e la crescita dei neuriti delle cellule progenitrici [Palmer et al., 1997]. Questa scoperta suggerisce che l'upregolazione di CREB e BDNF in risposta ad antidepressivi possa effettivamente aumentare sia la differenziazione che la sopravvivenza cellulare.

Concludendo, oltre al ruolo, ben noto, nella regolazione della concentrazione dei neurotrasmettitori monoaminergici, gli antidepressivi risultano capaci di indurre neuroprotezione, modulando positivamente i meccanismi alla base della plasticità neuronale e determinando un incremento della neurogenesi ippocampale: è ampiamente documentato che il trattamento cronico con antidepressivi o ECS può aumentare la proliferazione e la sopravvivenza neuronali [Malberg et al., 2000].

Queste azioni sono aspetti secondari della farmacodinamica degli antidepressivi, nondimeno ben si inseriscono all'interno di un più ampio concetto di eziopatogenesi e terapia dei disturbi dell'umore, che vedono coinvolti non solo la riduzione dei livelli di neurotrasmettitori, ma anche meccanismi ben più complessi ed articolati, quali la neurogenesi, la plasticità neuronale, la modulazione di vie di traduzione del segnale a valle dei recettori monoaminergici, l'attivazione di specifici fattori di trascrizione (in particolare CREB): ovvero la regolazione delle neurotrofine.

CAPITOLO 6

SCOPO DEL LAVORO

Lo Studio condotto durante i tre anni di Dottorato si è sviluppato avendo come fattore comune l'indagine del ruolo delle neurotrofine nelle patologie depressive e nella loro terapia. A tal proposito sono state allestite due sezioni sperimentali:

Sperimentazione animale:

si propone di valutare gli effetti della somministrazione di Duloxetina, un SNRI, sulla produzione di BDNF a livello centrale e periferico, in seguito ad una somministrazione sia acuta che cronica. I dati emersi da questo studio consentiranno di ampliare le conoscenze sul meccanismo d'azione dei farmaci antidepressivi, nella fattispecie Duloxetina, in relazione all'ipotesi Neurotrofica della Depressione.

Sperimentazione Clinica:

si propone di verificare l'ipotesi che un campione di pazienti drug-free affetti da episodio depressivo maggiore presenti differenze significative in termini di valori medi sierici e plasmatici di BDNF rispetto ad una popolazione di controllo. Sarà valutato l'effetto del trattamento farmacologico sulla risposta clinica e sulle variazioni dei livelli di BDNF durante uno studio di follow-up naturalistico della durata di un anno.

CAPITOLO 7

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su un modello sperimentale animale e su soggetti umani volontari.

7.1 Gruppi sperimentali su animale: Valutazione della somministrazione acuta e cronica di un nuovo SNRI, Duloxetina, su ratti Wistar.

Lo studio prevede l'allestimento dei seguenti gruppi sperimentali:

1. Nel primo gruppo sono stati valutati gli effetti a breve termine indotti dalla Duloxetina, sui livelli di BDNF. A questo scopo sono state fatte valutazioni dopo 1h dalla somministrazione del farmaco e dopo 24h: per ciascun tempo, sono stati fatti gruppi di 5 ratti (Wistar) per ciascuna dose indagata (10-30-100 mg/Kg in salina); 5 animali sono stati utilizzati come controllo non trattato.

Dopo 1 e 24 h sono stati sacrificati e le neurotrofine valutate nel siero, nel plasma, nel liquido cefalo-rachidiano (liquor) ed a livello corticale.

2. Nel secondo gruppo sperimentale sono stati valutati gli effetti a lungo termine della Duloxetina sul contenuto di BDNF: sono stati fatti gruppi di 5 ratti (Wistar) per ciascuna dose indagata (10-30-100 mg/Kg in salina); 5 animali sono stati utilizzati come controllo non trattato.

Dopo 14 gg tutti gli animali sono stati sacrificati e le neurotrofine valutate nel siero, nel plasma, nel liquido cefalo-rachidiano (liquor) ed a livello corticale.

7.1.1 Raccolta dei campioni:

I livelli di neurotrofine sono misurati in liquor, siero, plasma e tessuti prelevati da ippocampo e corteccia di ratto e di topo.

Il liquor viene prelevato dal ventricolo laterale usando micropipette connesse a siringhe Hamilton (50 µl); una volta raccolto, il liquor viene centrifugato a 3000 rpm per pellettare eventuali tracce di emazia, quindi viene recuperato il surnatante e stoccato a -80°C.

Campioni di sangue per la separazione di siero e plasma vengono raccolti utilizzando provette contenenti EDTA per il plasma e Clot Activator per il siero. Le provette vengono centrifugate a 3000 rpm per 15 min a temperatura ambiente per recuperare il surnatante, stoccato a -80°C.

Dopo il prelievo di sangue e liquor verranno estratti campioni corteccia prefrontale, ed omogenati (1:5 peso/volume) in apposito buffer (0.125 M NaCl, 0.05 M Tris pH 7.6, 2 mM EGTA, 2mM EDTA, aprotinina 100mg/ml, leupeptina 2 mg/ml e fenilmetansulfonil fluoride 0.2 M). I tessuti omogenati verranno incubati 1h a 4°C (vortexati 3min ogni 7 min), quindi centrifugati 5 min a 10000 rpm a 4°C.

7.2 Gruppi sperimentale per lo studio su volontari umani:

FASE 1. Valutazione del rilascio di BDNF da piastrine attivate, per valutare il tempo di completa degranolazione piastrinica e rilascio del contenuto totale di BDNF piastrinico: sono stati reclutati 8 volontari di sesso maschile, di età compresa tra i 25 e i 35 anni, ai quali è stato effettuato un prelievo di sangue nell'arco della mattinata. Il sangue raccolto da ogni individuo è stato suddiviso in 4 provette (6ml) contenenti Clot Activator (attivatore della cascata di coagulazione del sangue) e lasciato coagulare a temperatura ambiente per 5 - 30 - 60 e 120 min.

FASE 2. Valutazione delle variazioni circadiane dei livelli di BDNF nel sangue periferico. Sono stati allestiti due gruppi: un gruppo uomini costituito da 18 volontari sani e un gruppo donne costituito da 16 volontarie sane, tutti di età compresa tra i 25 e i 35 anni. I volontari sono stati sottoposti a 4 prelievi nell'arco della giornata: alle ore 8:00, alle ore 11:00, alle ore 14:00 ed infine alle ore 20:00. Per quanto riguarda il gruppo donne sono stati effettuati 2 cicli di prelievi: uno nella fase follicolare ed uno nella fase luteale per correlare i livelli di BDNF con la fase del ciclo mestruale ed i livelli degli ormoni sessuali. Nel momento del primo prelievo (ore 8:00) i volontari sono stati sottoposti anche ai seguenti esami clinici:

- Uomini: cortisolo, testosterone, ACTH (ormone adrenocorticotropo).
- Donne: cortisolo, ACTH (ormone adrenocorticotropo), estradiolo, progesterone, FSH (ormone follicolo-stimolante), LH (ormone lutenizzante).
- Sia per il gruppo uomini che per il gruppo donne abbiamo dosato il cortisolo ai quattro orari stabiliti.

FASE 3. Valutazione delle variazioni dei livelli di BDNF ematico in uno studio di follow-up su pazienti affetti da episodio depressivo maggiore.

Sono stati reclutati (secondo criteri descritti successivamente) un totale di 15 pazienti con MDD in cura presso la clinica psichiatrica dell'Ospedale S.Chiera di Pisa, per uno studio di follow-up della durata di 180 giorni ed altrettanti soggetti come controlli sani.

Ai pazienti sono stati effettuati successivi prelievi di sangue, in particolare alle ore 11-12 del giorno 0 (drugs free) e a distanza di 7, 30, 90, 180 e 360 giorni dall'inizio del trattamento. Negli stessi giorni in cui è stato prelevato il sangue, il paziente veniva sottoposto anche a valutazione clinica tramite l'utilizzo di scale di valutazione eterologa HAM-A (Hamilton Anxiety Rating Scale), HAM-D (Hamilton Depression Rating Scale) e MADRS (Montgomery-Asberg Depression Rating Scale).

Dal sangue prelevato al paziente abbiamo isolato siero e plasma e successivamente sono stati dosati i livelli di BDNF tramite appositi Kit ELISA.

7.2.1 Reclutamento volontari

La scelta dei pazienti è stata fatta secondo i seguenti criteri:

- I pazienti sono stati valutati al momento dell'arruolamento e successivamente a distanza di due settimane, un mese, tre mesi, sei mesi ed un anno di follow-up. A questi tempi sono stati determinati i rispettivi livelli sierici e plasmatici di BDNF.

Criteri di inclusione

- A) Pazienti di età compresa tra 18 e 65 anni
- B) Pazienti afferenti agli ambulatori della Clinica Psichiatrica non in trattamento farmacologico da almeno due settimane.
- C) Pazienti nel corso di Episodio Depressivo Maggiore con o senza comorbidità lifetime per Disturbi d'Ansia (Disturbo di Panico, Fobia Sociale, Disturbo Ossessivo Compulsivo) con diagnosi, formulata in accordo ai criteri diagnostici del DSM-IV-TR, di:
 - Disturbo Depressivo Maggiore, Episodio Singolo
 - Disturbo Depressivo Maggiore, Ricorrente
 - Episodio Depressivo Maggiore in corso di Disturbo Bipolare I senza sintomi psicotici
 - Episodio Depressivo Maggiore in corso di Disturbo Bipolare II

Criteri di esclusione

- A) Pazienti con diagnosi (DSM-IV-TR) di Disturbo dell'Umore diversa da quella prevista nei criteri di inclusione.
- B) Pazienti con diagnosi di Dipendenza da Sostanze negli ultimi sei mesi.
- C) Pazienti in gravidanza.
- D) Pazienti non in grado di sottoscrivere un consenso informato scritto.

Per quanto riguarda il gruppo dei **controlli**, i criteri di reclutamento sono stati

- anamnesi negativa per disturbi somatici;
- anamnesi e familiarità negativa per disturbi psichiatrici, malattie neurologiche ed abuso di sostanze;

assenza di disturbi psichiatrici in atto accertata mediante intervista clinica.

7.2.2 Isolamento plasma e siero

1) plasma: il sangue viene prelevato in provette da emocromo contenenti EDTA (3ml), centrifugato a 4000 rpm x 15 min. ed il plasma recuperato e conservato a -80 °C.

2) siero: il sangue viene prelevato in provette contenenti Clot Activator. In accordo con i risultati ottenuti dalla prima fase, dopo la completa degranolazione delle piastrine, il campione viene centrifugato a 4000 rpm x 15 min ed il siero raccolto e conservato a -80°C.

7.3 VALUTAZIONE DEI PARAMETRI IN STUDIO

7.3.1 Trattamento dei campioni

I campioni vengono diluiti 1:5 con Dulbecco-PBS (DPBS), quindi si aggiunge HCl 1N in quantità tale che il pH sia circa 3. Dopo 15 minuti il campione viene riportato a pH 7 aggiungendo NaOH 1N; ogni campione è stato trattato individualmente.

7.3.2 Dosaggio del bdnf

Il dosaggio ELISA è un metodo specifico e sensibile per valutare la concentrazione di BDNF nel surnatante di colture tissutali, nel plasma, nel siero, nelle urine e negli estratti tissutali. Per la valutazione dei livelli di BDNF è stato usato un apposito kit commerciale (BDNF E_{max}, Promega).

Preparazione della piastra: Abbiamo utilizzato piastre Nunc Maxisorp™ per dosaggi ELISA in polistirene da 96 pozzetti, come consigliato dal protocollo.

Si aggiungono 100 µl di una soluzione contenente l'anticorpo monoclonale (mAb) anti-BDNF (10 µl di mAb anti-BDNF umano in 10 ml di coating buffer (NaHCO₃ 0.025 M, Na₂CO₃ 0.025 M; pH a 9.7) in ciascun pozzetto e si lascia incubare la piastra overnight a 4°C

Il giorno successivo dopo aver lavato ogni pozzetto con wash buffer (TBST) si aggiungono in ogni pozzetto 200 µl di soluzione di bloccaggio (Block & Sample 1X buffer) e si lascia incubare la piastra a temperatura ambiente per 1 ora.

Curva Standard: Per la valutazione del contenuto di BDNF nei campioni testati, occorre disporre di una curva a concentrazioni note di standard. A partire da una concentrazione di 1µg/ml di proteina pura (fornita con il kit) si effettuano diluizioni seriali in modo da ottenere una curva con concentrazioni note di BDNF 500pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml e 0 pg/ml.

- Il campione acidificato viene caricato nei pozzetti dopo esser stato opportunamente diluito con Block & Sample Buffer (per i campioni umani 1:100 per il siero; 1:30 per il plasma; per i campioni di ratto: siero 1:20, plasma 1:10, corteccia e liquor 1:5)
- La piastra, contenente standards e campioni, viene incubata per 2 ore a temperatura ambiente su un agitatore di piastra (400 ±100 rpm), quindi i pozzetti svuotati e lavati con TBST wash buffer (Tris HCl 20 mM (pH 7.6), NaCl 150mM, Tween ® 20 0.05% (v/v)).
- Si aggiunge pAb anti-BDNF umano diluito 1:500 con il buffer 1X Block & Sample e si fa una seconda incubazione di 2 ore a temperatura ambiente a 400 ±100 rpm., quindi i pozzetti svuotati e lavati con TBST wash buffer.
- Si aggiunge Ab anti-IgY HRP diluito 1:200 con il buffer 1X Block & Sample e si fa una terza incubazione di 1 ora a temperatura ambiente ed in agitazione (400 ±100

- rpm). Al termine dell'incubazione si procede nuovamente all'operazione di svuotamento e lavaggio dei pozzetti.
- Si aggiungono 100 μ l di TMB (tetramethyl benzidine) a temperatura ambiente come substrato colorimetrico (viraggio al blu); dopo una incubazione di circa 15 min., la reazione di viraggio viene stoppata con l'aggiunta di 100 μ l di acido idrocloridrico 1N (Carlo Erba, Italy). Quest'operazione determina il cambiamento del colore da blu a giallo, per cui la lettura dell'assorbanza è effettuata a 450 nm con un lettore di piastra (BIORAD, model 550).

7.3.3 Strumenti di valutazione e valutatori

Le valutazioni sono state effettuate da specializzandi della Clinica Psichiatrica di Pisa, affiancati da un clinico competente supervisore (Dr Armando Piccini).

Per la valutazione sono stati utilizzati:

1. Modulo anamnestico (Sistema Informativo per la Documentazione dell'Assistenza Psichiatrica).

Registra i Dati Anagrafici, l'Anamnesi Familiare, Fisiologica, le Condizioni Mediche Pregresse, il Progresso Uso di Sostanze e l'Anamnesi Psichiatrica. Tempo necessario alla somministrazione: 5'.

2. HAM-D (Hamilton Depression Rating Scale) (Hamilton, 1960).

L'HAM-D, nella versione probabilmente più diffusa (quella pubblicata nello "ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology", Guy, 1976), è composta da 21 item; di questi, il n° 16, Perdita di peso, è suddiviso in due sub-item mutuamente escludentisi che esplorano, uno la perdita di peso riferita ed uno quella misurata dalla bilancia; anche l'item n° 18, Variazioni diurne, è suddiviso in due sub-item, uno che esplora la presenza di variazioni diurne della sintomatologia ed il senso verso il quale vanno le eventuali variazioni (peggioramento mattutino o serale), ed uno la gravità delle eventuali variazioni. Generalmente i primi 17 item sono considerati quelli nucleari della depressione ed è su questi che di solito viene definito il cut-off di gravità che può essere così schematizzato:

- ≥ 25 depressione grave
- 24-18 depressione moderata
- 17-8 depressione lieve
- ≤ 7 assenza di depressione

La HAM-D è adatta per pazienti adulti con sintomatologia depressiva di qualsiasi tipo. La scala è adatta alla valutazione delle variazioni della sintomatologia sotto trattamento e può essere impiegata, perciò, nella fase precedente e successiva al trattamento.

3. MADRS (Montgomery-Asberg Depression Rating Scale) (Montgomery e Asberg, 1979).

La MADRS è nata dalla collaborazione della Scuola Inglese con quella Svedese. Ha le sue radici nell'esperienza fatta con la CPRS (Asberg et al., 1978) ed è stata creata con l'obiettivo di ottenere uno strumento sensibile alle variazioni della sintomatologia che si verificano nel corso del trattamento. In particolare, gli Autori si proponevano di ottenere uno strumento in grado di rilevare le differenze, non solo tra farmaco attivo e placebo, ma anche fra due o più farmaci attivi con meccanismo d'azione (e quindi, verosimilmente, con spettro d'azione) diverso, cosa che le RS disponibili difficilmente riuscivano a fare. La MADRS è composta da 10 item che esplorano l'umore depresso, la tensione, i disturbi del sonno e dell'appetito, la difficoltà di concentrazione, l'astenia, la perdita dei sentimenti, i pensieri pessimistici e quelli suicidari. Gli item sono valutati su di una scala a 7 punti (da 0, assente, a 6, massima gravità) di cui, 4 (0, 2, 4 e 6) definiti e 3 (1, 3 e 5) intermedi. Il punteggio globale, cioè la somma dei punteggi dei dieci item, esprime la gravità generale

della sintomatologia. La MADRS è adatta per la valutazione di pazienti adulti con sintomatologia depressiva di qualsiasi natura. La scala è stata costruita per la valutazione delle modificazioni della sintomatologia sotto trattamento ed è perciò adatta ad essere impiegata almeno al pre ed al post-trattamento; ulteriori valutazioni intermedie sono a discrezione del clinico. Per la valutazione si prende in considerazione ciò che il paziente riferisce ed il suo comportamento manifesto nel corso dell'intervista. Le caratteristiche psicometriche della scala sono risultate ottime. L'affidabilità è paragonabile a quella della HAM-D, con il vantaggio di un minor numero di item.

4. HAM-A (Hamilton Anxiety Rating Scale) (Hamilton, 1959).

L'HAM-A fu creata da Hamilton per la valutazione dei pazienti per i quali era già stata formulata una diagnosi di disturbo ansioso (o, con la terminologia di allora, di nevrosi ansiosa) e non per valutare l'ansia di pazienti affetti da altri disturbi psichici. Questo limita le possibilità di impiego della scala, ma la rende particolarmente valida quando si vogliono confrontare tra loro i pazienti con disturbi d'ansia. La scala pone l'accento soprattutto sullo stato soggettivo del paziente e, in misura minore, sull'osservazione. D'altronde, il vissuto soggettivo del paziente è certamente in primo piano tanto nel procedimento diagnostico che nella valutazione del cambiamento sotto l'effetto del trattamento. La scala, per espressa dichiarazione dell'Autore, deve essere impiegata per la valutazione di soggetti adulti affetti da "nevrosi ansiosa". L'HAM-A è composta da 14 item ognuno dei quali rappresenta, in realtà, un cluster nel quale sono raggruppati diversi sintomi (da 2 a 8) associati tra loro o per la loro natura o perché l'esperienza clinica indica che sono tra loro correlati. I diversi sintomi che compongono ciascun item sono indicati nel testo della scala. L'analisi fattoriale ha consentito di estrarre due fattori, uno di Ansia Somatica, che comprende gli item da 7 a 13, ed uno di Ansia Psicica, formato dai primi 6 item e dal 14°. Ciascun item è valutato su di una scala a 5 punti ("assente", "lieve", "moderato", "grave", "molto grave"). Il punteggio della scala può variare, pertanto, da 0 a 56. In realtà, il punteggio massimo è scarsamente usato ed è generalmente considerato più un punto di riferimento che un livello di gravità di uso pratico, per cui il limite superiore è generalmente molto più basso. Un punteggio totale intorno a 18 è considerato patologico. Il periodo preso in considerazione per la valutazione è, per gli aspetti soggettivi, quello della settimana precedente l'intervista, ed il momento stesso dell'intervista per gli aspetti comportamentali. L'HAM-A è stata esplicitamente proposta per la valutazione del cambiamento e viene perciò utilizzata al pre-trattamento ed almeno al post-trattamento; ulteriori valutazioni intermedie sono a discrezione del clinico.

Scale di valutazione

HAMILTON RATING SCALE FOR DEPRESSION HAM-D - # 049	
Cognome e Nome..... Data di nascita.....	
Codice Paziente..... Valutatore..... Data valutazione.....	
ISTRUZIONI GENERALI: Scegliere per ciascun item il punteggio che meglio caratterizza il paziente e riportarlo nella casella alla destra dell'item stesso.	
1- UMORE DEPRESSO <i>(Sentimento di tristezza, mancanza di speranza, sentimento di incapacità e di inutilità)</i> 0 = Assente 1 = Manifesta questi sentimenti solo se interrogato 2 = Espone spontaneamente questi sentimenti 3 = Comunica questi sentimenti con messaggi non verbali, cioè attraverso l'espressione del volto, la posizione del corpo, la voce e la tendenza al pianto 4 = Il paziente manifesta quasi esclusivamente questi sentimenti mediante messaggi sia verbali che non verbali	6 - INSONNIA RITARDATA 0 = Nessuna difficoltà 1 = Si risveglia precocemente (nelle prime ore del mattino), ma si riaddormenta 2 = È incapace di addormentarsi se si alza dal letto
2 - SENTIMENTI DI COLPA 0 = Assenti 1 = Autoaccusa, pensa di aver deluso la gente 2 = Idee di colpa o ripensamenti su errori passati o su azioni peccaminose 3 = L'attuale malattia è una punizione. Deliri di colpa 4 = Ode voci di accusa o di denigrazione e/o ha esperienze allucinatorie visive a contenuto minaccioso	7 - LAVORO E INTERESSI 0 = Nessuna difficoltà 1 = Pensieri e sentimenti di incapacità, facile affaticabilità o debolezza nelle attività (lavoro o hobby) 2 = Perdita d'interesse per le attività - lavoro o hobby - sia riferite direttamente dal paziente, sia espresse mediante atteggiamenti, quali indifferenza, indecisione ed incertezza <i>(frente che deve sforzarsi per lavorare)</i> 3 = Dedica un minor tempo alle attività o è meno efficiente 4 = Ha cessato di lavorare a causa della malattia
3 - SUICIDIO 0 = Assente 1 = Pensa che la vita non valga la pena di essere vissuta 2 = Vorrebbe essere morto o pensa alla possibilità di suicidarsi 3 = Idee o gesti di suicidio 4 = Tentativi di suicidio <i>fugati serio tentativo deve essere valutato '4')</i>	8 - RALLENTAMENTO <i>(Mancanza e linguaggio rallentati; ridotta capacità di concentrazione; alterata attività motoria)</i> 0 = Pensiero e linguaggio normali 1 = Lieve rallentamento durante il colloquio. 2 = Evidente rallentamento durante il colloquio 3 = Colloquio difficile 4 = Stato di arresto psicomotorio
4 - INSONNIA INIZIALE 0 = Nessuna difficoltà ad addormentarsi 1 = Lamenta di avere talvolta difficoltà ad addormentarsi (p. es., gli occorre più di mezz'ora) 2 = Ha sempre difficoltà ad addormentarsi	9 - AGITAZIONE 0 = Assente 1 = Inquietezza 2 = Gioca con le mani, con i capelli, ecc. 3 = Si muove continuamente, non riesce a stare seduto 4 = Si torce le mani, si morde le unghie, si tira i capelli, si morde le labbra
5 - INSONNIA CENTRALE 0 = Nessuna difficoltà 1 = Lamenta di essere diventato irrequieto durante la notte 2 = Si sveglia durante la notte - segnare "2" se si alza dal letto <i>(a meno che non sia per urinare)</i>	10 - ANSIA PSICHICA 0 = Assente 1 = Tensione soggettiva ed irritabilità 2 = Preoccupazioni per questioni di poco conto 3 = Atteggiamento apprensivo evidente dalla mimica e dal linguaggio 4 = Manifesta spontaneamente paura

<p>11 - ANSIA SOMATICA <i>ASPETTI SOMATICI DELL'ANSIA</i></p> <p>Gastrointestinali: secchezza delle fauci, meteorismo, indigestione, diarrea, crampi, eruttazione Cardiovascolari: palpitazioni, tachicardia Respirazione: iperventilazione, sospiri Genito-urinari: polachiuria Sudorazione</p> <p>0 = Assente 1 = Lieve 2 = Moderata 3 = Notevole 4 = Invalidante</p>	<p>B - VALUTAZIONE OBIETTIVA ESEGUITA PERIODICAMENTE</p> <p>0 = Meno di 500 g in una settimana 1 = Più di 500 g in una settimana 2 = Più di 1 Kg in una settimana 3 = Non valutata</p>
<p>12 - SINTOMI SOMATICI GASTROINTESTINALI</p> <p>0 = Assenti 1 = Perdita dell'appetito, ma si alimenta senza essere stimolato o aiutato dal personale. Senso di peso all'addome 2 = Difficoltà ad alimentarsi senza lo stimolo o l'aiuto del personale. Richiede o ha bisogno di lassativo o farmaci per i disturbi gastrointestinali</p>	<p>17 - INSIGHT</p> <p>0 = Riconosce di essere depresso ed ammalato 1 = Riconosce di essere ammalato, ma attribuisce la responsabilità alla cattiva alimentazione, al clima, al superlavoro, a malattie infettive, al bisogno di riposo 2 = Negativa decisamente di essere ammalato</p>
<p>13 - SINTOMI SOMATICI GENERALI</p> <p>0 = Assenti 1 = Pesantezza agli arti, alla schiena o alla testa. Mal di testa, mal di schiena, dolori muscolari. Perdita di energia e facile affaticabilità 2 = Se i sintomi sono molto evidenti segnare '2'</p>	<p>18 - VARIAZIONI DIURNE</p> <p><i>A - INVERCARE SEI SINTOMI SONO PIÙ GRAVI AL MATTINO O ALLA SERA</i></p> <p>0 = Nessuna variazione 1 = Più gravi al mattino 2 = Più gravi alla sera</p> <p><i>B - SE PRESENTI, VALUTARE L'ENTITÀ DELLE VARIAZIONI</i></p> <p>0 = Assenti 1 = Lievi 2 = Gravi</p>
<p>14 - SINTOMI GENTILI <i>(Sintomi quali: perdita delle fibre, disturbi mestruali)</i></p> <p>0 = Assenti 1 = Lievi 2 = Gravi</p>	<p>19 - DEPERSONALIZZAZIONE E DEREALIZZAZIONE <i>(Per es.: sentimenti di ottusità, idee di negazione)</i></p> <p>0 = Assente 1 = Lieve 2 = Moderata 3 = Notevole 4 = Invalidante</p>
<p>15 - IPOCONDRIA</p> <p>0 = Assente 1 = Polarizzazione sul proprio corpo 2 = Preoccupazione per la propria salute 3 = Frequenti lamentele, richieste di aiuto, ecc. 4 = Deliri ipocondriaci (ferma convinzione di avere una malattia somatica, senza che ve ne siano i motivi)</p>	<p>20 - SINTOMI PARANOIDEI</p> <p>0 = Assenti 1 = Sospettosità 2 = Idee di riferimento 3 = Deliri di riferimento e di persecuzione</p>
<p>16 - PERDITA DI PESO <i>(segnare A o B)</i></p> <p><i>A - SECONDO IL PAZIENTE O I FAMILIARI</i></p> <p>0 = Nessuna perdita di peso 1 = Probabile perdita di peso associata alla presente malattia 2 = Evidente perdita di peso 3 = Non valutata</p>	<p>21 - SINTOMI OSSESSIVI E COMPULSIVI</p> <p>0 = Assenti 1 = Lievi 2 = Gravi</p>

**MONTGOMERY-ASBERG DEPRESSION RATING SCALE
MADRS - # 380**

Cognome e Nome..... Data di nascita.....

Codice Paziente..... Valutatore..... Data valutazione.....

ISTRUZIONI GENERALI

La valutazione dovrebbe essere basata su un colloquio clinico che va da domande generali sui sintomi, a domande più specifiche, per consentire una precisa valutazione della gravità. L'esaminatore deve decidere se la risposta si colloca esattamente in uno dei punti definiti dalla scala (0, 2, 4, 6) o in un punto intermedio (1, 3, 5).

È eccezionale che un paziente depresso non possa essere valutato sugli item della scala. Se non è possibile ottenere dal paziente risposte chiare, si devono utilizzare, come base per la valutazione, tutte le indicazioni pertinenti e le informazioni ottenute da altre fonti, come generalmente si fa nella pratica clinica.

La scala può essere usata per valutazioni ripetute dopo intervalli di tempo a scelta del valutatore, settimanali o altro, ma è necessario specificare sempre il periodo esplorato.

<p>1 - TRISTEZZA MANIFESTA Scoraggiamento, depressione e disperazione (qualcosa di più di un semplice abbassamento del tono dell'umore) che traspaiono dal linguaggio, dalla mimica e dalla postura. <i>Valutare in base alla profondità e all'incapacità a reagire positivamente.</i></p>	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> 0</td> <td>Assenza di tristezza.</td> <td><input type="checkbox"/> 1</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 2</td> <td>Sembra scoraggiato, ma può rallegrarsi senza difficoltà.</td> <td><input type="checkbox"/> 3</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 4</td> <td>Appare triste ed infelice per la maggior parte del tempo.</td> <td><input type="checkbox"/> 5</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 6</td> <td>Appare infelice per tutto il tempo. Estremamente scoraggiato.</td> <td></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> 0	Assenza di tristezza.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Sembra scoraggiato, ma può rallegrarsi senza difficoltà.	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	Appare triste ed infelice per la maggior parte del tempo.	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	Appare infelice per tutto il tempo. Estremamente scoraggiato.	
<input type="checkbox"/> 0	Assenza di tristezza.	<input type="checkbox"/> 1											
<input type="checkbox"/> 2	Sembra scoraggiato, ma può rallegrarsi senza difficoltà.	<input type="checkbox"/> 3											
<input type="checkbox"/> 4	Appare triste ed infelice per la maggior parte del tempo.	<input type="checkbox"/> 5											
<input type="checkbox"/> 6	Appare infelice per tutto il tempo. Estremamente scoraggiato.												
<p>2 - TRISTEZZA RIFERITA Verbalizzazione di umore depresso, indipendentemente dal fatto che sia o meno anche manifesto. Comprende la malinconia, lo scoraggiamento o il sentimento di non poter essere aiutati, di essere senza speranza. <i>Valutare in base all'intensità, alla durata ed al grado in cui l'umore, da quanto riferito, viene influenzato dagli eventi.</i></p>	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> 0</td> <td>Tristezza occasionale in rapporto con le circostanze.</td> <td><input type="checkbox"/> 1</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 2</td> <td>Triste o malinconico, ma può rallegrarsi senza difficoltà.</td> <td><input type="checkbox"/> 3</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 4</td> <td>Sentimenti pervasivi di tristezza o malinconia. L'umore è ancora influenzato dalle circostanze esterne.</td> <td><input type="checkbox"/> 5</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 6</td> <td>Tristezza, disperazione o scoraggiamento permanenti o senza fluttuazioni.</td> <td></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> 0	Tristezza occasionale in rapporto con le circostanze.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Triste o malinconico, ma può rallegrarsi senza difficoltà.	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	Sentimenti pervasivi di tristezza o malinconia. L'umore è ancora influenzato dalle circostanze esterne.	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	Tristezza, disperazione o scoraggiamento permanenti o senza fluttuazioni.	
<input type="checkbox"/> 0	Tristezza occasionale in rapporto con le circostanze.	<input type="checkbox"/> 1											
<input type="checkbox"/> 2	Triste o malinconico, ma può rallegrarsi senza difficoltà.	<input type="checkbox"/> 3											
<input type="checkbox"/> 4	Sentimenti pervasivi di tristezza o malinconia. L'umore è ancora influenzato dalle circostanze esterne.	<input type="checkbox"/> 5											
<input type="checkbox"/> 6	Tristezza, disperazione o scoraggiamento permanenti o senza fluttuazioni.												
<p>3 - TENSIONE INTERNA Sentimenti di malessere mal definito, irritabilità, agitazione interiore, tensione nervosa crescente fino al panico, al terrore o all'angoscia. <i>Valutare in base ad intensità, frequenza, durata e grado di rassicurazione richiesta.</i></p>	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> 0</td> <td>Calmò. Tensione interna solo passeggera.</td> <td><input type="checkbox"/> 1</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 2</td> <td>Sensazioni occasionali d'irritabilità e di malessere mal definito.</td> <td><input type="checkbox"/> 3</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 4</td> <td>Sensazioni continue di tensione interna o panico intermittente che il paziente può controllare con difficoltà.</td> <td><input type="checkbox"/> 5</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 6</td> <td>Continuo stato di terrore o angoscia. Panico opprimente.</td> <td></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> 0	Calmò. Tensione interna solo passeggera.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Sensazioni occasionali d'irritabilità e di malessere mal definito.	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	Sensazioni continue di tensione interna o panico intermittente che il paziente può controllare con difficoltà.	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	Continuo stato di terrore o angoscia. Panico opprimente.	
<input type="checkbox"/> 0	Calmò. Tensione interna solo passeggera.	<input type="checkbox"/> 1											
<input type="checkbox"/> 2	Sensazioni occasionali d'irritabilità e di malessere mal definito.	<input type="checkbox"/> 3											
<input type="checkbox"/> 4	Sensazioni continue di tensione interna o panico intermittente che il paziente può controllare con difficoltà.	<input type="checkbox"/> 5											
<input type="checkbox"/> 6	Continuo stato di terrore o angoscia. Panico opprimente.												
<p>4 - RIDUZIONE DEL SONNO Riduzione della durata o della profondità del sonno rispetto al tipo di sonno del paziente quando stava bene.</p>	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> 0</td> <td>Dorme come al solito.</td> <td><input type="checkbox"/> 1</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 2</td> <td>Lieve difficoltà ad addormentarsi o sonno leggermente diminuito, superficiale o agitato.</td> <td><input type="checkbox"/> 3</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 4</td> <td>Sonno diminuito o interrotto per almeno 2 ore.</td> <td><input type="checkbox"/> 5</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 6</td> <td>Meno di 2 o 3 ore di sonno.</td> <td></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> 0	Dorme come al solito.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Lieve difficoltà ad addormentarsi o sonno leggermente diminuito, superficiale o agitato.	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	Sonno diminuito o interrotto per almeno 2 ore.	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	Meno di 2 o 3 ore di sonno.	
<input type="checkbox"/> 0	Dorme come al solito.	<input type="checkbox"/> 1											
<input type="checkbox"/> 2	Lieve difficoltà ad addormentarsi o sonno leggermente diminuito, superficiale o agitato.	<input type="checkbox"/> 3											
<input type="checkbox"/> 4	Sonno diminuito o interrotto per almeno 2 ore.	<input type="checkbox"/> 5											
<input type="checkbox"/> 6	Meno di 2 o 3 ore di sonno.												

<p>5 - RIDUZIONE DELL'APPETITO Perdita dell'appetito rispetto a quello abituale. <i>Valutare in base alla perdita del desiderio di mangiare o al bisogno di sforzarsi a mangiare.</i></p>	<p><input type="checkbox"/> 0 Appetito normale o aumentato. <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 Appetito leggermente ridotto. <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 Mancanza di appetito. Il cibo non ha sapore. <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 Bisogna insistere perché mangi qualcosa.</p>
<p>6 - DIFFICOLTÀ DI CONCENTRAZIONE Difficoltà a raccogliere le idee che può giungere fino all'incapacità a concentrarsi. <i>Valutare in base all'interessità, alla frequenza ed al grado di compromissione.</i></p>	<p><input type="checkbox"/> 0 Nessuna difficoltà di concentrazione. <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 Occasionale difficoltà a raccogliere le idee. <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 Difficoltà a concentrarsi ed a mantenere l'attenzione con riduzione della capacità di leggere o di sostenere una conversazione. <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 Incapace di leggere o di conversare se non con grande difficoltà.</p>
<p>7 - STANCHEZZA Difficoltà a cominciare la giornata o lentezza ad iniziare ed a compiere le attività quotidiane.</p>	<p><input type="checkbox"/> 0 Praticamente nessuna difficoltà ad iniziare la giornata. Assenza di lentezza. <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 Difficoltà ad iniziare un'attività. <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 Difficoltà ad iniziare attività abituali che vengono eseguite con fatica. <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 Estrema stanchezza. Incapace di fare alcunché senza aiuto.</p>
<p>8 - INCAPACITÀ DI PROVARE SENSAZIONI Esperienza soggettiva di una diminuzione di interesse per l'ambiente circostante o per le attività che normalmente procurano piacere. La capacità di reagire in maniera emotivamente appropriata alle circostanze o alla gente è ridotta.</p>	<p><input type="checkbox"/> 0 Normale interesse per l'ambiente circostante e per le persone. <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 Ridotta capacità di provare piacere per gli interessi abituali. <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 Perdita d'interesse per l'ambiente circostante. Riduzione dei sentimenti verso amici e conoscenti. <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 Sentimento di paralisi emotiva, incapacità di provare collera, dispiacere o piacere, completa incapacità, vissuta anche con dolore, di sentire qualcosa per i parenti e per gli amici più stretti.</p>
<p>9 - PENSIERI PESSIMISTICI Idee di colpa, d'inferiorità, di autoaccusa, di peccato, di rimorso e di rovina.</p>	<p><input type="checkbox"/> 0 Assenza di idee pessimistiche. <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 Idee fluttuanti di insuccesso, di autoaccusa o di autosvalutazione. <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 Persistenti idee di autoaccusa o chiare idee di colpa o di peccato, ma su basi razionali. Pessimismo circa il futuro. <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 Idee deliranti di rovina, di rimorso o di colpe impendibili. Autoaccuse assurde e irremovibili.</p>
<p>10 - IDEE DI SUICIDIO Sentimento che la vita non vale la pena di essere vissuta; che la morte naturale sarebbe benvenuta; idee di suicidio e preparativi di suicidio. <i>I tentativi di suicidio non devono, di per sé, influenzare la valutazione.</i></p>	<p><input type="checkbox"/> 0 Si gode la vita o la prende come viene. <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 Stanco della vita. Fugaci idee di suicidio. <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 Sarebbe meglio essere morto. Ricorrenti idee di suicidio ed il suicidio è considerato come una soluzione possibile, mancano tuttavia progetti o intenzioni precise. <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 Progetti espliciti di suicidio se si presentasse l'occasione. Preparativi di suicidio.</p>

HAMILTON ANXIETY SCALE HAM-A - # 048	
Cognome e Nome..... Data di nascita.....	
Codice Paziente..... Valutatore..... Data valutazione.....	
ISTRUZIONI GENERALI Riportare nell'apposita casella il punteggio attribuito a ciascun item: 0 – Assente 1 – Lieve 2 – Moderato 3 – Grave 4 – Molto grave	
1- ANSIA Preoccupazioni, previsioni pessimistiche, paura del futuro, irritabilità	___
2- TENSIONE Senso di tensione, facile stancabilità, trasalimenti, facilità al pianto, tremiti, sensazione di irrequietudine, incapacità a rilassarsi	___
3- PAURE Del buio, degli estranei, di essere lasciato solo, degli animali, del traffico, della folla	___
4- INSONNIA Difficoltà ad addormentarsi, sonno interrotto, sonno non riposante e senso di stanchezza al risveglio, sogni, incubi, terrori notturni	___
5- SFERA INTELLETTIVA Difficoltà a concentrarsi, riduzione della memoria	___
6- UMORE DEPRESSO Perdita di interessi, incapacità a trovare piacere negli hobby, depressione, risveglio precoce, alternanza diurna	___
7- SINTOMI SOMATICI (APPARATO MUSCOLARE) Dolori muscolari, senso di stiramento, irrigidimento, contrazioni cloniche, denti serrati, voce tremula, aumento del tono muscolare	___
8- SINTOMI SOMATICI (ORGANI DI SENSO) Ronzii auricolari, visione confusa, vampi di caldo e di freddo, senso di debolezza, sensazioni di bucatore	___
9- SINTOMI CARDIOVASCOLARI Tachicardia, palpitazioni, dolori al petto, pulsazioni vasali, senso di svenimento, sospiri, dispnea	___
10- SINTOMI RESPIRATORI Senso di peso o di costrizione al torace, senso di soffocamento, sospiri, dispnea	___
11- SINTOMI GASTROINTESTINALI Difficoltà a deglutire, flatulenza, dolori addominali, pirosi, senso di ripienezza, nausea, vomito, borborigmi, meteorismo, perdita di peso, stipsi	___
12- SINTOMI GENITO-URINARI Pollachiuria, stimolo alla minzione, amenorrea, menorragie, comparsa di frigidità, ejaculatio praecox, perdita della libido, impotenza	___
13- SINTOMI A CARICO DEL S.N. AUTONOMO Secchezza delle fauci, rossore, pallore, tendenza a sudare, vertigini, cefalea, piloerezione	___
14- COMPORTAMENTO DEL SOGGETTO DURANTE L'ESAME Agitato, irrequieto, va avanti e indietro, tremore alle mani, fronte corrugata, faccia tirata, sospiri o tachipnea, pallore del volto, deglutizioni, ecc.	___

CAPITOLO 8

RISULTATI

8.1 Risultati della sperimentazione animale con Duloxetina

8.1.1 Studio acuto 1-24h

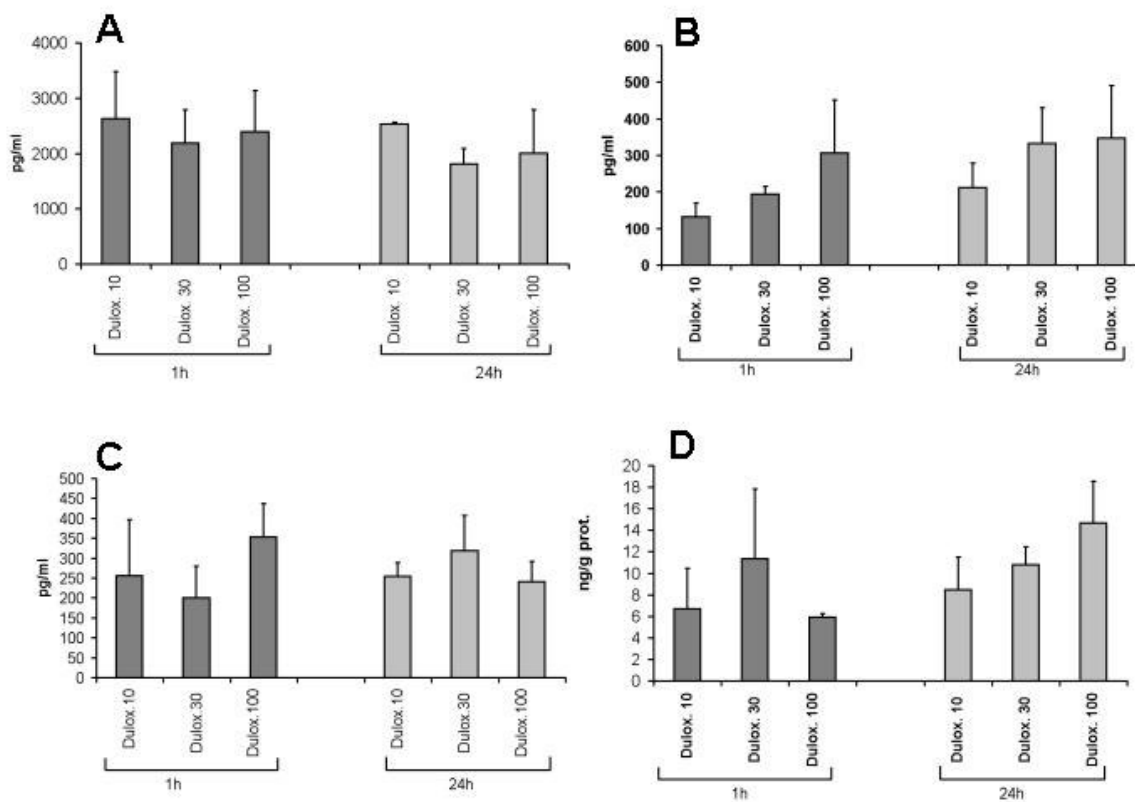


Fig. 9 variazione dei livelli di BDNF in ratti trattati con Duloxetina 10-30-100 mg/Kg e sacrificati dopo 1h e 24h A: Siero; B: Plasma; C:CSF; D:Corteccia

La somministrazione di Duloxetina alle diverse dosi (10, 30 e 100 mg/Kg) non ha determinato variazioni significative dei livelli di BDNF nei vari tessuti analizzati dopo 1 o 24h, indipendentemente dal dosaggio (Fig. 9).

8.1.2 Studio cronico

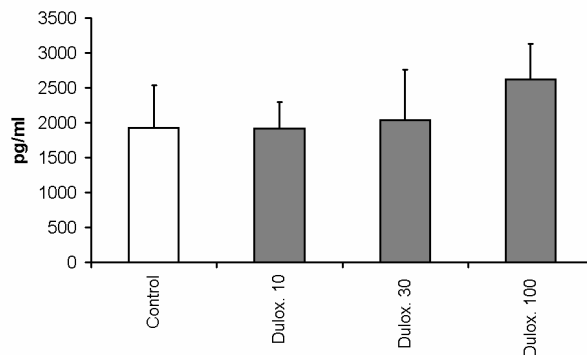


Fig. 10 Variazione di BDNF nel siero di ratti trattati con Duloxetina 10-30-100 mg/Kg per 14gg

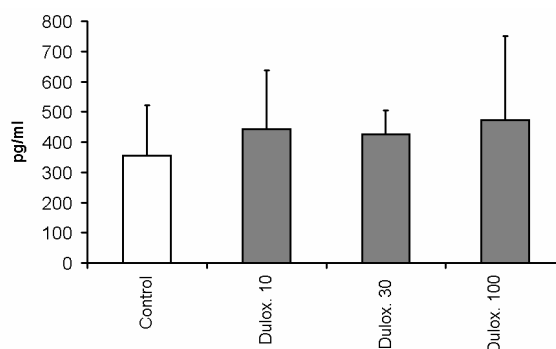


Fig. 11 Variazione di BDNF nel plasma di ratti trattati con Duloxetina 10-30-100 mg/Kg per 14gg

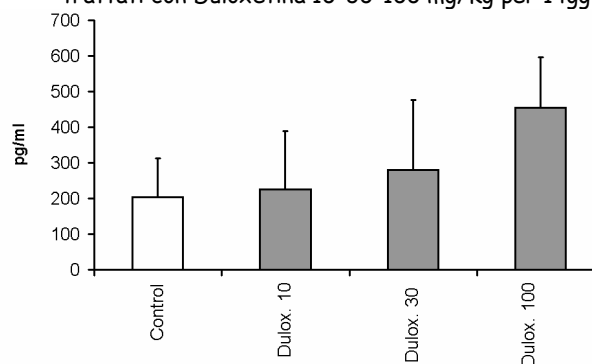


Fig. 12 Variazione di BDNF nel CSF di ratti trattati con Duloxetina 10-30-100 mg/Kg per 14gg

La somministrazione di Duloxetina a diverse dosi non determina variazioni dei livelli di BDNF sierico dopo 14gg di trattamento (Fig.10).

Per quanto riguarda i livelli plasmatici di BDNF, se pure le concentrazioni 30 e 100 mg/kg determinano un aumento, tale aumento può costituire solo un trend, in quanto non risulta ancora significativo (Fig. 11).

La valutazione dei campioni di liquor da animali trattati con le diverse dosi di Duloxetina, non ha permesso di determinare variazioni significative per i livelli di BDNF nel liquor: come

nel caso del plasma, l' aumento della concentrazione di BDNF per le dosi 30 e 100 mg/kg non risulta infatti ancora significativo (Fig.12). In questo caso, tuttavia, non si preferisce parlare di trend positivo, in quanto l'estrazione del liquor si presta a frequente contaminazione ematica.

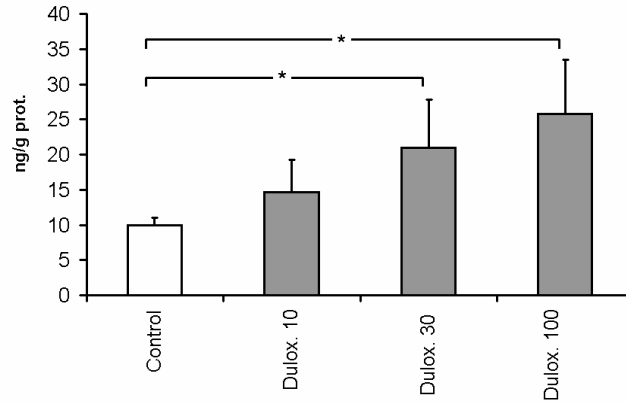


Fig. 13 Variazione di BDNF nella Corteccia Prefrontale di ratti trattati con Duloxetina 10-30-100 mg/Kg per 14gg

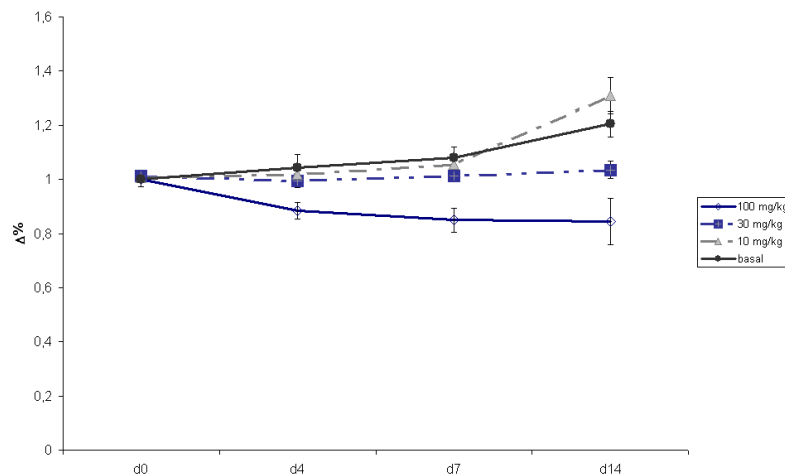


Fig. 14 Variazione del peso corporeo di ratti trattati con Duloxetina 10-30-100 mg/Kg per 14gg (espresso come variazione incrementale rispetto al giorno 0)

La somministrazione di Duloxetina a diverse dosi non determina variazioni significative dei livelli di BDNF corticale dopo 14gg di trattamento nei ratti trattati con la dose più bassa. Nei ratti trattati con 30 e 100 mg/kg di Duloxetina si osserva invece un aumento significativo del BDNF corticale rispetto al gruppo controllo ($p < 0.05$) (Fig. 13).

Inoltre, durante il periodo del trattamento si è osservato per i ratti trattati con la dose maggiore di Duloxetina, una sensibile riduzione del peso ponderale: il grafico in fig. 14 è espresso come variazione incrementale del peso onde evitare differenze individuali di peso. Mentre per le concentrazioni 10mg/kg si osserva una crescita normale, per la dose 100 si osserva una riduzione significativa ($p < 0.05$) a partire dal 7° giorno di trattamento rispetto agli altri gruppi; la concentrazione 30mg/Kg presenta solo una tendenza alla riduzione.

8.2 Risultati della sperimentazione condotta su volontari

8.2.1 Risultati della Fase 1: Valutazione del rilascio di BDNF da piastrine attivate

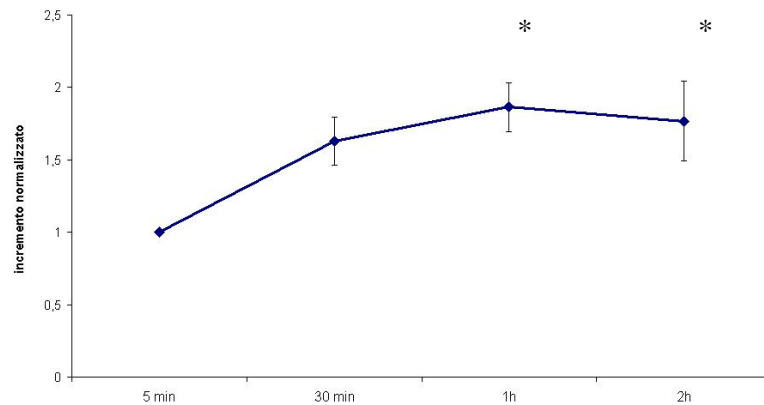


Fig.15: Variazione dei livelli sierici del BDNF con modalità tempo-dipendente dal tempo di coagulazione (* $p < 0.05$)

La Fig. 15 riassume i dati emersi dallo studio pilota condotto sul sangue di volontari umani: la massima degranolazione e rilascio piastrinico si verifica, cioè, dopo almeno 1h dal prelievo, utilizzando provette contenenti Clot Activator (i dati sono stati espressi come variazione incrementale rispetto al tempo 5min.).

I dati ottenuti sono stati utilizzati nella stesura del protocollo della Fase 2 e 3 di questa sezione sperimentale.

8.2.2 Risultati della Fase 2: Valutazione delle variazioni circadiane dei livelli ematici di BDNF.

8.2.2.GRUPPO UOMINI

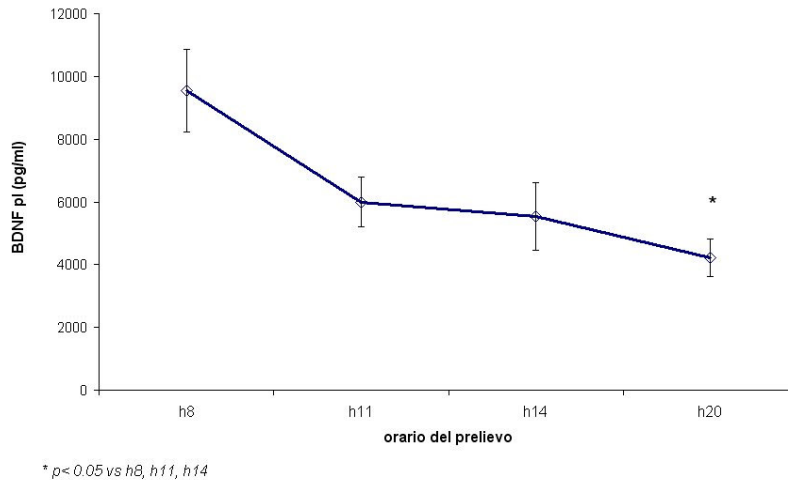


Fig. 16: variazione della concentrazione plasmatica di BDNF

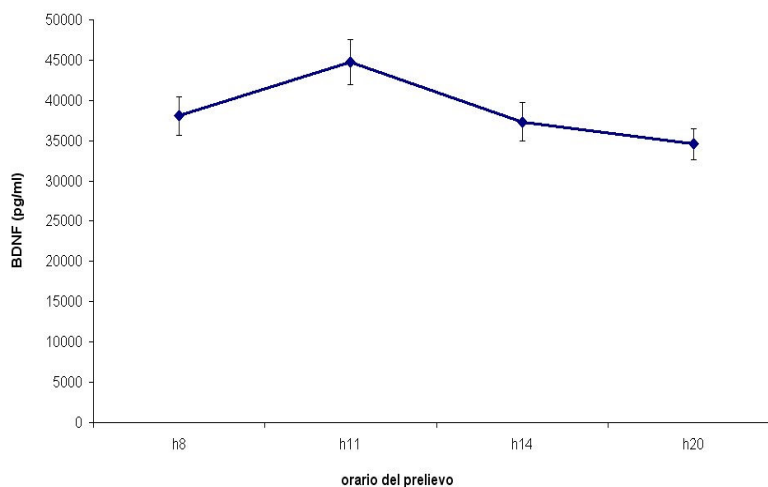


Fig. 17: variazione della concentrazione sierica di BDNF

Il primo gruppo sperimentale allestito era composto da volontari sani di sesso maschile tutti di età compresa tra 25-35 anni.

I dati emersi hanno evidenziato la presenza di una fluttuazione circadiana nel plasma, caratterizzata da una riduzione significativa della quota plasmatica alle ore 20 (Fig. 16); nel siero non è stato possibile evidenziare tale andamento (Fig.17).

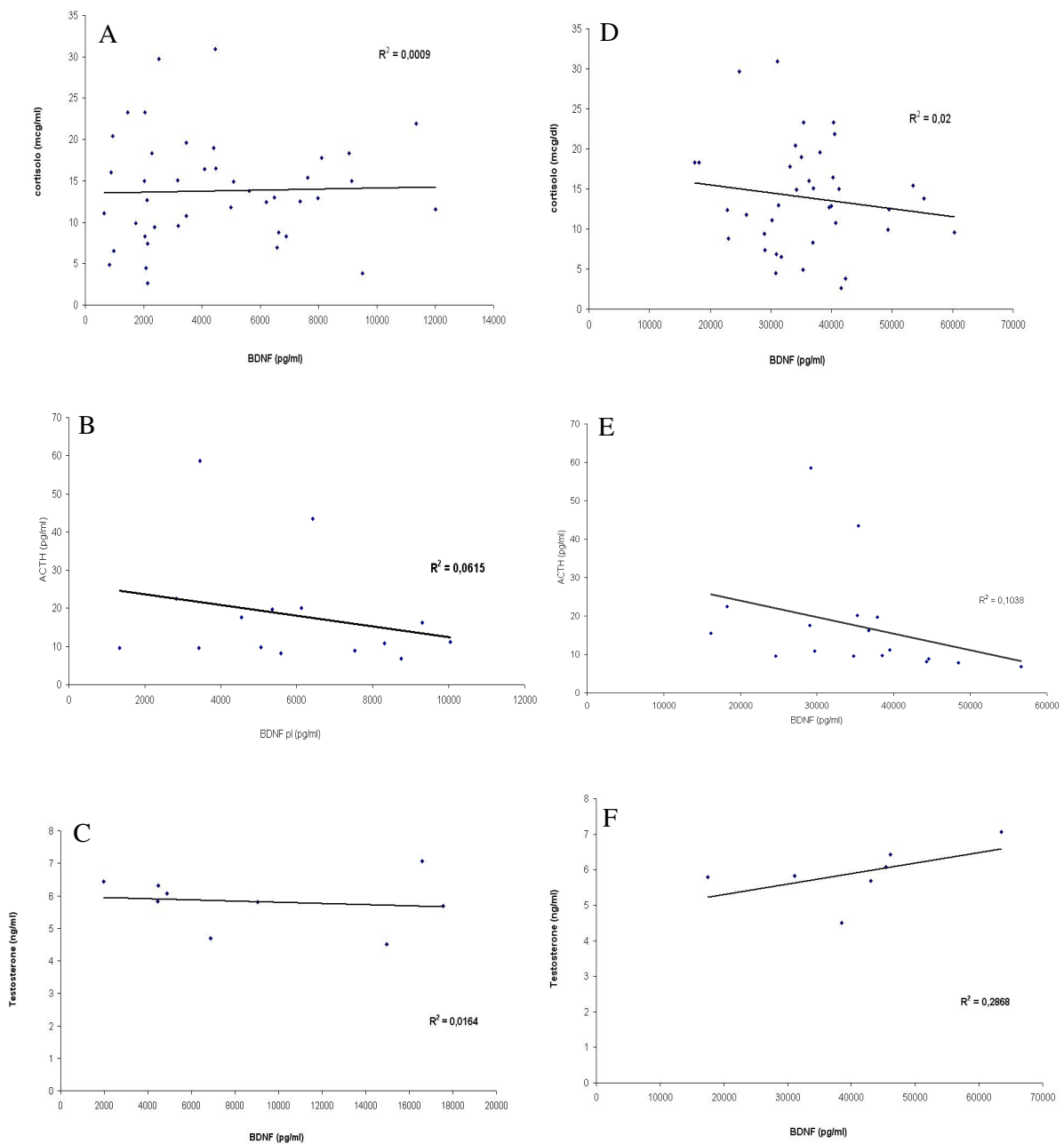


Fig. 18: Correlazione tra Cortisolo, ACTH, Testosterone e BDNF plasmatico (A,B,C) o sierico (D,E,F)

La valutazione delle correlazioni dei diversi ormoni con i livelli ematici della neurotrofina confermano l'assenza di una correlazione con cortisolo [Fig. 18 -A (plasma); 18-D (siero)] e con ACTH [Fig. 18-B (plasma); 18-E (siero)]. Non sono state inoltre trovate correlazioni neanche con il Testosterone [Fig. 18-C (plasma); 18-F (siero)].

8.2.2 GRUPPO DONNE

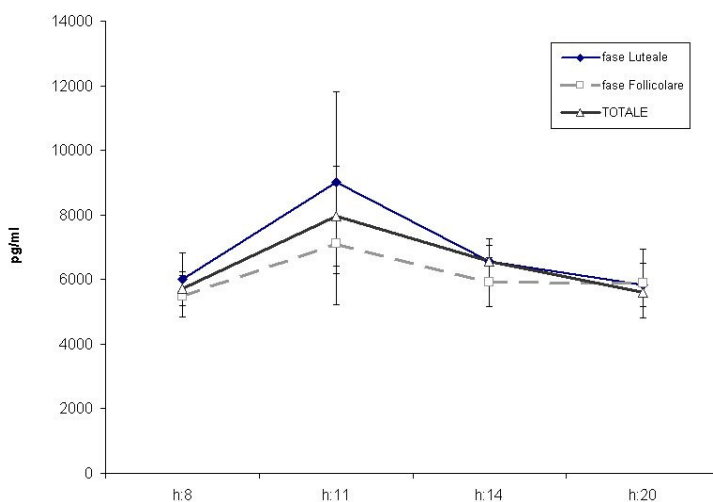


Fig. 19: variazione dei livelli di BDNF nel plasma.

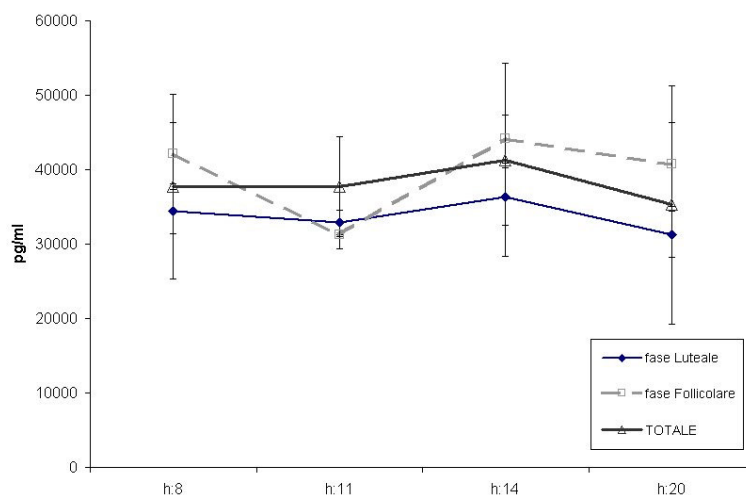


Fig. 20: variazione dei livelli di BDNF nel siero.

La valutazione del contenuto sierico e plasmatico di BDNF nelle due fasi del ciclo sessuale femminile ha evidenziato come vi sia un'alta variabilità soggettiva di questo parametro, analogamente a quanto osservato nel gruppo uomini; tuttavia, i due parametri non risultano influenzati dalla fase del ciclo, come ben evidenziato in Fig. 19 e 20.

Infine, diversamente da quanto osservato nel gruppo uomini, non è possibile osservare variazioni di tipo circadiano né dei livelli plasmatici (Fig. 19), né di quelli sierici (Fig. 20).

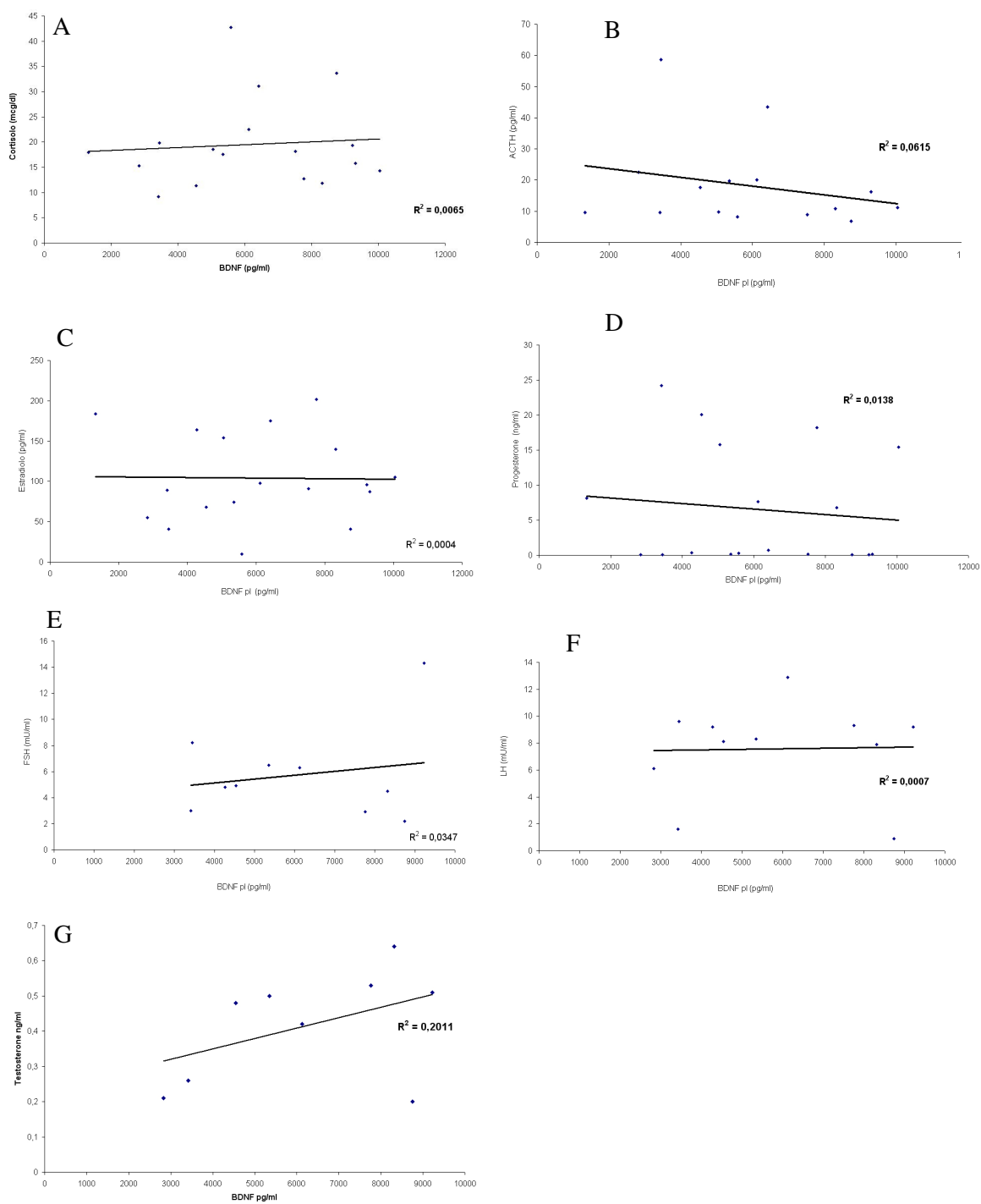


Fig. 21 Correlazioni tra ormoni e BDNF plasmatici: Cortisolo (A), ACTH (B), Estradiolo (C), Progesterone (D), LH (E), FSH (F), Testosterone (G).

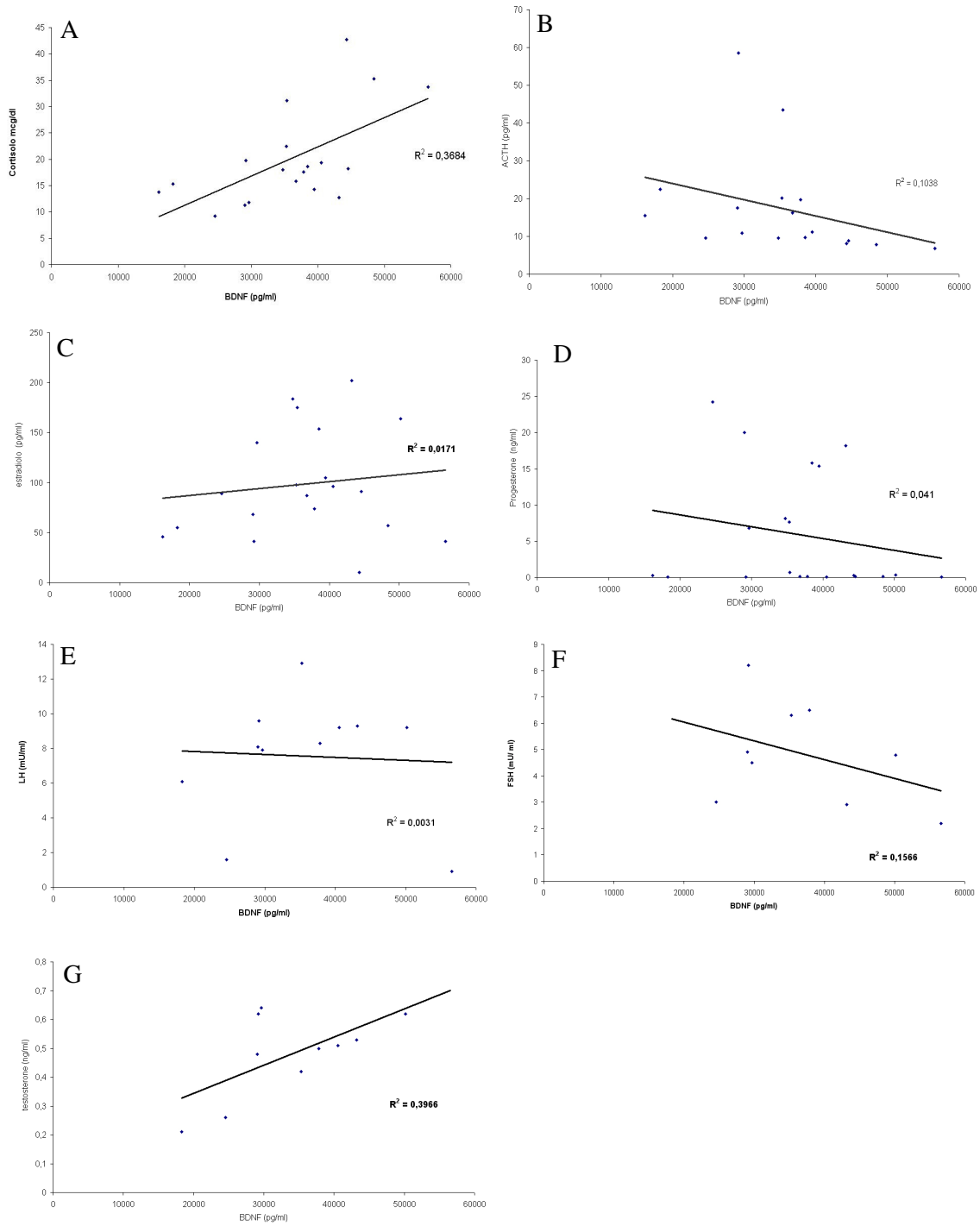


Fig. 22 Correlazioni tra ormoni e BDNF sierico: Cortisolo (A), ACTH (B), Estradiolo (C), Progesterone (D), LH (E), FSH (F), Testosterone (G).

La valutazione delle correlazioni dei diversi ormoni con i livelli ematici della neurotrofina, come nel caso del gruppo uomini, non permettono di identificare correlazioni del BDNF con cortisolo (Fig. 21-A e 22-A), né con ACTH (Fig. 21-B e 22-B).

Non sono state inoltre trovate correlazioni con gli ormoni sessuali esaminati, come evidenziato dai grafici riportati (Estradiolo: Fig. 21-C e 22-C; Progesterone: Fig. 21-D e 22-D; LH: Fig. 21-E e 22-E; FSH: Fig. 21-F e 22-F; Fig. 21-G e 22-G).

8.2.3 Risultati della Fase 3: Valutazione delle variazioni dei livelli di BDNF ematico in uno studio di follow-up su pazienti affetti da episodio depressivo maggiore.

Caratteristiche	Pazienti affetti da EDM (N=15)		Soggetti di controllo (N=15)		Analisi
	N	%	N	%	p
Sesso (femmine)	13	87	12	80	n.s.
	Media	DS	Media	DS	p
Età (anni)	47	10,8	36,90	9,20	0.01

Tabella 1: caratteristiche demografiche dei soggetti partecipanti allo studio.

Il gruppo di pazienti affetti da episodio depressivo maggiore (n=15) era costituito in maggioranza da femmine (87%) con un'età media di 47±10,8 anni, coniugate (73%) e con un'occupazione lavorativa al momento dell'arruolamento (60%). Il 47% dei pazienti presentava un'anamnesi familiare negativa per disturbi di interesse psichiatrico; nei restanti casi è stata riscontrata positività per depressione maggiore e disturbo di panico od alcolismo (40 e 13% del campione, rispettivamente).

Per circa la metà dei pazienti (47%) si trattava del primo episodio depressivo; il 53% dei casi aveva già sofferto di almeno un episodio depressivo in passato (età di esordio variabile tra 22 e 60 anni). 7 pazienti presentavano comorbidità lifetime per disturbo di panico.

Nel trattamento farmacologico dell'episodio depressivo attuale sono stati utilizzati: citalopram, sertralina o paroxetina (nel 53, 33 e 14% del campione, rispettivamente). In 6 pazienti un antidepressivo triciclico (amitriptilina, trimipramina od imipramina) è stato associato al trattamento con SSRI, in 3 soggetti infine è stato utilizzato uno stabilizzante dell'umore (acido valproico).

Il gruppo di controllo era costituito nell'80% dei casi da femmine con un'età media di 36,9±9,2 anni, in maggioranza coniugate (60% del campione) e con un'occupazione lavorativa al momento dell'arruolamento (85%).

	Pazienti affetti da EDM (N=15)												Soggetti di controllo (N=15)		Analisi [§] p
	Baseline (n=15)		2 settimane (n=12)		1 mese (n=9)		3 mesi (n=9)		6 mesi (n=8)		1 anno (n=7)		Media	DS	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS			
Punteggio HAM-D	22,80	5,30	17,30	8,30	12,20	5,70	8,00	5,80	6,90	7,20	3,90	4,80	--	--	<0.01 ^a
Punteggio MADRS	29,60	5,60	22,50	9,30	16,80	6,80	10,70	7,80	8,60	8,80	7,70	10,30	--	--	<0.01 ^b
Punteggio HAM-A	23,13	5,90	17,40	6,39	13,80	4,70	8,30	5,90	6,50	6,20	5,90	8,10	--	--	<0.001 ^c
BDNF sierico (ng/ml)	19,30	8,80	17,90	8,50	22,10	8,40	24,50	9,90	21,50	5,10	18,80	4,10	33,60	8,60	<0.001 ^d , <0.01 ^e , <0.05 ^g
BDNF plasmatico (ng/ml)	2,88	0,49	2,99	0,80	4,41	1,11	6,76	1,33	7,72	2,61	2,24	0,64	5,40	2,30	0.002 ^f , 0.001 ^h

Tabella 2: caratteristiche cliniche dei soggetti partecipanti allo studio

Legenda Tabella 2

§ Mann-Whitney test applicato nel confronto tra i valori di BDNF di ogni tempo rispetto al valore dei soggetti di controllo (riportate le significatività)

Mann-Whitney test applicato nel confronto tra il punteggio alle scale HAM-D, MADRS ed HAM-A di ogni tempo di valutazione rispetto al baseline

a punteggio HAM-D dei pz ad uno, 3, 6mesi ed un anno vs. punteggio HAM-D dei pz al baseline

b punteggio MADRS dei pz ad uno, 3, 6mesi ed un anno vs punteggio MADRS dei pz al baseline

c punteggio HAM-A dei pz ad uno, 3, 6mesi ed un anno vs. punteggio HAM-A dei pz al baseline

d BDNF sierico dei pz al baseline, a 2 settimane e ad 1 anno vs. BDNF sierico dei soggetti di controllo

f BDNF sierico dei pz ad uno e 6 mesi vs. BDNF sierico dei soggetti di controllo

g BDNF sierico dei pz a 3 mesi vs. BDNF sierico dei soggetti di controllo

h BDNF plasmatico dei pz al baseline vs. BDNF plasmatico dei soggetti di controllo

i BDNF plasmatico dei pz a 2 settimane vs. BDNF plasmatico dei soggetti di controllo

Per quel che concerne i punteggi delle scale HAM-D, MADRS ed HAM-A, sono emerse differenze significative a partire dall'osservazione ad un mese per ciascuna scale utilizzata. I punteggi medi ad un anno sono risultati pari a $3,9 \pm 4,8$, $7,7 \pm 10,3$ e $5,9 \pm 8,1$ nelle scale HAM-D, MADRS ed HAM-A, rispettivamente (Tab.2).

La tabella 2 riporta inoltre i valori sierici e plasmatici medi di BDNF: alla valutazione iniziale i pazienti hanno mostrato livelli medi di BDNF sierico e plasmatico di $19,3 \pm 8,8$ ng/ml e $2,9 \pm 0,5$ ng/ml, rispettivamente. Quest' ultimo parametro è risultato significativamente inferiore rispetto a quello presentato dal gruppo di controllo ($p=0.002$). Anche il valore medio a due settimane di BDNF plasmatico dei pazienti è stato significativamente più basso rispetto a quello dei controlli ($p=0.001$). Non sono emerse differenze significative ulteriori dal confronto dei livelli di BDNF ai tempi successivi tra i due gruppi.

Ad un anno dall'inizio del trattamento il campione, limitato a 7 pazienti, presentava valori medi sierici e plasmatici di BDNF di $18,8 \pm 4,1$ ng/ml e $2,24 \pm 0,64$ ng/ml che, pur inferiori, non differivano significativamente da quelli presentati dal gruppo di controllo. Diversamente dai valori plasmatici, i livelli sierici di BDNF non hanno mostrato differenze statisticamente significative confrontando il valore di ogni tempo di valutazione rispetto a quello riscontrato al baseline. Ciascun valore sierico è risultato comunque significativamente inferiore rispetto a quello dei soggetti di controllo.

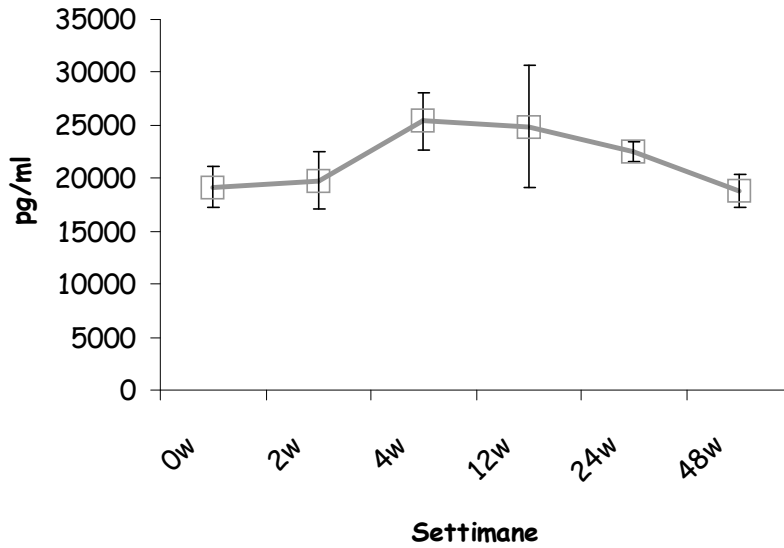


Fig. 23: variazione dei livelli sierici di BDNF durante il periodo di follow-up

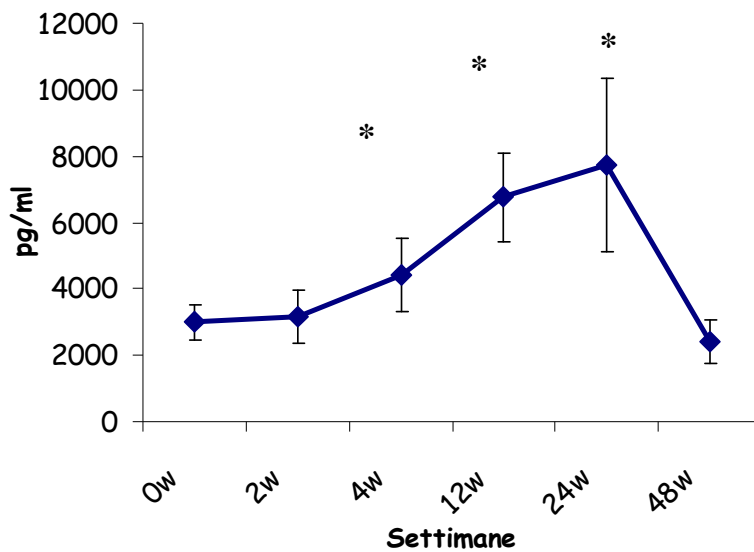


Fig. 24: variazione dei livelli plasmatici di BDNF durante il periodo di follow-up

I grafici sopra riportati illustrano le variazioni dei valori medi sierici (Fig. 23) e plasmatici (Fig. 24) di BDNF nei pazienti durante il follow-up: sono state riscontrate differenze statisticamente significative comparando il valore plasmatico iniziale di BDNF con quello ad uno, tre e sei mesi, rispettivamente ($p < 0.05$), mentre ad un anno non si osservano variazioni dal valore iniziale ($p = 0.78$); l'andamento dei valori sierici di BDNF non ha presentato al contrario differenze significative tra le singole osservazioni.

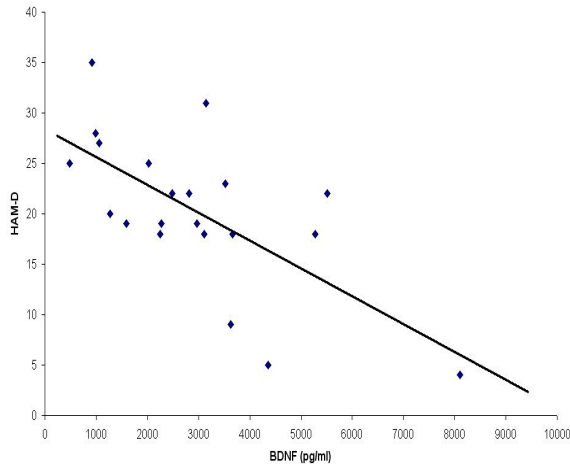


Fig. 25: correlazione tra HAM-D e BDNF plasmatico

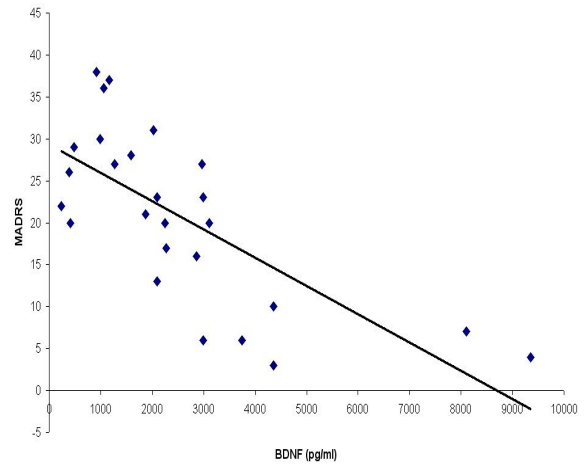


Fig. 26: correlazione tra MADRS e BDNF plasmatico

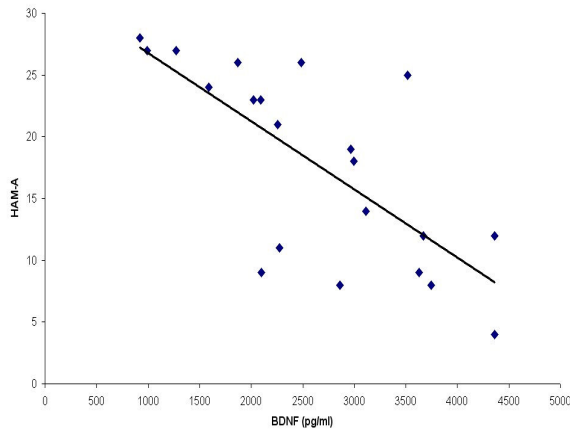


Fig. 27: correlazione tra HAM-A e BDNF plasmatici

L'analisi delle correlazioni tra variabili cliniche e valore plasmatico di BDNF ha permesso di osservare la presenza di una correlazione significativa di inversa proporzionalità tra i valori plasmatici di quest'ultimo e la gravità della sintomatologia depressiva espressa dai punteggi alle scale HAM-D ($r = -0,606$; $p = 0,017$) (Fig. 25) e MADRS $r = -0,564$; $p = 0,028$) (Fig. 26). Una correlazione analoga è emersa tra il valore plasmatico di BDNF ed il punteggio alla scala HAM-A, sebbene non abbia mostrato significatività (Fig. 27).

Al contrario, le correlazioni tra i livelli sierici di BDNF ed i punteggi alle scale psicopatologiche non sono risultate statisticamente significative.

Un modello di analisi multivariata dove il valore plasmatico di BDNF figurava come variabile indipendente ed il punteggio alla scala HAM-D, l'età e la presenza di comorbidità lifetime per disturbo di panico come variabili indipendenti, ha mostrato che la variazione nei livelli di BDNF plasmatico era condizionata prevalentemente dalla gravità della sintomatologia depressiva ($F = 4,163$; $P = 0,042$).

CAPITOLO 9

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il BDNF è la neurotrofina maggiormente diffusa nel cervello, soprattutto nell'ippocampo, nella neocorteccia e nell'ipotalamo [Ernfors et al., 1990, 1992; Maisonpierre et al., 1990; Hofer et al., 1990; Castren et al., 1995; Kato-Semba et al., 1997]; inoltre anche il suo recettore TrkB è quello che tra la famiglia dei Trk presenta la maggior distribuzione a livello corticale [Aloyz et al., 1999].

A livello periferico il BDNF viene sintetizzato e rilasciato da popolazioni cellulari non neuronali [Scarlsbrick et al., 1993; Ernfors et al., 1990; Hiltunen et al., 1996; Maisonpierre et al., 1990; 1991] e si ritrova nel circolo ematico [Rosenfeld et al. 1995; Radka et al., 1996], soprattutto immagazzinato nelle piastrine [Fujimura et al., 2002].

Essendo implicato nei meccanismi che regolano la neurogenesi, la sopravvivenza cellulare e la plasticità sinaptica [Lessmann, 1998 (a), (b); Schuman, 1999; Schinder et Poo, 2000; Schinder et al., 2000], già da tempo è documentato il coinvolgimento del BDNF in patologie neurodegenerative quali Alzheimer e Parkinson.

Ricerche effettuate negli ultimi anni hanno mostrato come il BDNF potrebbe essere implicato anche nell'insorgenza della patologia depressiva [Altar et al., 1999; Chen et al., 2001; Shimizu et al., 2003], anche alla luce delle osservazioni derivanti da studi di anatomia patologica condotti post-mortem e che evidenziano tratti di neurodegenerazione ed atrofia in aree specifiche di pazienti MDD [Manji et al., 2000; Rajkowska, 2000; Ongur et al., 1998; Rajkowska et al., 1999].

Questi aspetti, hanno suggerito il coinvolgimento delle neurotrofine e soprattutto del BDNF anche nei disturbi dell'umore: ulteriori studi post-mortem su pazienti depressi mostrano come vi sia una ridotta espressione di BDNF, mentre si osserva un recupero nei soggetti con episodio depressivo maggiore in trattamento farmacologico [Chen et al., 2001].

Questi dati hanno trovato una conferma anche in numerosi studi clinici condotti in vivo su pazienti depressi, nei quali è stata osservata una riduzione dei livelli sierici di BDNF rispetto ai soggetti normali [Karege et al., 2002], mentre soggetti depressi ma trattati con antidepressivi mostravano valori ematici di BDNF paragonabili ai soggetti sani [Shimizu et al., 2003].

9.1 Discussione dei dati dello studio su animali

La Duloxetina è un inibitore del reuptake di 5HT e NA, caratterizzato da un'alta e relativamente bilanciata affinità per entrambe i trasportatori dei due NT [Bymaster et al., 2001; Wong and Bymaster, 2002]; inoltre ha scarsissima affinità per i recettori Muscarinico, Colinergico, Histaminergico 1 ed altri [Bymaster et al., 2001; Wong et al., 1993].

L'impiego della Duloxetina si è mostrato efficace nel trattamento dell'MDD a dosi nel range 40 - 120 mg al giorno [Detke et al., 2002 (a),(b); Goldstein et al., 2002; 2004], tra cui casi di depressione grave [Andorn et al., 2005]. Per il trattamento dell'MDD negli USA ed in Europa, Duloxetina è commercializzata alle dosi 40-60 mg.

Il protocollo sperimentale ha permesso di valutare come l'efficacia della Duloxetina nel ratto sia da considerarsi per dosaggi superiori ai 10mg/Kg e per trattamenti prolungati col farmaco.

Come già dimostrato da altri lavori, non è possibile evidenziare effetti a breve termine della somministrazione di antidepressivi nei campioni biologici esaminati.

Al contrario, il trattamento con Duloxetina per 14gg determina variazioni del pool centrale del BDNF, con particolare attenzione al contenuto corticale, per i dosaggi 30 e 100, mentre la dose 10mg/Kg risulta priva di effetti significativi.

L'analisi del contenuto di BDNF negli altri campioni non ha consentito, analogamente allo studio acuto, di osservare variazioni: per quanto riguarda la valutazione dei livelli di BDNF su liquor, i dati emersi mostrano una evidente variabilità da attribuire alla contaminazione ematica, difficile da evitare durante la metodica di estrazione, mentre i livelli ematici della neurotrofina non risultano alterati né nel siero né nel plasma, se pure in quest'ultimo si possa parlare di trend.

A conferma dei ottenuti su tessuto cerebrale, uno studio condotto ratti trattati con dosaggi diversi di Fluoxetina ha riportato l'assenza di variazioni tissutali di BDNF in seguito a trattamento di tre settimane con bassi dosaggi di Fluoxetina, mentre per alti dosaggi viene registrato un aumento della biodisponibilità della neurotrofina [Engesser-Cesar et al., 2006].

Il protocollo su ratto ha permesso di evidenziare, infine, un effetto anoressizzanti del farmaco, apparentemente dose-dimendente; questo dato è in accordo con quanto già documentato in studi clinici: infatti, pazienti con disturbo depressivo maggiore trattati con Duloxetina, analogamente ad un secondo gruppo trattato con Fluoxetina, mostrano una riduzione dell'indice di massa corporea (BMI) dopo 8 settimane rispetto al gruppo placebo, mentre per trattamenti più a lungo termine (34 settimane) si osserva un recupero del BMI, che aumenta significativamente rispetto al gruppo placebo [Wise et al., 2006].

Del resto è ben noto che alcuni SSRI, come la Fluoxetina [Goldstein et al., 1994; Harto et al., 1988] e la Sertralina [Croft et al., 1999], sono associati ad una riduzione di peso a breve

termine, mentre nei trattamenti a lungo termine i pazienti tendono a recuperare peso [Michelson et al.,1999].

Diversamente da quanto osservato in studi clinici con pazienti in trattamento con antidepressivi, i livelli di neurotrofina nel sangue non variano, indipendentemente dal dosaggio, dopo 14gg: la spiegazione potrebbe essere che il periodo di trattamento di due settimane, scelto in accordo con la letteratura, non sia sufficiente per osservare variazioni periferiche del BDNF.

Quest' aspetto potrebbe trovare conferma dall'osservazione, già commentata, che nel nostro modello sperimentale si verifica un decremento ponderale, in analogia alla riduzione dell'indice di massa corporea riportato dagli studi clinici dopo 8-9 settimane di trattamento con Duloxetina: ne segue che risulta verosimile, alla luce anche dei risultati di altri lavori pubblicati, allineare il trattamento di 14gg nel ratto ad un trattamento di 8 settimane nell'uomo.

Del resto, a conferma di questa ipotesi, in un recente studio condotto su ratti trattati con Fluoxetina a dosaggi diversi, l'aumento ponderale dose - dipendente degli animali viene riportato solo dopo tre settimane di trattamento [Engesser-Cesar et al., 2006], per cui è possibile ritenere che la scelta della durata del periodo di somministrazione risulti fondamentale per delineare gli effetti della Duloxetina.

Conclusioni I

L'elemento di novità di questo studio consiste nella valutazione degli effetti della somministrazione di Duloxetina, un SNRI, in ratti nella regolazione dell'espressione e rilascio della neurotrofina BDNF.

Inoltre questo studio, a conferma della teoria neurotrofica della depressione e dei dati già riportati in letteratura per altri farmaci antidepressivi, evidenzia come, anche per alte concentrazioni di farmaco, non vi sia un effetto in acuto nel trattamento; piuttosto la regolazione dell'espressione del BDNF, analogamente alla comparsa degli effetti terapeutici, si verifica solo dopo trattamento prolungato.

Ulteriori contributi potranno comunque essere forniti utilizzando il farmaco in modelli sperimentali di stress/depressione, e procedendo ad una somministrazione più prolungata (3-4 settimane) del farmaco.

9.2 Discussione dei dati ottenuti su volontari

Il punto centrale della sperimentazione condotta su volontari era quello di indagare come il parametro BDNF variasse in una popolazione di pazienti depressi in cura presso la clinica psichiatrica dell'ospedale S.Chiera di Pisa, durante un periodo di follow-up di un anno. Lo scopo di questo studio era indagare se il BDNF ematico potessero essere considerato un biomarker per valutare l'efficacia della terapia.

Nell'allestimento di questa seconda sperimentazione abbiamo tenuto presente che esiste una variazione ritmica, a livello centrale, dell'mRNA e del contenuto proteico del BDNF in ratti [Berchtold et al., 1999; Bova et al., 1998; Liang et al., 1998; Schaaf et al., 2000], tant'è che alcuni autori ne ipotizzano l'esistenza anche a livello periferico; pertanto, prima di condurre lo studio sui pazienti, abbiamo indagato se potesse esservi una variazione ritmica giornaliera dei livelli sierici e/o plasmatici di questa neurotrofina, valutando anche la possibile influenza di fattori ormonali.

Occorre rammentare che il BDNF è una molecola estremamente suscettibile a fattori relazionati allo stile di vita e a condizioni soggettive (dieta, attività fisica, stress, stati infiammatori) [Lommatzsch et al., 2005; Russo-Neustadt et al., 1999; Smith et al., 1995], per cui risulta estremamente difficile poter reclutare volontari disposti a seguire, per un periodo di tempo sufficiente prima del prelievo, un regime standard molto controllato.

Lo studio sulla fisiologia del BDNF ematico ha permesso di evidenziare l'esistenza di fluttuazioni circadiane nel gruppo degli uomini, in particolare una riduzione dei livelli plasmatici alla sera, con valori massimi nelle prime ore della giornata. Questo stesso andamento medio non è stato tuttavia evidenziato nelle donne, a prescindere dalla fase del ciclo, nonostante siano state rilevate fluttuazioni dei valori plasmatici individuali.

Al contrario nei campioni di siero non sono state trovate differenze per i due sessi, così come non è stato possibile evidenziare alcuna significativa correlazione con gli ormoni esaminati.

A proposito dello studio su pazienti, si devono riconoscere alcune importanti limitazioni:

1. la scarsa numerosità campionaria e la prevalenza significativa del genere femminile;
2. circa la metà del campione (53%) è uscito dallo studio prima di completare le 48 settimane di osservazione: valori analoghi di *dropout rates* sono frequenti negli studi a lungo termine sui disturbi dell'umore;
3. il trattamento farmacologico è stato condotto in condizioni naturalistiche, per cui i dosaggi potevano presentare ampia variabilità.

Se pure quest'ultimo aspetto risulti una limitazione, i riscontri osservati durante lo studio si avvicinano maggiormente a quelli della realtà clinica ordinaria; inoltre, in riferimento al primo punto, la prevalenza femminile contribuisce a rendere il gruppo di studio omogeneo, pur limitando la generalizzazione dei risultati.

Passando al commento dei risultati, i dati hanno evidenziato differenze significative in termini di valori medi sierici e plasmatici di BDNF tra pazienti affetti da episodio depressivo maggiore ed una popolazione di controllo, con i primi che presentano livelli significativamente inferiori.

In seguito al trattamento farmacologico si riscontra un incremento significativo dei livelli medi di BDNF plasmatici, parallelamente al miglioramento della sintomatologia depressiva ed a partire dal primo mese, in accordo con la ben nota latenza di efficacia della terapia antidepressiva; questo ad eccezione dell'osservazione effettuata ad un anno, per la quale è stato registrato un livello di BDNF inferiore nei pazienti depressi in remissione rispetto ai controlli. Al contrario, l'andamento dei valori sierici di BDNF non ha mostrato differenze significative durante il periodo di follow-up.

Gli studi presenti in letteratura su pazienti con depressione riportano prevalentemente i valori sierici di BDNF, che risultano ridotti in pazienti depressi ed inversamente correlati con la gravità della sintomatologia depressiva [Karege et al., 2002]; inoltre il BDNF sierico in pazienti depressi non in trattamento farmacologico è significativamente inferiore rispetto a quello di pazienti in terapia antidepressiva e di soggetti sani, suggerendo il ritorno alla normalità dei valori di BDNF e la riduzione dei sintomi depressivi successivamente al trattamento antidepressivo [Shimizu et al., 2003].

In letteratura, comunque, si trovano ben pochi studi a lungo termine per l'effetto del trattamento antidepressivo sui valori di BDNF sierico: tra questi lo studio di Aydemir et al. [2005] riporta come in pazienti trattati con venlafaxina per dodici settimane si verifici un aumento dei livelli sierici di BDNF; conclusioni analoghe sono emerse anche su un periodo di osservazione di otto settimane [Gonul et al., 2005].

9.2.1 Conclusione II

I dati emersi da questo secondo studio consentono di affermare che il BDNF plasmatico, rispetto a quello sierico, è un indice più sensibile negli studi di efficacia terapeutica, specie per studi di lunga durata.

Questa conclusione è in linea con più recenti lavori, in particolare con i risultati emersi da un recente studio di followup della durata di 1 anno su pazienti affetti da schizofrenia e su pazienti con disturbo bipolare [Palomino A. Et al, 2006]: gli autori hanno riportato che, se pure i livelli di BDNF risultano ridotti rispetto ad una popolazione di controllo sia nel siero che nel plasma, solo nel plasma è possibile osservare un aumento dei livelli di BDNF durante un followup di 1 anno, rispetto ai valori del baseline.

Questo dato ha destato particolare interesse visto che precedenti lavori, condotti su queste popolazioni di pazienti, non erano riusciti ad utilizzare i livelli sierici di BDNF come marker di miglioramento terapeutico [Pirildar et al., 2004].

La poca sensibilità del siero può esser dovuta alle molteplici influenze da parte di fattori umorali sulle diverse popolazioni cellulari e sulle piastrine, come anche sulla sintesi e secrezione dei componenti della cascata coagulativa.

Pertanto, i risultati ottenuti dal nostro studio su pazienti suggeriscono che l'andamento dei livelli plasmatici di BDNF possa correlare con il decorso sintomatologico di pazienti in corso di episodio depressivo maggiore. Alla luce delle difficoltà emerse durante i precedenti studi su volontari non patologici, si suggerisce comunque cautela nella valutazione dello studio naturalistico: dalle precedenti sezioni sperimentali emerge infatti che il BDNF è un parametro estremamente suscettibile a variazioni individuali anche circadiane.

Se pure resti ancora da chiarire, l'andamento medio dei livelli plasmatici della neurotrofina nel gruppo delle donne non presentava picchi circadiani; pertanto, in attesa di approfondimenti ulteriori e dato che i pazienti reclutati nello studio clinico erano per lo più di sesso femminile, il valore plasmatico di BDNF può essere considerato un biomarker utile nello studio della patologia depressiva.

RINGRAZIAMENTI

L'utilizzo della Duloxetina è condotto mediante protocolli sperimentali approvati dalla Eli Lilly Pharmaceuticals (Progetto di Ricerca intitolato: *CHANGES IN NEUROTROPHIC FACTORS LEVELS IN DULOXETINE-TREATED RATS AND MICE*, RESPONSABILI: DR. ARMANDO PICCINNI E DR. LUCIANO DOMENICI).

L'attività sperimentale su modello animale e su volontari, nonché lo studio clinico su pazienti, è stata condotta con la supervisione del Prof. Luca Giovannini, del Dr. Luciano Domenica (Istituto di Neuroscienze, CNR di Pisa) e del Dr. Armando Piccinni (Dipartimento di Psichiatria, Neurobiologia, Farmacologia, Biotecnologie; Università di Pisa), che ringrazio per la disponibilità e competenza.

Per la collaborazione, non solo tecnica, e l'amicizia, ringrazio particolarmente Alessandro (Dr. Del Debbio) ed Alessia (Dr.ssa Scatena); infine, un grazie anche agli altri specializzandi del Dipartimento di Psichiatria che hanno collaborato nel reclutamento e nella elaborazione delle valutazioni cliniche (Dr.ssa Bianchi, Dr.ssa Mariotti e Dr.ssa Schiavi).

BIBLIOGRAFIA

1. Akiskal H.S. (2000). Mood disorders: introduction and overview. In: Sadock, B.J. and Sadock, V.A., Editors, 2000. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, Lippincott, Williams & Wilkins, New York 1284-1298.pp .
2. Alderson R.F., Curtis R., Alterman A.L., Lindsay R.M., and Di Stefano P.S. (2000) "Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro." *Brain Res.*, **871(2)**:210-22.
3. Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Graos MM, Carvalho RF and Duarte CB. (2005) Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death and Differentiation*, **12**: 1329-1343
4. Aloyz R., Fawcett J.P., Kaplan D.R., Murphy R.A., and Miller F.D. (1999). "Activity-dependent activation of TrkB neurotrophin receptors in the adult CNS." *Learn Mem.*, **6**: 216-31.
5. Aloyz R.S., Bamji S.X., Pozniak C.D., Toma J.G., Atwal J. *et al.* (1998) "P53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors." *J. Cell. Biol.*, **143**: 1691-1703.
6. Altar C.A. (1999)"neurotrophin and depression" *Trends in Pharmacoll. Sci.*, **20 (2)**:59-61
7. Altar C.A. and Di Stefano P.S. (1998). "Neurotrophin trafficking by anterograde transport." *Trends Neurosci.*, **21**: 433-437.
8. Andorn AC, Mallinckrodt CH, Raskin H et al. (2005). Efficacy of duloxetine in patients with mild, moderate, or severe depressive symptoms. Poster presented at: Annual Convention of the American Psychological Association, August 18; Washington, DC.
9. Arborelius L., Owens M.J., Plotsky P.M., and Nemeroff C.B. (1999). "The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders." *J. Endocrinol.*, **160**: 1-12.
10. Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z. and Lindvall O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke, *Nat. Med.* **8**: 963-970.
11. Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. (2000). "The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and PI3-kinase." *Neuron* **27**: 265-277.
12. Aydemir C, Yalcin ES, Aksaray S, Kisa C, Yildirim SG, Uzbay T, Goka E (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Sep 30;**30(7)**:1256-60. Epub 2006 May 2.
13. Aydemir O, Deveci A, Taneli F (2005). The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factors levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol psychiatry*; **29**: 261-165.
14. Barde Y.A. (1990) "The nerve growth factor family". *Prog. Growth Factor Res.*, **2**: 237-248.
15. Barde Y.A., Edgard D., and Thoenen H. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." *EMBO J.*, **1**: 549-553.
16. Barnea A. and Nottebohm F. (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:11217-11221.
17. Batchelor P.E., Porrit M.J., Martinello P., Parish C.L., Liberatore G.T., Donnan G.A., and Howells D.W. (2002). "Macrophages and microglia produce local trophic gradients that

- stimulate axonal sprouting toward but not beyond the wound edge." *Molecular and cellular neuroscience*, **21**: 436-453.
18. Bench CJ, Frackowiak RSJ and Dolan RJ (1995), Changes in regional cerebral blood flow on recovery from depression, *Psychol. Med.* **25**: 247-251
 19. Berchtold NC, Oliv HS, Isackson P, Cotman CW (1999). Hippocampal BDNF mRNA shows a diurnal regulation, primarily in the exon III transcript, *Mol. Brain Res.* **71**: 11-22.
 20. Blazer D.G. (2000). Mood disorders: epidemiology. In: Sadock, B.J. and Sadock, V.A., Editors, 2000. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, Lippincott, Williams & Wilkins, New York pp .1298-1308.
 21. Blom JM, Tascadda F, Carra S, Ferraguti C, Barden N, Brunello N. (2002) Altered regulation of CREB by chronic antidepressant administration in the brain of transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Neuropsychopharmacology*; **26**(5):605-14.
 22. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science*, **286**: 1358-1362.
 23. Bova R., Micheli M.R., Qualadrucci P., Zucconi G.G., BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light-dark cycle, *Mol. Brain Res.* **57** (1998) 321-324.
 24. Bradley J. and Sporns O. (1999). "BDNF-dependent enhancement of exocytosis in cultured cortical neurons requires translation but not transcription." *Brain Res.*, **815**: 140-149.
 25. Braun A., Lommatzsch M., Mannsfeldt A., Neuhaus-Steinmetz U., Fischer A., Schnoy N., *et al.* (1999). "Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation." *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **21**(4): 537-46.
 26. Bremner, J.D., Narayan, M., Anderson, E.R., Staib, L.H., Miller, H.L. and Charney, D.S., 2000. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am. J. Psychiatry* **157**, pp. 115-118.
 27. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. (2001) "Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-AKT signaling pathway." *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**: 297-305.
 28. Burmeister M. (1999). Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biol. Psychiatry* **45**, pp. 522-532.
 29. Bymaster FP, Dreshfield-Ahmad LJ, Threlkeld PG *et al.* (2001) Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors. *Neuropsychopharmacology*; **25**: 871-80.
 30. Campbell S., Marriott M., Nahmias C. and MacQueen G.M., Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis, *Am. J. Psychiatry* **161** (2004), pp. 598-607.
 31. Campenot R.B. (1977) "Local control of neurite development by nerve growth factor." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**: 4516-4519.
 32. Carmignoto G., Pizzorusso T., Tia S. and Vicini S. (1997). "Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex." *J. Physiol.*, **498** (Part 1): 153-164.
 33. Castren E, Thoenen H, Lindholm D. (1995) Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Neuroscience*. Jan; **64**(1):71-80.

34. Charney D.S. (1998). Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J. Clin. Psychiatry*; **59 (Suppl 14)**: 11-14
35. Chen B., Dowlatshahi D., MacQueen G.M., Wang J.F., and Young L.T. (2001). "Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication." *Biol. Psychiatry*, **50**: 260-265.
36. Cohen S. and Levi-Montalcini R. (1956) "A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **42**: 571.
37. Cohen S. Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1954) "A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180." *Zoology*, **40**: 1014-1018.
38. Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, and Dragunow M. (1997). "Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease." *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **49(1/2)**: 71-81.
39. Conti A.C., Cryan J.F., Dalvi A., Lucki L. and Blendy J.A. (2002). CREB is essential for the upregulation of BDNF transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci*. 2002 Apr 15;**22(8)**:3262-8.
40. Croft H, Settle E Jr, Houser T, Batey SR, Donahue RM, Ascher JA (1999). A placebo-controlled comparison of the antidepressant efficacy and effects on sexual functioning of sustained-release bupropion and sertraline. *Clin Ther*. Apr; **21(4)**:643-58.
41. Czeh B., Michaelis T., Watanabe T., Frahm J., de Biurrun G., van Kampen M., Bartolomucci A. and Fuchs E. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:12796-12801.
42. De Kloet E.R., Rosenfeld P., Van Eekelen J.A., Sutanto W. and Levine S. (1988). Stress, glucocorticoids and development. *Prog. Brain Res.* **73**: 101-120.
43. Detke MJ, Lu Y, Goldstein DJ et al. (2002a). Duloxetine 60 mg once daily dosing versus placebo in the acute treatment of major depression. *J Psychiatr Res*; **36**: 383-90.
44. Detke MJ, Lu Y, Goldstein DJ et al. (2002b). Duloxetine, 60 mg once daily, for major depressive disorder: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*; **63**: 308-15.
45. Dobrowsky R.T., Jenkins G.M. and Hannun Y.A. (1995) "Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75^{ntr} with Trk receptors." *J. Biol. Chem.*, **270**: 22135-22142.
46. D'Onofrio M, de Grazia U, Morrone S, Cuomo L, Spinsanti P, Frati L, Gulino A, and Ragona G (2000). "Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes." *Eur Cytokine Netw.*, **11(2)**: 283-91.
47. Donovan M.J., Lin M.I., Wiegand P., Ringstedt T., Kraemer R., Hahn R., Wang S., Ibanez CF., Rafii S., and Hempstead B.L. (2000). "Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization." *Development*, **127(21)**: 4531-40.
48. Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF and Young LT. (1998). "Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression." *Lancet*, **352**: 1754-1755.
49. Dragunow M., Beilharz E., Mason B., Lawlor P., Abraham W., and Gluckman P. (1993). "Brain-derived neurotrophic factor expression after long-term potentiation." *Neurosci. Lett.*, **160**: 232-236.
50. Drevets W.C. (2001). Neuroimaging and neuropathological studies of depression: Implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**: 240-249.

51. D'Sa C. and Duman R.S. (2002). "Antidepressant and neuroplasticity." *Bipolar disorders*, **4**: 183-194.
52. Duman R.S., Heninger G.R. and Nestler, E.J. (1997). A molecular and cellular hypothesis of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **54**: 597-606.
53. Duman R.S. and Vaidya V.A. (1998). "Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures." *J ECT*, **14**: 181-193.
54. Duman RS, Malberg JE, Nakagawa S and D'Sa C (2000). Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry* **48**: 732-739.
55. Duman R.S., Nakagawa S. and Malberg J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropharmacology* **25**: 836-844.
56. Duman RS. (2004). Depression A case of neuronal life and death?, *Biol Psychiatry* **56**:140-145.
57. Duman RS and Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. Jun 15; **59(12)**:1116-27.
58. Dwivedi Y, Rao JS, Rizavi HS, Kotowski J, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (2003). Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Mar; **60(3)**:273-82.
59. Dwivedi Y, Rizavi HS, Roberts RC, Conley RC, Tamminga CA, Pandey GN. (2001). Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *J Neurochem*. 2001 May; **77(3)**:916-28.
60. Ehlers M. *et al.* (1995) "NGF-stimulated retrograde transport of Trk A in the mammalian nervous system." *J. Cell Biol.*, **130**: 149-156
61. Engesser-Cesar C, Anderson AJ, Cotman CW. Wheel running and fluoxetine antidepressant treatment have differential effects in the hippocampus and the spinal cord. *Neuroscience*. 2007 Feb 9; **144(3)**:1033-44. Epub 2006 Nov 28.
62. Ernfors P., Wetmore C., Olson L., and Persson H. (1990). "Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family." *Neuron*, **5**: 511-526.
63. Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Persson H., and Lindvall O. (1991). "Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis." *Neuron*, **7**: 165-176.
64. Ernfors P., Merlio J.P., and Persson H. (1992). "Cells expressing mRNA for neurotrophins and their receptors during embryonic rat development." *Eur. J. Neurosci.*, **4**: 1140-1158.
65. Esteban I., Hannestad J., Levanti B., Del Valle M.E., Naves F.J., and Vega J.A. (1995) "Neurotrophin receptor proteins immunoreactivity in human gastrointestinal endocrine cells." *Brain Res Bull.*, **38(6)**: 539-43.
66. Fava M. and Kendler K.S. (2000). Major depressive disorder. *Neuron* **28**: 335-341.
67. Fritzschi B., Silos-Santiago I., Bianchi L.M., and Farinas I. (1997). "The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation." *Trends Neurosci.*, **20**: 159-164.
68. Fuchs E and Gould E (2000). Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain; regulation and functional implications. *Eur. J. Neurosci.* **12**: 2211-2214.
69. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, and Tandon NN (2002). "Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation." *Thromb. Haemost.*, **87**: 728-734.
70. Gage F (2000). Mammalian neural stem cells, *Science* **287**: 1433-1438.
71. Ghosh, A., Carnahan, J. and Greenberg, M.E., (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* **263**: 1618-1623.

72. Gielen A., Khademi M., Muhallab S., Olsson T., Piehl F., (2003). "Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients." *Scand. J. Immunol.*, **57(5)**: 493-7.
73. Goldberg JL and Barres BA (2000). The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci* **23**: 579-612.
74. Goldstein DJ, Lu Y, Detke MJ et al. (2004). Duloxetine in the treatment of depression: a double-blind placebo-controlled comparison with paroxetine. *J Clin Psychopharmacol*; **24**: 389-99.
75. Goldstein DJ, Mallinckrodt C, Lu Y, Demitrack MA (2002). Duloxetine in the treatment of major depressive disorder: a double-blind clinical trial. *J Clin Psychiatry*; **63**: 225-31.
76. Goldstein DJ, Rampey AH Jr, Enas GG, Potvin JH, Fludzinski LA, Levine LR (1994). Fluoxetine: a randomized clinical trial in the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord. Mar*;18(3):129-35.
77. Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S (2005). Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*; Dec;255(6):381-6.
78. Gould E and Tanapat P (1997). Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat, *Neuroscience* **80**: 427-436.
79. Gould E., McEwen B.S., Tanapat P., Reeves A. and Shors T.J., Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation, *Nat. Neurosci.* 2 (1999a), pp. 260-265.
80. Gould E., Panapat P., Rydel T. and Hastings N., Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood, *Biol Psychiatry* 48 (2000), pp. 715-720.
81. Gould E., Reeves A.J., Graziano M.S. and Gross C.G., Neurogenesis in the neocortex of adult primates, *Science* 286 (1999b), pp. 548-552.
82. Gross C.G., Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma, *Nat. Rev., Neurosci.* 1 (2000), pp. 67-73.
83. Halban P.A., and Irminger J.C. (1994). "Sorting and processing of secretory proteins." *Biochem. J.*, **299 (Pt 1)**: 1-18.
84. Hamanoue M., Middleton G., Wyatt S., Jaffray E., Hay R.T. and Davies A.M. (1999). "p75-mediated NF-B activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor." *Mol. Cell. Neurosci.*, **14**: 28-40.
85. Harter C. and Reinhard C. (2000). "The secretory pathway from history to the state of the art." *Subcell. Biochem.*, **34**: 1-38.
86. Harto NE, Spera KF, Branconnier RJ Fluoxetine-induced reduction of body mass in patients with major depressive disorder. *Psychopharmacol Bull.* 1988;24(2):220-3.
87. Hiltunen J.O., Arumae U., Moshnyakov M., and Saarma M. (1996). "Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in developing rat heart." *Circ. Res. Nov.*, **79(5)**: 930-9.
88. Hoehner J.C., Wester T., Pahlman S., and Olsen L. (1996). "Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development." *Gastroenterology*, **110(3)**: 756-67.
89. Hofer M., Pagliusi S.R., Hohn A., Leibrock J., and Barde Y.A. (1990). "Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain." *EMBO J.*, **9**: 2459-2464.
90. Hokfelt T., Broberger C., Xu Z.Q., Sergeev V., Ubink R., and Diez M. (2000). "Neuropeptides—an overview." *Neuropharmacology*, **39**: 1337-1356.
91. Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev.* 1996 Apr; **17(2)**:187-205.
92. Holsboer F. (2001). "Stress , hypercortisolism and corticosteroid receptor in depression: implication for therapy." *J. Affect. Disord.*, **62**: 77-91.

93. Horch H.W., Kruttgen A., Portbury S.D., and Katz L.C. (1999). "Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF." *Neuron*, **23**: 353-64.
94. Howells D.W., Porritt M.J., Wong J.Y., Batchelor P.E., Kalnins R., Hughes A.J., *et al.* (2000). "Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra." *Exp. Neurol.*, **166(1)**: 127-35.
95. Isackson P.J., Huntsman M.M., Murray K.D., and Gall C.M. (1991). "BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF." *Neuron*, **6**: 937-948.
96. Kandel E.R. *et al.* (2003). "Principi di neuroscienze." Terza edizione, casa editrice Ambrosiana.
97. Kaplan D.R. and Miller F.D. (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**: 381-391.
98. Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R (2005). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005 May 20; **136(1-2)**:29-37.
99. Karege F., Perret G., Bondol W.G., Schwald M., Bertschy G., and Aubry J.M. (2002). "Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients." *Psychiatry Res.*, **109**: 143-148.
100. Kato-Semba R., Takeuchi I.K., Semba R., and Kato K. (1997). "Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain." *J. Neurochem.*, **69**: 34-42.
101. Kempermann, G., Kuhn, H.G. and Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, pp. 493-495.
102. Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., *et al.* (1999). "Activated human T cells, B cells and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in brain lesions: A neuroprotective role of inflammation?" *J. Exp. Med.*, **189**: 865-870.
103. Kuroda, Y. and McEwen, B.S., 1998. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43, and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* **59**, pp. 35-39.
104. Kuruvilla R, Ye H, Ginty DD (2000). "Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons." *Neuron*, **27**: 499-512.
105. Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C., and Jahn R. (2001). "SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis." *EMBO J.*, **20**: 2202-2213.
106. Lee R., Kermani P., Teng K.K., and Hempstead B.L. (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." *Science*, **294**: 1945-8.
107. Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H., and Barde Y.A. (1989) "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor." *Nature*, **341**: 149-152.
108. Lessmann V. (1998a). "Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS." *Gen. Pharmacol.*, **31**: 667-674.
109. Lessmann V. and Heumann R. (1998b). "Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation." *Neuroscience*, **86**: 399-413.
110. Levi - Montalcini R. and Hamburger V. (1953). "A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic-ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo." *J. Exp. Zool.*, **123**: 233-287.
111. Levivier M., Przedborski S., Bencsics C., and Kang U.J. (1995). "Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived

- neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease." *J. Neurosci.*, **15(12)**: 7810-20.
112. Li Y.X., Xu Y., Ju D., Lester H.A., Davidson N., and Schuman E.M. (1998a). "Expression of a dominant negative TrkB receptor, T1, reveals a requirement for presynaptic signaling in BDNF-induced synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 10884-10889.
 113. Li Y.X., Zhang Y., Lester H.A., Schuman E.M., Davidson N. (1998b). "Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons." *J. Neurosci.*, **18**: 10231-10240.
 114. Liang F.Q., Walline R., Earnest D.J., Circadian rhythm of brain-derived neurotrophic factor in the rat suprachiasmatic nucleus, *Neurosci. Lett.* 242 (1998) 89-92.
 115. Lindholm D., Castren E., Berzaghi M., Blochl A., and Thoenen H. (1994). "Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain—implications for neuronal plasticity." *J. Neurobiol.*, **25**: 1362-1372.
 116. Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J., Elmer E., and Kokaia M. (1994). "Neurotrophins and brain insults." *Trends Neurosci.*, **17**, 490-496.
 117. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC (2005). "The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelet and plasma." *Neurobiology of aging*, **26**: 115-123.
 118. Magavi SS, Leavitt BR and Macklis JD (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice, *Nature* **405**: 951-955.
 119. Maggirwar S.D.B., Sarmiere P.D., Dewhurst S. and Freeman R.S., (1998). "Nerve growth factor-dependent activation of NF-B contributes to survival of sympathetic neurons." *J. Neurosci.*, **18**: 10356-10365.
 120. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M., and Yancopoulos G.D. (1990). "NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression." *Neuron*, **5**: 501-509.
 121. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.M., and Yancopoulos G.D. (1990). "Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF." *Science*, **23**; **247(4949 Pt 1)**: 1446-51.
 122. Maisonpierre P.C., Le Beau M.M., Espinosa R. 3rd, Ip N.Y., Belluscio L., de la Monte S.M., Squinto S., Furth M.E., and Yancopoulos G.D. (1991). "Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations." *Genomics.*, **10(3)**: 558-68.
 123. Malberg J.E., Eisch A.J., Nestler E.J., and Duman R.S. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J. Neurosci.*, **20**: 9104-9110.
 124. Malberg JE and Duman RS (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* **28(9)**: 1562-71
 125. Manji, H.K., Drevets, W.C. and Charney, D.S., 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat. Med.* **7**, pp. 541-547.
 126. Maroder M., Bellavia D., Meco D., Napolitano M., Stigliano A., Alesse E., Vacca A., Giannini G., Frati L., Gulino A., and Screpanti I. (1996). "Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival." *J. Immunol.*, **157(7)**: 2864-72.
 127. Marty S., Berzaghi M., and Berninger B. (1997). "Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons." *Trends Neurosci.*, **20**: 198-202.

128. Mayberg HS and Fossati P (2004). Dysfunctional limbic-cortical circuits in major depression: a functional neuroimaging perspective. In: D.M. Barch, Editor, *Cognitive and Affective Neuroscience of Psychopathology*, Oxford University Press
129. Mayr B and Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;**2(8)**:599-609.
130. Mazzoni I.E., Said F.A., Aloyz R., Miller F.D. and Kaplan D. (1999). "Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J. Neurosci.*, **19**: 9716-9727 An important study from the Miller and Kaplan laboratories showing that apoptosis of sympathetic neurons involves p53.
131. McAllister, A.K., Katz, L.C. and Lo, D.C., 1996. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* **17**, pp. 1057-1064.
132. McEwen BS (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* **22**:105-22
133. McEwen BS (2000). Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* **22**: 108-124.
134. McMahon S.B., Armanini M.P., Ling L.H., and Phillips H.S. (1994). "Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets." *Neuron.*, **12(5)**:1161-71.
135. Merighi A.(2002). "Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS." *Prog. Neurobiol.*, **66**: 161-190.
136. Mesulam MM (1999). Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles, *Neuron* **24**: 521-529.
137. Michalski B and Fahnstock M. (2003). "Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease." *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **111(1/2)**: 148-54.
138. Michelson D, Amsterdam JD, Quitkin FM, Reimherr FW, Rosenbaum JF, Zajecka J, Sundell KL, Kim Y, Beasley CM Jr. Changes in weight during a 1-year trial of fluoxetine. *Am J Psychiatry.* 1999 Aug;**156(8)**:1170-6.
139. Murer M.G., Yan Q., and Raisman-Vozari R. (2001). "Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *Prog. Neurobiol.*, **63**: 71-124.
140. Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T. and Nakafuku M., Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors, *Cell* **110** (2002), pp. 429-441.
141. Nawa H. and Takei N. (2001). "BDNF as an anterophin: a novel neurotrophic relationship between brain neurons." *Trends Neurosci.*, **24**: 683-684.
142. Nemoto K., Fukamachi K., Nemoto F., Miyata S., Hamada M., Nakamura Y., Senba E, and Ueyama (1998). "Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245(1)**: 284-8.
143. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* 2002 Mar **28**;34(1):13-25.
144. Nestler, E.J., Terwilliger, R.Z. and Duman, R.S., 1989. Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex. *J. Neurochem.* **53**, pp. 1644-1647.
145. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *J. Neurosci.*, **15**: 7539-7547.

146. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996). "Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus." *J. Neurosci.*, **16**: 2365-2372.
147. Noga O., Englmann C., Hanf G., Grützkau A., Seybold J., and Kunkel G. (2003). "The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics." *Clin. Exp. Allergy*, **33**: 649-654.
148. Norrholm, S.D. and Ouimet, C.C., 2001. Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. *Synapse* 42, pp. 151-163.
149. Ongur D, Drevets WC, Price JL (1998). "Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**: 13290-13295.
150. Palmer, T.D., Takahashi, J. and Gage, F.H., 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8, pp. 389-404.
151. Palomino A., Gonzalez-Pinto A. and Matute C. (2006): Decreased levels of plasma BDNF in the first episode schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophrenia Research* 86:321-322
152. Pandey S.C., Zhang D., Mittal N., and Nayyar D. (1999). "Potential role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety." *Journal of experimental and therapeutics*, **288**: 866-878.
153. Parain K., Murer M.G., Yan Q., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E., and Raisman-Vozari R. (1999). "Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra." *Neuroreport*, **10**: 557-561.
154. Patapoutian A. and Reichardt L.F., Trk receptors: mediators of neurotrophin action, *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 (2001), pp. 272-280.
155. Patterson S.L., Grover L.M., Schwartzkroin P.A., and Bothwell M. (1992). "Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs." *Neuron*, **9**: 1081-1088.
156. Paul J., Gottmann K., and Lessmann V. (2001). "NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons." *Neuroreport*, **12**: 2635-2639.
157. Pawson T. and Nash P. (2000). "Protein-protein interactions define specificity in signal transduction." *Genes Dev.*, **14**: 1027-1047.
158. Perez-Perez M., Esteban I., Garcia-Suarez O., Hannestad J., Naves F.J., Vega J.A. (1999). "Expression of the neurotrophin receptor TrkB in rat spleen macrophages." *Cell Tissue Res.*, **298(1)**: 75-84.
159. Phillips H.S., Hains J.M., Armanini M., Laramée G.R., Johnson S.A., and Winslow J.W. (1991). "BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease." *Neuron*, **7(5)**: 695-702.
160. Pirildar S., Gonul A.S., Taneli F. and Akdeniz F. (2004) Low serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia do not elevate after antipsychotic treatment. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28:709-713.
161. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA (1996). Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res*; **709(1)**: 122-301.
162. Rajkowska G (2000a). Histopathology of the prefrontal cortex in major depression: what does it tell us about dysfunctional monoaminergic circuits?, *Prog. Brain Res.* **126**: 397-412
163. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA. (1999). "Morphometric evidence for neuronal

- and glial prefrontal cell pathology in major depression." *Biol. Psychiatry*, **45**: 1085-1098.
164. Rajkowska G., Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells, *Biol. Psychiatry* 48 (2000), pp. 766-777 (b)
 165. Riccio A, Pierchala BA, Ciarallo CL, Ginty DD. (1997). "An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons." *Science*, **277**: 1097-1100.
 166. Rietze R, Poulin P and Weiss S(2000). Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus, *J. Comp. Neurol.* **424**: 397-408.
 167. Rocamora N., Welker E., Pascual M., and Soriano E. (1996). "Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after sensory stimulation." *J. Neurosci.*, **16**: 4411-4419.
 168. Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, et al.. *Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum*. *Protein Expr Purif* 1995; 6(4): 465-71.
 169. Rothman J.E. and Orci L. (1992). "Molecular dissection of the secretory pathway." *Nature*, **355**: 409-415.
 170. Russo-Neustadt A.A., Beard R.C., and Cotman C.W. (1999). "Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression." *Neuropsychopharmacology*, **21**: 679-682.
 171. Sachar, E.J. and Baron, M., 1979. The biology of affective disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 2, pp. 505-517.
 172. Sanders, A.R., Detera-Wadleigh, S.D. and Gershon, E.S., 1999. Molecular genetics of mood disorders. In: Charney, D.S., Nestler, E.J. and Bunney, B.S., Editors, 1999. *Neurobiology of Mental Illness*, Oxford, New York 299-316.pp .
 173. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003 Aug 8;301(5634):805-9.
 174. Sapolsky RM Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12320-2.
 175. Sapolsky, R.M., 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, pp. 925-935.
 176. Scarisbrick I.A., Jones E.G., and Isackson P.J. (1993). "Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat." *J. Neurosci.*, **13**(3): 875-93.
 177. Schaaf M.J.M., Duurland R., E.R. de Kloet, Vreugdenhil E., Circadian variation in BDNF mRNA expression in the rat hippocampus, *Mol. Brain Res.* 75 (2000) 342-344.
 178. Schildkraut J.J. The catecholamine Hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am.J.Psychiatry* 1965 122 (5): 509-22
 179. Schinder A.F. and Poo M. (2000). "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity." *Trends Neurosci.*, **23**: 639-645.
 180. Schinder A.F., Berninger B., and Poo M. (2000). "Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation." *Neuron*, **25**: 151-163.
 181. Schuman E.M. (1999). "Neurotrophin regulation of synaptic transmission." *Curr. Opin. Neurobiol.*, **9**: 105-109.
 182. Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Savaria D., Hamelin J., Goulet B., et al. (1996). "Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases." *Biochem. J.*, **314**: 951-960.
 183. Shaywitz AJ, Greenberg ME CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-61.

184. Sheline Y.I., Gado M.H. and Kraemer H.C., Untreated depression and hippocampal volume loss, *Am. J. Psychiatry* 160 (2003), pp. 1516-1518
185. Sheline Y.I., Wany P., Gado M.H., Csernansky J.G. and Vannier MW., Hippocampal atrophy in recurrent major depression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996), pp. 3908-3913.
186. Sheline, Y.I., Sanghavi, M., Mintun, M.A. and Gado, M.H., 1999. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J. Neurosci.* 19, pp. 5034-5043.
187. Shimizu E., Hashimoto K., Okamura N., Koike K., Komatsu N., Kumakiri C., *et al.* (2003). "Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants." *Biol. Psychiatry*, **54(1)**: 70-5.
188. Smith, M.A., Makino, S., Kvetnansky, R. and Post, R.M., 1995. Stress and glucocorticoids affect the expressing of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J. Neurosci.* 15, pp. 1768-1777.
189. Taniguchi N., Takada N., Kimura F., and Tsumoto T. (2000). "Actions of brain-derived neurotrophic factor on evoked and spontaneous EPSCs dissociate with maturation of neurones cultured from rat visual cortex." *J. Physiol.*, **527 (Part 3)**: 579-592.
190. Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J. and Greenberg, M.E., 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, pp. 709-726.
191. Thome, J., Sakai, N., Shin, K., Steffen, C., Zhang, Y.J., Impey, S., Storm, D. and Duman, R.S., 2000. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J. Neurosci.* 20, pp. 4030-4036.
192. Tiraboschi E, Tardito D, Kasahara J et al. Selective Phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase iv and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29 (10): 1831-1840
193. Tsacopoulos M. and Magistretti P.J., Metabolic coupling between glia and neurons, *J. Neurosci.* 16 (1996), pp. 877-885.
194. van Praag H, Kempermann G and Gage FH (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2: 266-270.
195. Vermetten E, Vythilingam M, Southwick SM, Charney DS, Bremner JD (2003). Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. Oct 1;**54(7)**:693-702.
196. Walton M, Woodgate AM, Muravlev A, Xu R, Doring MJ, Dragunow M. (1999). "CREB phosphorylation promotes nerve cell survival." *J. Neurochem.*, **73** :1836-1842
197. Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, Pomeroy SL, Segal RA. (1999). "Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex." *J. Neurosci.*, **19**: 7889-7900.
198. Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA (2001). "Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response." *Nat. Neurosci.*, **4**: 4.
199. Wise TN, Perahia DG, Pangallo BA, Losin WG, Wiltse CG. Effects of the antidepressant duloxetine on body weight: analyses of 10 clinical studies. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2006;8(5):269-78.
200. Wong DT, Bymaster FP. Dual serotonin and noradrenaline uptake inhibitor class of antidepressants potential for greater efficacy or just hype? *Prog Drug Res* 2002; 58: 169-222.
201. Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*. 1988 Aug 11;334(6182):494-8.

202. Yoon S.O., Carter B.D., Cassaccia-Bonnet P. and Chao M.V. (1998). "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival." *J. Neurosci.*, **18**: 3273-3281.
203. York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ (2000). "Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1." *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 8069-8083.
204. Young EA, Haskett RF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H (1991) . Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. *Arch Gen Psychiatry*. Aug;**48(8)**:693-9.
205. Zafra F., Hengerer B., Leibrock J., Thoenen H., and Lindholm D. (1990). "Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors." *EMBO J.*, **9**: 3545-3550.
206. Zhu, M.Y., Klimek, V., Dilley, G.E., Haycock, J.W., Stockmeier, C., Overholser, J.C., Meltzer, H.Y. and Ordway, G.A., 1999. Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol. Psychiatry* 46, pp. 1275-1286